



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 al tracto digestivo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) alimentado con películas comestibles

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Olga Virginia Figuera Martínez como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. Meris Casotto

CARACAS, VENEZUELA

JUNIO 2011

El presente Trabajo Especial de Grado presentado por el bachiller

Olga Virginia Figuera Martinez

Ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en
Biología y titulado

**Transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 al
tracto digestivo del gorgojo de arroz (*Sitophilus
oryzae*) alimentado con películas comestibles**

Fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental de la facultad de Ciencias, bajo la dirección de la Dra. Meris Casotto, siendo aprobada en discusión pública por los siguientes miembros del jurado designados por el Consejo de Escuela, quienes consideraron que cumplió con los requerimientos exigidos por el reglamento universitario.

Caracas, a los 3 días del mes de agosto del año 2011

Meris Casotto

Dra. Meris Casotto

María Soledad Tapia
Dra. María Soledad Tapia

Rosa Raybaudi
Dra. Rosa Raybaudi

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este Trabajo Especial de Grado a una persona que fue es y seguirá siendo muy especial en mi vida.

Tia Zhaila, fuiste una mujer emprendedora, samaritana, con un espíritu y una fuerza inmensamente grande, luchadora, inteligente.....

Eras el engranaje más grande que mantenía a la familia unida, hasta en tus últimos momentos de vida, una madre innegable, una hija maravillosa, una hermana incondicional y una tía maravillosa y preocupada por toda su familia.

Tus conocimientos de medicina incentivaron, influyeron y motivaron positivamente mi carrera, aprendí muchísimo de ti.

Eres irremplazable en nuestras vidas, espero que estés en un lugar maravilloso, donde el descanso de tu alma y tu espíritu sean infinitos, te extraño y hubiese querido tenerte siempre, sin embargo, sé que nos acompañas y nos proteges en todo momento.

Gracias por tus consejos, por tu ejemplo de vida, por mostrarnos lo que realmente vale la vida y guíame en todo momento para formar parte de una línea de investigación que ayude a miles de personas que padecieron lo que viviste en carne propia.

Estas en mi corazón y en mi mente todo el tiempo, te adoro!!!!

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecerle a Dios, la Virgen y San Miguel Arcángel en quien tengo mucha Fé y confío plenamente en ellos, gracias por darme a unos padres, a una familia y a unos amigos verdaderos, Gracias mi Dios.

A mis Padres, Bicerka y Néstor por ser el apoyo, la motivación, por tenerme paciencia y creer en mí. Gracias por estar siempre en los buenos y malos momentos de mi vida, los AMO con todo mi corazón.

A mis Hermanas, Rebeca y Laura, por ser parte de este proceso, por estar presente y motivarme todos los días. Como hermana mayor, espero haberles dado el ejemplo (pero por favor, hagan su carrera en menos tiempo, jajajajajaja). La AMO inmenso, esto es de ustedes y para ustedes.

A mi abuela Olga, le quiero dar las gracias por tenerme en su casa como una hija mas, yo también la considero como mi mamá, animándome todo el tiempo para culminación de mi trabajo. Te ADORO mucho abuela.

A mi tía Amaiza, gracias por desvelarte conmigo para darte la exposición un día antes de la presentación de la tesis y tomarme el tiempo, gracias por asistir a mi presentación de tesis, y gracias a tus Santos hermosos que también me protegen en todo momento. Te QUIERO tía Bella.

A mi hermano, amigo, pana, de verdad no tengo palabras ni adjetivos calificativos para darte las gracias por todo lo que me ayudaste, por alojarme en tu casa, por trasnocharte conmigo escribiendo y GRAFICANDO gran parte de mi tesis. Te ADORO Dennis, gracias por estar ahí en las buenas, medias y malas tintas de mi vida.

A Virginia, madre de Dennis, por hacerme un espacio en tu casa cada vez que lo necesitaba, gracias por ser mi amiga y por todos tus buenos deseos, por hacerme reír y por confiar en mí. Te QUIERO Y TE APRECIO mucho.

A Leonardo, quiero darte las gracias por apoyarme, por creer en mí, por haber compartido hasta el último momento este logro. Eres una gran persona, Gracias Totales.

A mi amiga Indira, quiero agradecerle de corazón su amistad incondicional y el haberme enseñado microbiología. Gracias por hacerme reír, gracias por hacerme una estadía agradable en el CVCM. Te QUIERO mi amiga.

A mi amiga Jamileth, mi hermanita menor, gracias por haber confiado mucho en mi, gracias por haber trabajado conmigo académicamente, gracias por haber estado en las buenas y malas, de verdad Te QUIERO mucho y te extraño.

A mis amigos, panas, Wilmer, Yaklin, Carolina, Roxana, Anibal, Andrecho, Jonatan, Vanessa, Arneld, Rosangela, Adolfo, Jesús Macoya, Yarcelis, Yesnaret, Cheo,

Edgar, Orlando, Karelis, Diego, Yenny (la techer), Yirsi, Samanta, Andreína, Roberto, Juls, Alberto, Rubén, Francisco, Adriana Pineda, Ana Peñuela, Ana Teresa, Jamila, Argenis, Beatriz, Diamaris, Alejandra, Daniel Origami, Liset, Eric, Mariana, Migai, Milagros, Moisés, Oscar, Penélope, Sabrina, Sonsiré, Kruscaya, Denis..... A otros tanto que adoro, pero realmente no recuerdo, todos ustedes y quizás más, estuvimos juntos en la carrera, compartiendo momentos académicos, rumbas, cumpleaños y muchas cosas más, Los quiero a todas y todos, gracias por estar.

A mi tutora, Meris Casotto, gracias primeramente por tenerme paciencia y por confiar en mí, la respeto como profesional, como profesora y como amiga, la quiero mucho mi profe.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica Nutricional, A mi profesor Alexander Laurentin y a mi profesora Ana Gómez, gracias por recibirme, por enseñarme, por el apoyo que me brindaron a lo largo de mi carrera.

A la Lic. Juana, la señora Juanita y al Prof. Vidal, gracias por enseñarme una pequeña parte de todo lo que usted sabe de microbiología, gracias por apoyarme y por hacerme una estadía agradable en su laboratorio, la aprecio mucho.

Al Profesor Matías Reyes, GRACIAS por enseñarme a sacar el intestino del gorgojo, jajajajajaja, gracias por enseñarme a mí y a muchos como se realiza un proyecto, como se lleva a cabo con éxito, gracias por su sinceridad, de verdad aprendí la productividad de un laboratorio, Mil Gracias.

A la Prof. Dagger, la chicha, gracias por colaborar, por apoyar mi trabajo de grado, gracias por brindarnos su tiempo en la búsqueda de la microscopía, gracias por su trato agradable, sincero y por todo su cariño.

A las profesoras de Botánica y Fisiología Vegetal del IBE, gracias por brindarme su espacio e instrumentos de trabajo (Agua destilada, lupa), para lograr el objetivo.

Gracias al Prof. Blas Dorta, por ser mi profe Bello y por prestarme su laboratorio para la realización de esta tesis.

Gracias al Prof. Pedro Rodríguez por el apoyo y la instrucción académica, al formar parte del análisis de resultados de la microscopía de barrido, gracias por dejarme trabajar allí.

Gracias a los profesores y profesoras que estuvieron en mi proceso académico, muchos que estuvieron involucrados en la realización de este trabajo, otros que me dieron clases y se generó un gran aprecio; Rosa Urich, Palmira Guevara, Laurin, Alvaro, Adriana Mayora, Roxana Gallardo, Marcia, Mairi, Elevina, Erlinda, Nardy Diez, Jesús Romero, Juan Carlos Navarro, y a tantos, que no recuerdo en este momento pero admiro inmensamente.

Gracias a mis profesoras Jurados, María Soledad Tapia y Rosa Raibaudi, gracias por apreciar, valorar y corregir este trabajo hermoso. Gracias por prestarme los materiales del laboratorio, por cederme el espacio en el ICTA. Mil Gracias

Gracias a las personas agradables que me atendieron en Ingeniería Metalúrgica, de la UCV, al Prof. Samuel, por atender a mi tutora y mí, por el trato cariñoso que nos brindaron en todo momento.

Gracias a la Universidad Central de Venezuela, a la Facultad de Ciencias, a la Escuela de Biología, al IBE, al ICTA, y a todas las personas que participaron en este proceso académico.

RESUMEN

La *Bifidobacterium lactis* Bb12 es considerada como un suplemento probiótico, debido al efecto benéfico que le proporciona al hospedador, promoviendo un ecosistema intestinal óptimo, regulando la composición de las bacterias presentes. Las lactobacterias se encuentran en el intestino de mamíferos, pero también han sido reportadas en insectos. El coleóptero *Sitophilus oryzae* constituye un novedoso modelo animal para estudios nutricionales; el bioensayo con este insecto es económico y sencillo de manipular, trabaja con poblaciones que tienen una emergencia alta en corto tiempo. Otra ventaja radica, en la diferenciación que presenta su tracto digestivo, lo que permite localizar a los microorganismos presentes en el intestino. Debido a la versatilidad que representa este modelo animal, en el presente trabajo se realizó la transferencia de *Bifidobacterium Lactis* Bb12, al tracto digestivo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*), mediante películas comestibles a base de almidón de papa. En el intestino del gorgojo no se encuentran presentes las bifidobacterias, sin embargo, se logró identificar bacterias anaeróbicas facultativas (*Aerococcus viridans*, *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus sp*), que forman parte de la microbiota del tracto digestivo.

La ingesta de películas comestible con o sin bífidos, durante 12 días, no causaron un efecto deletéreo sobre la supervivencia del animal. Estos alimentos promueven una ganancia de peso de 20%, con respecto a su peso inicial, esto puede atribuirse a un aumento en el contenido de grasa inducido por las dietas. Sin embargo, el estudio de la composición corporal (agua, grasa, nitrógeno proteico y cuticular) para 12 días de alimentación con las películas comestibles antes mencionadas, no es esclarecedor de los cambios producidos durante la transferencia de las bífidos. Con el fin de evidenciar estos cambios, se realizó en paralelo con el ensayo de transferencia, el estudio de todos los parámetros corporales; cuando los insectos ingieren películas comestibles con bífidos, se observó un aumento sustancial en el contenido de grasa y nitrógeno proteico, que es independiente de la dieta inicial (arveja o película sin bífidos) que se le suministre a los gorgojos; indicando que estos cambios podrían producirse por la biomasa aportada por las bacterias y/o porque ellas modulan positivamente la adsorción de nutrientes.

Por otro lado, se estimó la viabilidad de los bífidos en la película, demostrando que estas bacterias pueden sobrevivir durante los 14 días de experimento, obteniendo un recuento de 6,95 Log UFC/g al día 0, además, el pH ácido de 5,19, en la solución formadora de películas, ayudó a mantener a las bífidos viables durante el tiempo del ensayo. Se logró con éxito la transferencia de los bífidos al intestino del gorgojo de arroz, ya que las películas comestibles resultaron ser un vehículo de transferencia para estos microorganismos; para los insectos que comenzaron alimentándose con películas con bífido los primeros 4 días, el recuento bacteriano fue de 3,7 Log UFC/g, y para los insectos que se les cambió la dieta al 4 día de películas sin bífido a películas con bífido, también se produjo transferencia de estos microorganismos a los intestinos vírgenes de bífidos, obteniendo recuentos al día 6 de 3 Log UFC/g. La prueba de Chi-X², tanto para los ensayos de viabilidad como para los ensayos de transferencia, no mostraron diferencias significativas, demostrado que la variable periodo de tiempo en que se haga los experimentos, no afectó la reproducibilidad de los mismos. Por último, se evidenció la presencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12, en cortes transversales del intestino medio del gorgojo de arroz, observados bajo microscopía óptica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Insectos	5
2.2. <i>Sitophilus oryzae</i>	6
2.3. Tracto digestivo.....	7
2.3.1. Intestino Anterior.....	8
2.3.2. Intestino Medio.....	9
2.3.3. Intestino Posterior.....	10
2.3.4. Bacterias presentes en el tracto digestivo de los insectos.....	11
2.4. Generalidades sobre las Bacterias	12
2.4.1. Bacterias Aerobias.....	14
2.4.2. Bacterias Anaerobias.....	14
2.4.3. Las Bifidobacterias como Probióticos.....	16
2.5. Película Comestible.....	20
2.6. Bioensayo con el gorgojo de arroz.....	24
2.7. Microscopía de transmisión para la identificación bacterias en el tracto digestivo.....	26
2.8. Microscopía Electrónica de Barrido para la observación de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 presentes en películas comestibles.....	28
HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	29
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. Cultivo de gorgojos.....	30
4.2. Extracción, maceración y crecimiento bacteriano del tracto digestivo del <i>Sitophilus oryzae</i>	31
4.3. Cultivo de arvejas verdes partidas (<i>Pisum sativum</i>) para el crecimiento bacteriano.....	32
4.4. Tinción Gram.....	32

4.5 Pruebas microbiológicas-bioquímicas.....	33
4.5.1 Sistema de Identificación API TB Plus.....	35
4.6 Formulación y preparación de las películas comestibles.....	36
4.6.1 Extracción y purificación del almidón de papa.....	37
4.6.2 Activación de la cepa <i>Bifidobacterium lactis Bb12</i>.....	38
4.6.3 Crecimiento de la cepa <i>Bifidobacterium lactis Bb12</i>.....	38
4.6.4 Determinación del pH de la solución formadora de película.....	39
4.7 Bioensayo con el gorgojo de arroz.....	39
4.7.1 Determinación de la supervivencia y la variación de peso.....	39
4.7.2 Determinación de la composición corporal.....	40
4.7.2.1 Contenido de agua.....	40
4.7.2.2 Contenido de grasa.....	40
4.7.2.3 Contenido de nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular.....	40
4.7.2.3.1 Extracción de proteínas corporales.....	41
4.7.2.3.2 Digestión de la materia orgánica.....	41
4.7.2.3.3 Determinación del contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler.....	42
4.7.2.3.4 Determinación de proteínas presentes en las películas comestibles.....	42
4.8 Recuento de <i>Bifidobacterium lactis Bb12</i> en la película y en gorgojos alimentados con esta película.....	43
4.9 Inclusión del tracto digestivo de <i>Sitophilus oryzae</i> para la microscopia electrónica de transmisión.....	44

4.10	Preparación para la microscopía de barrido (SEM) de la película comestible con <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12.....	45
4.11	Análisis estadístico.....	45
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1	Caracterización morfológica de las bacterias encontradas en el tracto digestivo del <i>Sitophilus oryzae</i>	47
5.2	Caracterización morfológica de las bacterias encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (<i>Pisum sativum</i>).....	49
5.3	Caracterización Bioquímica de las bacterias encontradas en el tracto digestivo de <i>Sitophilus oryzae</i>	50
5.4	Identificación de las cepas bacterianas del tracto digestivo del <i>Sitophilus oryzae</i> mediante el Sistema de Identificación ATB Plus.....	54
5.5	Caracterización Bioquímica de las bacterias encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (<i>Pisum sativum</i>).....	59
5.6	Identificación de las cepas bacterianas encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (<i>Pisum sativum</i>) mediante el Sistema de Identificación ATB Plus.....	62
6	Formulación de películas comestibles a base de almidón de papa con <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 como ingrediente probiótico.....	64
6.1	Microscopia electrónica de barrido de las películas a base de almidón de papa con <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12.....	67
7	Efecto de las películas formuladas sobre algunos biomarcadores como son la supervivencia, la variación de peso y la composición corporal del gorgojo de arroz.....	69
7.1	Supervivencia.....	69

7.2 Variación de Peso.....	72
7.3 Variación de la composición corporal en <i>Sitophilus oryzae</i> alimentados con películas comestibles con y sin <i>Bifidobacterias lactis</i> Bb12.....	74
7.3.1 Contenido de agua corporal.....	74
7.3.2 Grasa corporal.....	76
7.3.3 Contenido de nitrógeno proteico.....	78
8 Valoración con la película formulada con el ingrediente probiótico el contenido de proteína como indicador del aporte de biomasa.....	82
8.1 Viabilidad de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 mediante recuento microbiológico en las películas comestibles.....	83
8.2 Transferencia de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 mediante recuento microbiológico en el tracto digestivo del gorgojo de arroz.....	84
8.3 Experimento piloto.....	87
9 Microscopía Electrónica de Transmisión del tracto digestivo del <i>S. oryzae</i> para la observación de las <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 transferidas mediante la película comestible.....	90
10 Conclusión General.....	96
11 Conclusiones.....	98
12 Referencias.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas microbiológicas y bioquímicas para la caracterización de bacterias Gram-.....	34
Tabla 2. Pruebas microbiológicas y bioquímicas para la caracterización de las bacterias Gram +.....	35
Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas encontradas en el tracto digestivo del <i>Sitophilus oryzae</i>.....	51
Tabla 4. Resultados de la galería rapid ID 32 STREP V2.0 de la cepa A.....	54
Tabla 5. Resultados de la galería ID 32 STAPH V2.0 para la cepa B.....	57
Tabla 6. Resultados de la galería ID 32 STAPH V2.0 para la cepa C.....	58
Tabla 7. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (<i>Pisum sativum</i>).....	60
Tabla 8. Resultados de la galería ID 32 GN V3.0 para la cepa E.....	64
Tabla 9. Peso promedio y composición corporal de los gorgojos alimentados con películas comestibles a base de almidón.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen del Coleóptero <i>Sitophilus oryzae</i>.....	7
Figura 2. Representación del Tracto Intestinal de insectos.....	8
Figura 3. Colonias aisladas del tracto digestivo del <i>Sitophilus oryzae</i> observadas bajo lupa estereoscópica binocular a 3X. A; B; C colonias crecidas en medio LB.....	47
Figura 4. Tinción Gram de las colonias aisladas del tracto digestivo del <i>Sitophilus oryzae</i> observadas bajo Microscopio a 100X.....	48
Figura 5. Crecimiento de la cepa B y cepa C sembrada en placa de LB-manitol con disco de Novobiocina.....	49
Figura 6. Tinción Gram de las cepas D y E que se encontraron en las arvejas verdes.....	50
Figura 7. Crecimiento de la cepa A en medio de bilis esculina y representación de la hidrólisis de la esculina.....	52
Figura 8. Prueba de la acidificación de la glucosa en las cepas B y C.....	53
Figura 9. Películas comestibles con el ingrediente probiótico <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12.....	65
Figura 10. Microscopía Electrónica de Barrido de las películas comestibles con el ingrediente probiótico <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12. Fig. 10 A, B y C, superficie de la película. Fig. 10 D, parte posterior de la película.....	68
Figura 11. Microscopía Electrónica de Barrido de las películas comestibles con el ingrediente probiótico <i>Bifidobacterium lactis</i>. Observación del canto de la película (corte transversal).....	69
Figura 12. Supervivencia del <i>Sitphilus oryzae</i> alimentados con películas comestibles a base de almidón de papa con y sin <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12.....	70
Figura 13. Variación de peso del <i>Sitphilus oryzae</i> alimentados con películas comestibles a base de almidón de papa con y sin <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12.....	73

Figura 14. Porcentaje de agua corporal en gorgojos de arroz alimentados con diferentes dietas. PSB: películas sin Bífidos; PCB: películas con *Bifidobacterium lactis* Bb12.....75

Figura 15. Porcentaje de grasa corporal en gorgojos de arroz alimentados con diferentes dietas. PSB: películas sin Bífidos; PCB: películas con *Bifidobacterium lactis* Bb12.....77

Figura 16. Porcentaje de nitrógeno proteico en gorgojos de arroz alimentados con diferentes dietas. PSB: películas sin Bífidos; PCB: películas con *Bifidobacterium lactis* Bb12..... 79

Figura 17. Viabilidad de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 en la película comestible a base de almidón de papa. A: ensayo 1; B: ensayo 2..... 83

Figura 18. Transferencia de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 de la película comestible a base de almidón de papa al tracto digestivo del gorgojo de arroz. Las flechas indican el cambio de dieta. PSB= películas sin bífidos; PCB= películas con bífidos; A= experimento 1; B= experimento 2.....85

Figura 19. Variación porcentual de la composición corporal en gorgojos alimentados con películas con bífidos (PCB) y con películas sin bífidos (PSB). NC= Nitrógeno cuticular; NP= Nitrógeno proteico. La línea cero, representa los niveles basales de los parámetros corporales, al día 0 o los niveles basales de los gorgojos alimentados con PCB,al día 4.....88

Figura 20. Variación porcentual de la composición corporal en gorgojos alimentados con películas sin bífidos (PSB) y con películas con bífidos (PSB). NC= Nitrógeno Cuticular; NP= Nitrógeno Proteico. La línea cero, representa los niveles basales de los parámetros corporales del día 0 o los niveles basales de los gorgojos alimentados con PSB al día 4.....89

Figura 21 Intestino medio del *Sitophilus oryzae*; Mi; microvellosidades, L; lumen intestinal, A; alimento, CR; células regenerativas Gg; gotas de grasa; CG; ciego gástrico, E; epitelio; ML; músculo longitudinal.....92

Figura 22. Parte del intestino medio del *Sitophilus oryzae*; Mi; microvellosidades, L; lumen intestinal, CG; ciego gástrico, lo que está encerrado en círculos es parte del alimento disgregado por enzimas.....93

Figura 23. A. Ciego gástrico del intestino medio de *Sitophilus oryzae*, con presuntos bacteriomas que contienen bacilos, cocos y otros microorganismos. B. Micrografías del intestino medio hormigas en donde se presentan concentraciones de microorganismos. Caetano (2009).....94

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las especies forman comunidades complejas debido a las interacciones que se presentan entre ellas en un ambiente determinado, a estas interacciones se les denomina simbiosis. La primera definición fue dada por Antón de Bary en 1879; se trata de una o más especies que viven permanentemente en una estrecha asociación, durante al menos una parte de su ciclo de vida, ya sea con la coexistencia de un individuo sobre otro o uno dentro del otro. (Gil y col., 2004).

Existen dos tipos: ectosimbiosis, donde el simbiote vive sobre el cuerpo en el exterior del hospedador e inclusive puede estar en el interior de la superficie del recambio digestivo y el endosimbiote que habita en el espacio intracelular del anfitrión. (Margulis, 1986).

Dentro de la simbiosis, existen diversas formas de interacción, siendo la más relevante en esta investigación el mutualismo, fundamental para el incremento de la supervivencia entre las especies involucradas.

Un ejemplo de ellos puede ser la relación evolutiva que presentan insectos y bacterias como es el caso de los Isopteras (termitas), donde las bacterias que están en el tracto digestivo del insecto son capaces de degradar la lignocelulosa, parte estructural de la madera, aportando al hospedador elementos como el carbono y nitrógeno, los cuales son esenciales para la síntesis de aminoácidos, vitaminas y esteroides. (Brune, 2003).

Los insectos representan un modelo apto para el estudio de las relaciones simbióticas-mutualistas, debido a su gran diversidad, siendo la mayor de todos los invertebrados, y a su gran tolerancia a organismos foráneos que les permite coexistir con muchos microorganismos diferentes. (Dale, 2003).

Se han realizado estudios microbiológicos, microscópicos y moleculares, para clasificar a los simbioses que están presentes en los insectos, pudiendo llegar a una caracterización fundamentada, tanto en la edad evolutiva evidente como el grado obligado de codependencia entre el anfitrión y el simbiote. (Werren, 1997)

Existen dos tipos de transferencias por las cuales las bacterias pueden invadir y permanecer en el interior de los insectos. La primera, tipo vertical, por vía materna, en donde se presenta una coevolución específica con poblaciones de células del anfitrión, durante la colonización de la progenie y el desarrollo temprano del anfitrión. (Dale y col., 2003). Estas bacterias han tenido una adaptación tal, que ellas tienen poco o ningún impacto negativo sobre la salud total del anfitrión y es conocido como simbiote primario. (Finlay y col., 1997)

El simbiote secundario puede colonizar anfitriones ingenuos por la transmisión horizontal entre individuos de la misma especie. Estas asociaciones son típicamente facultativas desde la perspectiva del anfitrión, ellos pueden verse perjudicados o beneficiados dependiendo de la tolerancia hacia la bacteria. Estos simbioses deben persistir y extenderse dentro de las poblaciones del hospedero y los organismos que presentan el simbiote, poseen una ventaja sobre los no infectados. En algunos casos, esta ventaja proviene de efectos beneficiosos sobre la supervivencia del anfitrión, esto se traduce en mayor porcentaje reproductivo, protección del hospedero contra otros parásitos, entre otros. (Moran y col., 2005; Oliver y col., 2003; Scarborough y col., 2005)

En el coleóptero *Sitophilus oryzae*, se han aislado dos clases de simbioses, uno de ellos caracterizado como endosimbiote obligatorio, conocido como *Wolbachia*, que se aloja en el aparato reproductor de la hembra produciendo inducción en la

partenogénesis, elimina selectivamente a los embriones machos, favoreciendo el desarrollo de embriones hembra en una población. (Raverdy y col., 2008). Por otra parte, dicho insecto presenta una asociación simbiótica facultativa con una *Enterobacteriaceae*, esta simbiosis ha sido investigada por más de 70 años. Se ha demostrado que esta bacteria le aporta al *S. oryzae* las vitaminas: riboflavinas, ácido pantoténico y biotina. También actúa en la fosforilación oxidativa aumentando la actividad enzimática mitocondrial, mejorando enormemente la capacidad de vuelo en los insectos adultos. Este aumento en la fosforilación oxidativa, también actúa sobre el metabolismo de los aminoácidos. (Heddi y col., 1993)

Los simbioses proporcionan a los insectos una amplia variedad de beneficios, donde más del 50% tiene que ver con la parte nutricional, hecho que se manifiesta, por la presencia de estos microorganismos en el tracto digestivo de estos invertebrados. (Grijalva y col., 2006, Brune y col., 2003, Lo y col., 2007).

En la nutrición humana se han desarrollado diferentes alternativas, para mantener en condiciones óptimas, la composición de la microbiota, que promueve la asimilación de ciertos nutrientes ingeridos. Una de ellas es el uso de probióticos, estos se definen como, un conjunto de microorganismos que actúan como una parte esencial en el mantenimiento de la salud del huésped humano (Barrio, 2006). El más utilizado hasta ahora es la *Bifidobacterium* (Cagigas y Blanco, 2002) y las ventajas potenciales de dichas bacterias como probiótico, están relacionadas en particular a los efectos benéficos en el intestino de mamíferos: antimicrobianos (Gibson y Wang, 1994; Misra y Kuila, 1995); de inmunomodulación (Amster y col., 1994) y de modulación de la microbiota. (Glen, 1999).

Dentro de este contexto, resulta prometedor estudiar la factibilidad de algunos materiales que se emplean como empaques, coberturas comestibles o películas que son utilizados como vehículos de vitaminas, minerales y Bifidobacterias. La transferencia de estas bacterias al intestino del hombre o en modelos nutricionales como mamíferos es un hecho que ya ha sido estudiado. Sin embargo, en insectos la transferencia de dicha bacterias al intestino del animal, es un campo que recientemente se ha comenzado a explorar, (Rojas, 2007 y Ortiz, 2010) ya que, los insectos representan un modelo sencillo y económico en cuanto a su mantenimiento, mostrando resultados en corto tiempo para dar explicación a diversos procesos biológicos.

En el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental, se ha dedicado a la búsqueda de modelos biológicos para estudios nutricionales, en este caso, el uso del coleóptero *Sitophilus oryzae*, comúnmente conocido como el gorgojo del arroz, constituye una opción económica y novedosa. El bioensayo con este insecto es ventajoso, debido a que se trabaja con poblaciones de insectos que tienen una emergencia alta en corto tiempo, esto le resta variabilidad a los resultados a la hora de aplicar la estadística, además que son económicos en cuanto a su mantenimiento (Carmona y col., 1998). Otra ventaja fisiológica que debe considerarse en este trabajo, es la diferenciación que presenta su tracto digestivo, lo que permitiría una buena localización de los microorganismos identificados, pertenecientes a la microbiota del insecto y a los transferidos.

Debido a la versatilidad que presenta el bioensayo del gorgojo de arroz, en este trabajo se evaluó la transferencia de la *Bifidobacterium lactis* Bb12 (microorganismo probiótico en humanos) al tracto digestivo del gorgojo de arroz alimentado con películas comestibles con el ingrediente probiótico y se dará continuidad al trabajo

realizado por Rojas (2007), quien estudió el efecto que tiene las películas comestibles con y sin probióticos sobre la supervivencia, variación de peso y composición corporal (agua, grasa y nitrógeno).

Es por esto que el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo en conjunto con el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos del Instituto de Biología Experimental (IBE) se propone la identificación de las bacterias presentes en el tracto digestivo del gorgojo del arroz. Asimismo, en colaboración con el Laboratorio de Nuevas Tecnologías del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) se realizó películas comestibles de almidón de papa las cuales fueron empleadas como vehículo de transferencia de la *Bifidobacterium lactis* Bb12 al tracto digestivo del gorgojo del arroz.

2. ANTECEDENTES

2.1 Insectos

El alimento de los insectos se compone de una gran variedad de materiales orgánicos, alrededor del 75% de las especies son fitófagos, lo que indica que son consumidores primarios de la materia vegetal que aporta gran cantidad de energía, el 25% restante pueden ser carnívoros, omnívoros o parasitan otros animales. Los insectos son de gran importancia para los seres humanos, ya que éstos pueden comportarse como plagas causando daños en siembras de granos, cereales y diversos alimentos, afectando directamente la salud de las personas, y por otro lado, pueden ser extremadamente beneficiosos, actuando como polinizadores de plantas, y son utilizados como modelos biológicos, manteniendo a las poblaciones en cultivos, que permiten por ejemplo, hacer investigaciones bioquímicas en el campo de la absorción y digestión de nutrientes específicos, entre otros aspectos metabólicos. (Gillott, 2005).

2.2 *Sitophilus oryzae*

También conocido como el gorgojo de arroz, es un insecto que pertenece al orden coleóptera, familia Curculionidae (figura 1). La apariencia que muestra este insecto es la de una cabeza provista de una trompa larga con antenas acodadas en forma de maza. El protórax está densamente cubierto de depresiones circulares. Tiene alas acorazadas y apergaminadas. El adulto mide de 2,5 a 3,5 mm y el color varía de café a negro. Los élitros presentan cuatro manchas de color amarillento. (Cubillos, 1983).

El gorgojo de arroz presenta una metamorfosis completa llamada holometábola, pasando por cuatro fases o estadios, los cuales son huevo, larva carente de patas, una pupa inmóvil y adulto. En cuanto a su ciclo reproductivo las hembras horadan el grano y depositan en cada diminuta perforación un huevecillo que posteriormente es cubierto



Figura 1. Imagen del Coleóptero *Sitophilus oryzae*

<http://www.biolib.cz/en/image/id32232/> [Consulta: 09 de octubre de 2009]

con una secreción, por lo que su presencia pasa inadvertida. Cada hembra, deposita de 300 a 400 huevos que tardan entre 4 y 6 semanas en transformarse en adultos o imago. El adulto vive de 4 a 5 meses. La hembra alcanza su máxima actividad de ovoposición después de 3 semanas de haber emergido. (Cubillos, 1983).

2.3 Tracto digestivo

El tracto digestivo de los insectos ha sido de gran importancia para los científicos ya que este representa la mayor superficie de contacto con el medio ambiente (Terra y Ferreira, 1994; 2005). Por otra parte, la habilidad que presentan los insectos para alimentarse, viene acompañada de diversas estructuras bucales externas e internas, que sirven para ingerir pequeños trozos de alimento y degradarlo en su interior. Las estructuras presentes en el tracto digestivo (figura 2), se especializan dependiendo de la dieta que consuma el insecto (Klowden, 2007). Es decir, no cambian la función, sino la forma y el tamaño de las partes que conforma el tracto digestivo, dependiendo del alimento. Por ejemplo, el buche puede ser más grande o más pequeño, el intestino medio puede ser más largo, entre otros cambios.

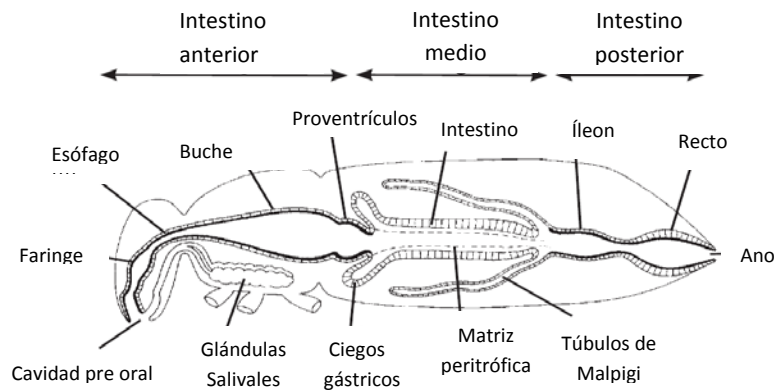


Figura 2. Representación del tracto intestinal de insectos. Tomado del Klowden, 2007.

2.3.1 Intestino anterior

El intestino anterior se forma durante la embriogénesis por invaginación del tegumento, está revestido de cutícula que posee ciclos de muda y regeneración. El intestino está conformado por células epidérmicas que están ancladas al músculo longitudinal y al músculo circular, unido por tejido conectivo. (Gillott, 2005). Este se diferencia internamente por faringe, esófago, buche y proventrículos (figura 2).

En la faringe se encuentran músculos dilatadores. El esófago usualmente es estrecho pero posteriormente puede dilatarse por la reserva de alimento que se almacena en el buche, en este momento, una vez que el alimento esté dentro del tracto digestivo, se comienza a degradar por las enzimas predigestivas que contienen las glándulas salivares, además de las que se regurgitan desde el intestino medio. (Vonk, 1984).

En la región posterior del intestino anterior se encuentra el proventriculo, que sirve como válvula de regulación que controla la velocidad con que penetra el alimento predigerido separando a los componentes líquidos y los materiales sólidos (Chapman, 1995). Estos materiales se ven empujados al intestino medio por los movimientos peristálticos que realizan las células del músculo longitudinal y circular. Posteriormente

el intestino anterior es ligeramente invaginado. Su función es asegurar el alimento incorporándolo en su interior. (Klowden, 2007).

2.3.2 Intestino medio

El intestino medio es de origen endodérmico y no presenta cutícula. Sin embargo, está revestido con la membrana peritrófica. La cual, está compuesta por proteínas ancladas que conforman una malla que contienen microfibrillas. La función de la membrana peritrófica es proteger el epitelio del intestino medio de daños mecánicos (Lehane, 1997), también evita la entrada de microorganismos que desechan toxinas u otros compuestos químicos dentro de la cavidad del cuerpo. Además la membrana peritrófica permite una compartimentación que a su vez está dividida en espacios endoperitrófico y ectoperitrófico (Terra, 1996; Lehane, 1997). La separación de los epitelios, proporciona una mejor eficiencia para segregar enzimas entre dichos espacios, permitiendo que algunas enzimas sean recicladas. (Lehane, 1997).

Las microvellosidades, que van desde las células del cardia hasta el final del intestino medio, confieren permeabilidad a los nutrientes, una vez digeridos por las enzimas digestivas. Sin embargo, esta permeabilidad es solo para moléculas pequeñas, puesto que las proteínas y los polisacáridos no son filtrados por la membrana peritrófica. (Richards y Richards, 1977; Lehane, 1997).

De hecho, las peptidasas, lipasas y carbohidrasas secretadas en el intestino medio, rompen las moléculas pre-digeridas que están almacenadas en el buche. Por tanto, la función del intestino medio es la absorción y la secreción de enzimas que sirven para la digestión de los componentes básicos de las macromoléculas, como son: aminoácidos, ácidos grasos, dímeros monómeros de glucosa. (Terra y Ferreira, 2003).

El intestino medio no presenta una diferenciación estructural desde su desarrollo, por tal razón, esto incrementa el área de superficie viable de secreción de enzimas y absorción del material digerido. La región anterior puede contener divertículos llamados ciegos gástricos, éstos aumentan la superficie del intestino medio para la absorción y crean un flujo contracorriente como consecuencia de su absorción diferencial del agua (Barbehenn, 2004). Como el agua es secretada en el lumen del intestino medio posterior, esta avanza para ser reabsorbida en la región cecal, permitiendo a los productos de la digestión pasar por él mientras que los sólidos no son digeridos. Los ciegos gástricos pueden estar asociados con mecanismos detoxificantes, permitiendo al insecto ingerir alimentos de plantas que contienen compuestos potencialmente tóxicos provenientes de su metabolismo secundario. (Klowden, 2007).

2.3.3 Intestino posterior

El intestino posterior es un derivado del ectodermo y como tal se encuentra revestido por cutícula, aunque ésta sea más delgada que en el intestino anterior. Las células epiteliales que rodean la cutícula son aplanadas en las almohadillas rectales de forma de columna, presentando abundantes mitocondrias y los músculos están débilmente desarrollados (Lang, 1999). Su función está asociada con la absorción de nutrientes. (Azuma, 1991).

Existen tres regiones bien definidas en el intestino posterior: píloro, íleon, y recto (figura 2). El píloro puede tener una capa de músculo circular bien desarrollada y regula el movimiento del material del intestino medio al intestino posterior. El íleon es generalmente un tubo estrecho que sirve para conducir el alimento no digerido al recto para el tratamiento final de la digestión. En algunos insectos, se produce la absorción de iones y/o agua en el íleon. En esta región se encuentran los túbulos de Malpigi, los

cuales representan la estructura de osmorregulación en el insecto que produce una orina primaria isosmótica que es rica en potasio, bajo en sodio, contiene otros iones, aminoácidos y materiales superfluos. (Terra, 1996).

El recto se encuentra en la parte posterior del intestino, con frecuencia se dilata, está conformada de una pared delgada, e incluye de seis a ocho almohadillas rectales gruesas y amuralladas, cuya función es absorber iones, agua y pequeñas moléculas orgánicas. (Azuma, 1991).

El intestino posterior es capaz de realizar una reabsorción selectiva de los aminoácidos, agua e iones para producir una orina hiperosmótica, por consiguiente, el excremento de los insectos terrestres es expulsado como desechos semisecos por el ano. (Terra, 2005).

2.3.4. Bacterias presentes en el tracto digestivo de los insectos

Generalmente los microorganismos habitan el tracto digestivo de los insectos; encontrándose unos pocos en el intestino medio, hasta encontrar mayor concentración y variabilidad de especies en el intestino posterior. (Klowden, 2007). Se pueden ubicar en diferentes regiones del intestino posterior, ya sea, adosados en el epitelio del intestino mediante receptores de anclaje con las células epiteliales del proctodermo, como también, pueden estar libres en el lumen intestinal. Igualmente, se pueden ubicar dentro de una estructura celular, como células del epitelio o dentro de protozoarios que formen parte de la microbiota del insecto, así como en el epitelio del mismo. (Brune, 2003).

Entre las bacterias y los insectos se considera que existe una relación simbiótica, ya que el microorganismo le proporciona al insecto un beneficio metabólico, aportando enzimas y vitaminas que le brindan eficiencia nutricional al hospedador. Como por

ejemplo, las termitas y escarabajos, insectos que se alimentan de madera, éstos tienen la capacidad de dilatar el íleon (intestino posterior) y forman una masa fermentada de partículas de madera, en donde se almacenan las bacterias que degradan metabólicamente lo que el insecto no puede. (Breznak, 1994). En las termitas encontramos la bacteria llamada *Actinomycetes*, que ejerce un papel metabólico rompiendo las cadenas de lignina y celulosa proveniente de la madera. (Brune y col., 2003).

En áfidos se encuentra la bacteria *Buchnera* ubicada en el intestino medio, cuya función es proporcionar los aminoácidos esenciales al insecto y la degradación de carbohidratos. Por otro lado también presenta en el intestino posterior a la bacteria *Hamiltonella* que ofrece una protección al intestino de parásitos. (Vissotto y col., 2008). Asimismo, la mosca TseTse presenta dos bacterias *Wigglesworthia glossinidia* y *Sodalis glossinidius*, la primera se encuentra en el intestino medio y le aporta al díptero nutrientes y cofactores, y la segunda bacteria, defiende al hospedero de parasitoides. (Grijalva y col., 2006). En el *Sitophilus oryzae*, se han reportado *Enterobacteriaceae* que cumplen diferentes funciones; aporte de fuente de vitaminas al insecto como la riboflavina, ácido pantoténico y biotina, además altera el balance metabólico de los aminoácidos, la fosforilación oxidativa y afecta la habilidad del vuelo. (Thompson y col., 2003).

2.4 Generalidades sobre las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares, disponen de una pared celular que rodea su membrana citoplasmática. Dichas paredes bacterianas están hechas de peptidoglucano, esta sustancia está compuesta por cadenas de polisacáridos enlazadas por péptidos. (Van Heijenoort, 2001). Existen dos diferentes tipos, Gram+ y Gram-.

Estos nombres provienen de la reacción de la pared celular a la tinción de Gram, un método tradicionalmente empleado para la clasificación de las especies bacterianas. (Gram, 1884). Las bacterias Gram+, tienen una pared celular gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglucano en las que se inserta el ácido teicoico. En cambio, las bacterias Gram-, tienen una pared relativamente fina, consistente en unas pocas capas de peptidoglucano, rodeada por una segunda membrana lipídica (la membrana externa) que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. (Engelhardt, 1998).

A diferencia de los organismos superiores, las bacterias presentan una gran variedad de metabolitos. (Nealson, 1999). La distribución de estos metabolitos dentro de un grupo de bacterias se ha utilizado tradicionalmente para definir su taxonomía. Sin embargo, esta clasificación no se corresponde a la definida por las técnicas moleculares. (Xu, 2006).

El metabolismo bacteriano se clasifica en base a tres criterios importantes: el origen del carbono, la fuente de energía y los donadores de electrones. Un criterio adicional para clasificar a los microorganismos que respiran es el receptor de electrones usado en la respiración. (Zillig, 1991).

Dependiendo de la fuente de carbono, las bacterias se pueden clasificar como: heterótrofas; cuando usan compuestos orgánicos. Por otro lado, están las autótrofas, cuando el carbono celular se obtiene mediante la fijación del dióxido de carbono. Las bacterias autótrofas típicas son las cianobacterias fotosintéticas, las bacterias verdes del azufre y algunas bacterias púrpura. Pero hay también muchas otras especies quimiolitótrofas, por ejemplo, las bacterias nitrificantes y oxidantes del azufre (Hellingwerf y col., 1994). Según los donadores de electrones, las bacterias también se

pueden clasificar como: litótrofas; si utilizan como donadores de electrones compuestos inorgánicos (CO₂), organótrofas; si utilizan como donadores de electrones compuestos orgánicos (carbono). (Zillig, 1991).

Por último, existe una clasificación por fuente de energía utilizada y las bacterias pueden ser fotótrofas, cuando emplean la luz a través de la fotosíntesis y quimiótrofas, cuando obtienen energía a partir de sustancias químicas que son oxidadas principalmente a expensas del oxígeno (respiración aerobia) o de otros receptores de electrones alternativos (respiración anaerobia). (Siunov y col., 1999).

2.4.1 Bacterias aerobias

Se define como un microorganismo que tiene la capacidad de crecer en presencia de oxígeno, un ejemplo de ello es el crecimiento sobre un medio de cultivo o sustrato que este en contacto con el aire. El término comúnmente es reservado para aquellos organismos que, en la naturaleza, normalmente crecen en hábitats aeróbicos; algunos aerobios también pueden crecer en condiciones anaerobias y son llamados anaerobios facultativos. (Singleton y col., 2006).

2.4.2 Bacterias anaerobias

El reconocimiento de la naturaleza anaerobia de determinados microorganismos se acredita a Pasteur, quien en 1863 observó que la motilidad de ciertas bacterias desaparecía con la exposición al aire. El conocimiento sobre las bacterias anaerobias es relativamente reciente, ya que para poder lograr condiciones de anaerobiosis en el laboratorio se necesitaban equipos costosos y técnicas bacteriológicas muy dificultosas. A partir de los años 60, se comienza a introducir sistemas simples para producir anaerobiosis con equipos y reactivos de bajo costo y de allí en adelante, el conocimiento de los anaerobios se desarrolló intensamente. (Rivas y Mota, 2006).

Las bacterias anaerobias se definen como aquellas que para crecer en la superficie de un medio de cultivo necesitan una atmósfera sin oxígeno, ya que este elemento es tóxico para ellas. Con este concepto se puede inferir que existe un amplio abanico de microorganismos, desde los muy tolerantes y resistentes hasta los extremadamente lábiles a este gas. (Alcalá, 2004).

El hábitat de las bacterias anaerobias está limitado a zonas corporales de los mamíferos donde la tensión de oxígeno es baja. (Kandler, 1986). Forman parte de la microbiota normal como comensales y mutualistas, jugando un papel importante en la resistencia inespecífica a la infección. Son particularmente frecuentes en la boca, en las vías respiratorias altas, vagina e intestino, en especial en el colon, recto y en las heces, donde superan a los aerobios y a los microorganismos facultativos. (Alcalá, 2004). Estos en general poseen un metabolismo de tipo fermentativo, es decir, es un proceso de oxidación incompleta, donde el producto final es un compuesto orgánico, que al reducirse será el receptor final de electrones. Las características comunes a los microorganismos anaerobios son sus requerimientos nutricionales complejos, su lento crecimiento y su labilidad, lo cual, sumado a sus requerimientos atmosféricos estrictos (de O_2 y CO_2) hace que su aislamiento sea difícil. (Zumft, 1997).

En humanos, las bacterias se encuentran en mayor concentración en el colon, estimando unas 500 especies que realizan procesos fermentativos. (Felis, 2004). Además, la mayoría de los carbohidratos que entran en el colon son fermentados y disponibilidad de carbohidratos decrece y las proteínas y aminoácidos se convierten en la principal fuente de energía metabólica para las bacterias. (Macfarlane, 1992).

Los alimentos ricos en fibra dietética incluyen vegetales, frutas, cereales, granos y legumbres. La fibra alimentaria muestra diferentes grados de solubilidad. Algunas como las pectinas, hemicelulosa, inulina forman geles en el tracto intestinal, esto facilita a su fermentación, ya que aumenta el área superficial disponible para el ataque enzimático. (Spratto, 2006). Ejemplos de compuestos reducidos producto de la fermentación son; el lactato (en la fermentación láctica), etanol (en la fermentación alcohólica), hidrógeno, butirato, etc. La fermentación es posible porque el contenido de energía de los sustratos es mayor que el de los productos, lo que permite que los organismos sinteticen ATP y mantengan activo su metabolismo. (Drake y col., 1997). El proceso de fermentación presenta ciertas ventajas a causa de los productos finales, como son los ácidos grasos de cadena corta, que disminuyen el pH del colon, estos valores impiden el crecimiento de ciertas especies de bacterias patógenas. Al igual que el proceso de fermentación, las bifidobacterias y otras bacterias ácido lácticas promueven el control de especies bacterianas patógenas, disminuyendo el pH. Por lo tanto, la ingesta de fibra dietética y la presencia de probióticos, facilitan la excreción de carcinógenos. (Wollowski, 2001).

2.4.3 Las bifidobacterias como probióticos

Elie Metchnikoff es considerado como el padre de los probióticos, él observó que en las poblaciones de campesinos búlgaros, el consumo regular de bacteria ácido-láctica en productos lácteos fermentados, como el yogur, se asociaba con la salud y la longevidad de dichas poblaciones. Metchnikoff trabajó con *Bulgarian bacillus* que fue descubierto por un médico búlgaro Stamen Grigorov, manifestando que la bacteria en el yogur al ser consumida ayudaba al tránsito intestinal y mejoraba el sistema inmunológico. Más tarde, Metchnikoff publica en 1907 "la prolongación de vida",

donde se resaltan los beneficios que proporciona la bacteria ácido-láctica (Kingsley, 2007).

La versión científicamente válida y más usada hasta ahora es que un probiótico, es un suplemento vivo microbiano que se encuentra en los alimentos que presenta efectos benéficos en el hospedador humano, promoviendo el balance intestinal microbiano (Fuller, 1992). Las bacterias probióticas han sido el foco de interés científico y comercial, por la gama de efectos positivos en la salud que ofrecen estas bacterias, desde el estímulo del sistema inmune, control del colesterol, hasta la posible prevención del cáncer colo-rectal. (Elmer y col., 1996). Entre los probióticos más utilizados se encuentran los lactobacilos y las bifidobacterias.

Las bifidobacterias fueron aisladas por primera vez en 1899 de un infante sano alimentado con leche materna por Tissier del Instituto de Pasteur en Francia. Es uno de los microorganismos más importantes del tubo digestivo y están asociados con el estado sano de las personas. (Bartram, 1994). Estas bacterias comprenden el grupo principal de bacterias sacarolíticas presentes en el colon, y representan más del 10% de la población total en intestino en el hombre adulto y 95% en recién nacidos. (Kawaze y col., 1981).

Morfológicamente eran consideradas como un bacilo, ellas pueden presentarse solas o en cadenas de muchos elementos, en agregados formando una estrella o en forma de V o bifurcadas como una Y. Gracias a las técnicas moleculares, se ha podido determinar el alto contenido de guanina + citocina en su ADN, y sobre la base de la secuencia del ADNr 16S se la ha colocado en la familia *Actinomycetaceae* (Mitsouka y Kaneuchi, 1977; Mitsuoka, 1984; Matsuki y col., 1999). Esta familia está compuesto por 5 géneros: *Actinomices*, *Arachnia*, *Bifidobacterium*, *Bacterionema* y *Rothia*. Ella se

caracteriza por poseer células alargadas que tienden a formar filamentos ramificados, a veces con micelio y esporas verdaderas.

Las bifidobacterias son estrictamente anaeróbicas, sin embargo, la sensibilidad al oxígeno varía notablemente entre cepas y especies. Esta variación puede deberse a que en condiciones aerobias, tienden a acumular peróxido de hidrógeno, el cual es reducido por un sistema NADH peroxidasa, que varía dependiendo de la cepa. Como producto de la utilización de los carbohidratos se forman ácido acético y ácido láctico en una relación molar de 3:2. (Ishibashi, 1997, Vasiljevic y Shah, 2008). Asimismo, son bacterias Gram+, no producen gas, no forman esporas, no son móviles y son catalasa negativa.

Actualmente se conocen, aproximadamente 30 especies de *Bifidobacterium*, las que habitan el tubo digestivo humano son distintas de aquellas presentes en el intestino de otros mamíferos (Mitsuoka, 1984). La razón de esta especificidad de anfitrión es desconocida, pero se sospecha que es debido a diferencias en la estructuras del epitelio, alimentación, metabolismo, entre otros (Yaeshima y col., 1996). Las especies de bífidos de origen humano incluyen a: *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* y *B. seudocatenulatum*; y algunas especies aisladas en otros animales son: *B. pseudolongum*, *B. thermophilus* y *B. animalis*.

Ahora bien, los probióticos deben cumplir ciertos parámetros *in vitro* como: ejercer un efecto beneficioso sobre el anfitrión, no ser patógenos ni tóxicos, contener un gran número de células viables, ser capaz de sobrevivir al metabolismo en el intestino, permanecer viable durante el almacenaje y el empleo. Por otro lado, *in vivo* debe competir con microbios patógenos, tener actividad bactericida frente a otros patógenos y modificar el balance bacteriano del colon hacia la composición más favorable

(Macfarlane y col., 2007). Se ha demostrado que el consumo de bifidobacterias (10^{10} - 10^{11} UFC/d) acortó la fase diarreica en un promedio de 3,5 a 2,5 días en niños hospitalizados, aumentando la concentración de anticuerpos IgA, los cuales contrarrestan el rotavirus en niños. (Saavedra y col., 1994).

Diversos autores han estudiado los efectos potencialmente positivos en la salud de los seres humanos que promueven las Bifidobacterias, estos son resumidos a continuación:

- a. Producen ácidos como productos finales (acetato, lactato). Estos bajan el pH del medio y así puede ejercer un efecto antibacteriano. (Kawase, 1982; Rasic, 1983). Estos trabajos indican, que estas bacterias son capaces de excretar acetato y lactato, productos inhibitorios para una amplia gama de bacterias Gram+ y Gram- patógenas, que pueden encontrarse en el intestino. (Gibson y Wang 1994).
- b. Un efecto añadido de la producción de ácidos, es la protonación de amoníaco potencialmente tóxico (y aminos), para producir NH_4^+ , que no es difusible y se encuentra en niveles bajos en sangre. (Hansen, 1985). Además, esta bacteria no forma aminos alifáticos, sulfuro de hidrógeno o nitritos. (Bezkorovainy y col., 1989).
- c. Producen vitaminas, en gran parte las del complejo B. (Nishizawa, 1960, Liescher, 1961), así como enzimas digestivas como la caseína fosfatasa. (Kawase 1982, Minagawa, 1970).
- d. Ciertos componentes celulares de las bifidobacteria son inmunomoduladores, promueven el ataque inmunológico contra células malignas. (Mizutani y Mitsuoka, 1980, Sekine y col., 1985). Esta activación del sistema inmunológico también le provee resistencia al hospedero para atenuar la concentración de patógenos.
- e. Estas bacterias presentan un efecto terapéutico en los procesos fisiológicos del trato digestivo y en el metabolismo, uno de ellos es el acondicionamiento intestinal, la acción es un efecto total de mejorar el

entorno intestinal, que incluye la mejora de la microbiota, inhibición en la producción de sustancias intestinales putrefactas, y mejora de las propiedades y estado de defecación (alivio de estreñimiento o diarrea). (Korshunov y col., 1985, Araya-Kojima y col., 1995).

Las bifidobacterias comestibles se comenzaron a utilizar en Alemania desde una larga data (Mayer, 1948) y activamente fue adoptado en Japón a principios de los años 1980. (Ishibashi, 1993). Más tarde fue extendido a Europa y ahora es usado por todo el mundo. (Tamime y col., 1995). De hecho, se han incluido en alimentos para humanos como yogures y la leche no fermentada. (Modler y col., 1990). La ingesta de estas bacterias a través de los alimentos, favorecen su viabilidad durante el recorrido en el tránsito gastrointestinal hasta alcanzar el colon, donde las condiciones fisicoquímicas son óptimas para su colonización. Por otra parte, también se utilizan en alimentos para animales y en la industria farmacéutica.

2.5 Película Comestible

Una película comestible es una capa delgada de material comestible (proteínas, polisacáridos, hidrocoloides o lípidos) empleada en los alimentos para ofrecer una barrera de protección y selección contra la transmisión de gases, vapores y solutos; mientras que también ofrece protección mecánica. (Guilbert, 1988). La solución formadora de películas (SFP), se aplica sobre un alimento para formar una cobertura comestible. Si la SFP es vertida como una delgada capa en una placa o superficie plana, se habla en entonces de películas, las cuales pueden despegarse, y utilizarse como objeto de estudio para investigar sus propiedades físicas, mecánicas y nutricionales, como ente separado del material a recubrir. (Rojas, 2007).

La idea de utilizar películas comestibles para preservar por más tiempo los alimentos no es nueva, ella surge por imitación de la piel o concha de frutas y hortalizas

(Gennadios y col., 1991). Ejemplos de cubiertas comestibles lo constituyen las cubiertas de embutidos de carne y las de azúcar o chocolate para productos de pastelería (Guilbert, 1996). Reemplazando un empaque sintético convencional con polímeros biodegradables, reduciendo el uso de recursos no renovables y contribuye al reciclaje biológico (Gontard y col., 1993).

Un elemento importante en la preparación de las películas comestibles es la adición de plastificantes en la SFP, éstos se añaden en las películas para incrementar la flexibilidad, resistencia al corte y dureza, así como para reducir la quebrajosidad. Actúan disminuyendo las fuerzas intermoleculares en la cadena del polímero, produciendo una disminución en la fuerza de cohesión, en la tensión y en la temperatura de transición vítrea. El plastificante debe ser miscible con el polímero y de ser posible, soluble en el solvente. Las películas requieren una concentración de plastificante entre el 10 y el 60% (base seca) (Guilbert, 1996).

Otra característica que presentan las películas comestibles es que al emplearse como un empaque funcional, puede servir como vehículo de aditivos (antioxidantes, agentes antimicrobianos) que mejoren la calidad del producto, pudiendo prolongar aun más la vida útil del alimento (Krotchta, 1997). Asimismo, se utilizan como medio de transporte para microorganismos probióticos como las bifidobacterias (Tapia y col., 2007).

Uno de los materiales que se utiliza para la preparación de las películas comestibles es el almidón, éste es el mayor componente de las raíces y tubérculos como la papa, el cual constituye la mayor fuente energética de las plantas (Martín y Smith, 1995); sus gránulos tienen diferentes tamaños (diámetros entre 10 a 100 μm) y formas, dependiendo de la fuente biológica de donde provengan y son parcialmente semicristalinos e insolubles en agua a temperatura ambiente (Bello y col., 1998;

Vandeputte y Delcour, 2004). Su contenido de amilosa y amilopectina, temperatura de gelatinización, consistencia del gel y textura, comportamiento viscoso y propiedades térmicas, permite su utilización en la industria alimenticia como estabilizante, agente de relleno, adhesivo, ligante, enturbiante, formador de películas, estabilizante de espumas, agente de antienviejamiento de pan, gelificante, glaseante, humectante y espesante (Singh y col., 2005).

Esta macromolécula es un carbohidrato, que se caracteriza por obedecer a la fórmula empírica $C_n(H_2O)_n$. En realidad estas sustancias químicamente son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas constituidas por una o más unidades fundamentales (monosacáridos). Los carbohidratos constituyen, por volumen de producción y consumo, la parte más importante de la tecnología agroalimentaria; especialmente teniendo en cuenta que, comparados con grasas y lípidos, muchos carbohidatos requieren procesos de extracción y/o purificación (azúcar, almidón, jarabes, dextrinas) (Cheftel, 1976).

La preparación de la película comestible a base de almidón de papa consiste en calentar una solución de almidón en exceso de agua, proceso denominado gelatinización. Esto conlleva a la disrupción del orden de las moléculas en los gránulos a consecuencia del rompimiento de los puentes de hidrógeno entre las cadenas de poli-(1→4)- α -glucano que integran los cristales y, en menor proporción, entre las moléculas ubicadas en las regiones amorfas del gránulo, trayendo como consecuencia la formación de una suspensión constituida por gránulos hinchados con un esqueleto de amilopectina suspendido en una solución de amilosa amorfa. (Blanshard, 1987). Cuando se enfría el gránulo gelatinizado, se genera una red tridimensional de gránulos vestigiales

hinchados, embebidos en una suspensión de amilosa superenrollada, produciéndose la recristalización, este fenómeno se denomina retrogradación. (Kennedy y col., 1987).

Recientemente, se han reportado trabajos donde se valora la calidad de la película comestible. Pinotti (2004) realizó películas flexibles biodegradables a partir de almidón de maíz y quitosano; evaluando sus propiedades mecánicas y de barrera. Por difracción de rayos X se observó que la estructura desarrollada en las películas era muy estable; la microestructura se caracterizó además por microscopía electrónica de barrido observándose que las películas presentaban superficies suaves, homogéneas y compactas. También demostró que las películas compuestas de almidón y quitosano plastificadas con glicerol tuvieron valores de permeabilidad al vapor de agua bajos.

Famá y col. (2003) estudiaron el efecto de la presencia del sorbato (agente antimicrobiano) en las propiedades mecánicas de películas compuestas por soluciones de almidón de mandioca (yuca) y glicerol. Los resultados arrojaron que las películas sin sorbato muestran un quiebre en sus propiedades fisicoquímicas, en las películas con sorbato se puede apreciar un suave incremento en el almacenamiento y una disminución continua de la deformación.

Rojas (2007), realizó películas comestibles a base de almidón de papa, evaluando la transferencia de los bífidos contenidas en las películas al intestino de gorgojos de arroz. Demostrando que el almidón resulta un vehículo apropiado para la incorporación de los bífidos en la película y permite evaluar la capacidad de transporte de las bacterias al tracto digestivo de los coleópteros.

Ortiz (2010) evaluó la viabilidad de bifidobacterias en películas comestibles elaboradas con almidones de yuca, batata y plátano, concluyendo que las películas de

almidón de plátano sirven como medio de transferencia de las bacterias al tracto digestivo del gorgojo de arroz mediante el cultivo microbiológico de los insectos, encontrando bífidos viables.

2.6 Bioensayo con el gorgojo de arroz

Partiendo de la premisa, que todos los organismos heterótrofos consumen el mismo tipo de macromoléculas (carbohidratos, lípidos y proteínas), es decir, que poseen los mismos requerimientos nutricionales, hace posible, la utilización de modelos animales, para explicar el efecto que tienen los nutrientes sobre el metabolismo de los mismos. Aunque los insectos no son un modelo experimental clásico, proporcionan información valiosa sobre procesos bioquímicos; efectivamente, ellos han sido utilizados como modelo para estudiar el metabolismo de los lípidos (Canavoso y col., 2001).

Para que las biomoléculas complejas de la dieta, puedan ser asimiladas, deben ser hidrolizadas a sus bloques estructurales constituyentes. En consecuencia, los procesos digestivos de los animales se basan en la existencia de sistemas enzimáticos que catalizan reacciones similares. Desde el punto de vista nutricional los requerimientos de los insectos y animales superiores, incluyendo a los humanos, son semejantes. Igualmente, la digestión de los alimentos se realiza extracelularmente en el tracto digestivo, hacia donde se secretan proteasas, amilasas y lipasas (Carmona y col., 1998).

Desde la perspectiva más simple, la materia viva es el reflejo de los materiales que le sirven de nutrimento (Carmona y col., 2001). Estudiar los cambios de la composición corporal permite obtener una visión de los cambios metabólicos que se suceden en un individuo a causa de los tratamientos a los que se somete, en particular de los componentes más variables como el agua, grasa y nitrógeno proteico (Millán y col., 2007).

El uso del gorgojo de arroz (*Sithophilus oryzae*) como ensayo biológico para evaluar la eficiencia de utilización de diversos nutrientes, ha sido reportado por Carmona (1998 y 2001) y Laurentin y col., (2008). En estos trabajos se ha demostrado que los parámetros corporales (agua, grasa y nitrógeno) son una evidencia indirecta del metabolismo de los nutrientes ingeridos por el animal. Asimismo, la estimación del valor nutritivo de las proteínas, requiere del uso de otros biomarcadores como: cambios de actividad de algunas enzimas digestivas, la excreción de nitrógeno, el potencial reproductivo y el crecimiento de larvas de los insectos.

Lopez (1999) utilizó el gorgojo de arroz para medir la calidad de la proteína alimentaria, ensayando con diferentes dietas, preparadas con una dieta basal de almidón de maíz y suplementadas con proteínas (caseína, gelatina nutritiva, gluten de maíz y gelatina purificada) a diferentes concentraciones. Se determinó el efecto de estas proteínas sobre la supervivencia, la variación de peso, la composición corporal, la excreción de ácido úrico y la actividad de amilasas y proteasas del insecto. Los resultados demostraron que la caseína tenía la mayor calidad proteica, causando el aumento de peso en los insectos. Por otro lado, no se registró pérdida del nitrógeno proteico, como sucede al utilizar las otras dietas. También se demostró la importancia de la concentración del alimento ingerido, para obtener un balance nitrogenado positivo. Sugiriendo que para mantener este balance, la calidad y la cantidad de proteína son importantes.

En estudios sobre el efecto del etanol y de la dieta en *Tribolium castaneum*, se ha encontrado que la administración del etanol conduce a la disminución del porcentaje de agua y nitrógeno corporal, y al aumento del porcentaje de grasa (Millán, 2007). Además por su contenido calórico el etanol puede desplazar a los nutrientes causando

malnutrición, incluyendo deficiencias de folato, tiamina y otras vitaminas (Lieber, 2004).

Lovera (2008) realizó estudios sobre el etanol y su efecto sobre la composición corporal. Por su alto contenido calórico, el etanol puede desplazar los nutrientes causando malnutrición. Las dietas utilizadas en la investigación fueron: etanol, agar, almidón de maíz, Ne-nerina y Ensure. Los resultados obtenidos demostraron que la supervivencia y la variación de peso no parecieron ser buenos indicadores para evaluar el efecto del etanol sobre el gorgojo de arroz; sin embargo, el agua y la grasa, si resultaron ser excelentes biomarcadores. La dieta donde se verificaron los mejores efectos fue la de almidón de maíz al 10%, en donde hubo una disminución del agua y del nitrógeno proteico y un aumento de la grasa corporal por el efecto del etanol al 1%.

Rojas (2007) realizó estudios con el bioensayo del gorgojo de arroz, ensayando diversas dietas con películas comestibles a base de almidón de papa, gelano y alginato. Los biomarcadores evaluados fueron: la supervivencia, variación de peso y composición corporal. Los resultados observados, determinaron que la película a base de almidón de papa aumenta los niveles de grasa corporal en el gorgojo, lo cual es característico en las dietas ricas en carbohidratos y disminuye el nitrógeno proteico de forma atenuada.

2.7 Microscopía de transmisión para la identificación de bacterias en el tracto digestivo

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una herramienta de gran utilidad en microbiología, tanto para fines de diagnóstico como en la investigación de las relaciones entre los agentes patógenos y el huésped. La MET es particularmente valiosa en el diagnóstico de enfermedades víricas y a menudo proporciona una respuesta más rápida, que los métodos tradicionales de cultivo. (Taylor y col., 1994). Asimismo,

mediante la MET se ha podido diferenciar con éxito diferentes especies de protozoarios. Si bien la reacción en cadena de la polimerasa también es una prueba determinante en estos casos, a veces las contaminaciones cruzadas y el costo de los reactivos la hacen poco factible. Esto sugiere que la MET es una herramienta de diagnóstico apropiada en este campo y necesaria en muchos casos. (Cobo y col., 2003).

En bacteriología, también la MET resulta ser un instrumento valioso, fundamentalmente en lo que concierne a la determinación de los procesos por los cuales una bacteria entra a la célula y de su subsecuente destino intracelular. (Griffiths y col., 2001). La caracterización estructural de las bacterias, además, puede combinarse con inmunocitoquímica. (Beesley, 1985). Los estudios ultraestructurales de los microorganismos, tanto para diagnóstico como para investigación, se abordan utilizando dos de los métodos de procesamiento general para la MET, estos se realizan en este orden; la tinción negativa, la cual es una técnica fundamental para contrastar muestras particuladas. (Carrascosa y col., 1998). Esta se aplica al estudio de microorganismos (virus, bacterias, protozoarios), fragmentos celulares (membranas) y macromoléculas aisladas (proteínas). (Hayat, 1986). El segundo procesamiento se refiere a cortes ultrafinos, luego de teñir la muestra se procede a su fijación en glutaraldehído al 2% en “buffer” de fosfato, posfijadas en tetróxido de osmio al 1%, deshidratadas en escala creciente de alcoholes e incluidas en resinas sintéticas (Epon, Araldita, etc.). Los cortes ultrafinos obtenidos por ultramicrotomía son montados sobre grillas de 3 mm de diámetro, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados por MET. (Capron y col., 1990).

Mediante esta técnica Rost-Roszkowska (2007), observaron los cambios ultraestructurales del epitelio del intestino medio de la larva *Allacma fusca*, demostrando

que las células que tenían la capacidad de absorción, digestión y excreción fueron observadas desde su formación en el estado larval. Por otra parte, Ohlstein (2006) trabajó con adultos de *Drosophila*, estudiando la formación paso a paso de las células del intestino medio, donde se observó la formación de las células del enterocito, mostrando sus microvellosidades, diploidia y el músculo circular.

Ishibashi (1997) demostró la presencia de bifidobacterias en intestino de humanos (infantes y adultos). Asimismo, Perdigon y col en 2003, demostraron la influencia de las bifidobacterias en el sistema inmune del intestino en ratones, mediante micrografías de las células del epitelio del intestino de un pequeño ratón, y células a las que le fueron incubadas *B. animalis*, que mostraron alta actividad lisosomal. También se pudo observar dicha bacteria introduciéndose a través del intestino, previo a la administración oral, y la internalización de la bacteria en el epitelio, una vez que llega al microambiente apropiado en el intestino.

2.8 Microscopía Electrónica de Barrido para la observación de *Bifidobacterium lactis* Bb12 presentes en películas comestibles

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. (Zegarra 2011)

En general, la preparación de las muestras es sencilla y los requisitos que deben cumplirse son: fijación, deshidratación y secado; además, la superficie debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no en las muestras biológicas, por lo que éstas se recubren con una capa de carbón o de oro, según las condiciones en las que se trabaje la muestra y el objetivo del estudio, es decir, para ser analizadas y observadas mediante el microscopio. Antes de tratar las muestras se debe tomar en cuenta el material a ser observado y guiarse por los parámetros específicos para cada muestra. (Torres y col., 2002)

Ortiz (2010) realizó microscopía de barrido a películas comestibles a base de almidón de plátano para observar las características de algunas de las películas obtenidas, además de observar la presencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12.

Con base a las pruebas referidas en el texto anterior, se plantea la siguiente hipótesis: *si se alimenta al gorgojo de arroz con películas comestibles a base de almidón de papa formuladas con el ingrediente probiótico Bifidobacterium lactis Bb12, se logrará una transferencia de estas bacterias al tracto digestivo del insecto.*

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 (microorganismo probiótico en humanos) al tracto digestivo del gorgojo de arroz alimentado con películas comestibles con el suplemento probiótico.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Identificar los microorganismos aerobios y anaerobios presentes en el tracto digestivo del gorgojo de arroz, mediante técnicas de microbiología clásica.

- 3.2.2** Formular películas comestibles a base de almidón de papa con *B. lactis* Bb12 como ingrediente probiótico.
- 3.2.3** Evaluar el efecto de las películas formuladas sobre algunos biomarcadores como son la supervivencia, la variación de peso y la composición corporal del gorgojo de arroz.
- 3.2.4** Valorar con la película formulada con el ingrediente probiótico el contenido de proteína como indicador del aporte de biomasa, la viabilidad y transferencia de *B. lactis* Bb12 mediante recuento microbiológico en las películas y en el tracto digestivo del insecto.
- 3.2.5** Identificar la presencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 en el tracto digestivo del insecto, mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de gorgojo de arroz

Para el cultivo de *Sitophilus oryzae* se emplearon individuos adultos, los cuales se hicieron crecer en arvejas (*Pisum sativum*) peladas, contenidas en envases de vidrios con mallas, mantenidos a temperatura ambiente, humedad ambiental y al resguardo de la luz. Para cada experimento se utilizaron cohortes de individuos de aproximadamente la misma edad. Para ello, se infestaron lotes de 300 g de arvejas con 70 individuos. Luego de un mes, en donde se observó abundante material particulado en el fondo del frasco, se procedió a eliminar a los padres y se esperó la emergencia de la generación F₁, que ocurrió aproximadamente en 15 días.

4.2 Extracción, maceración y crecimiento bacteriano del tracto digestivo del *Sitophilus oryzae*

Una vez que se obtuvo la F₁, se tomaron 30 individuos por triplicado tanto para la siembra en aerobiosis, como en anaerobiosis. Los insectos se lavaron con NaClO al 3%, durante 5 min para eliminar agentes contaminantes de su exoesqueleto. El exceso de NaClO, fue removido con agua destilada estéril. Después de lavar a los insectos, se colocaron en una placa de Petri que contenía gotas de agua destilada estéril para evitar la desecación del intestino. Bajo un microscopio estereoscópico binocular (10X), se colocó al insecto horizontalmente y con una tijera de punta fina se cortaron los extremos anteriores (aparato bucal) y posteriores (últimos segmentos abdominales) del insecto. Luego se introdujo la tijera de punta fina en el extremo posterior ya cortado y se seccionó al insecto de forma lateral exponiendo el interior del insecto con ayuda de una pinza. Con una aguja de disección se removió el tracto digestivo y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 0,5 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB). Inmediatamente se procedió a macerar mecánicamente los 30 intestinos con una varilla de vidrio estéril y en presencia del mechero. A uno de los homogeneizados se le burbujeo nitrógeno durante 20 min para garantizar la anaerobiosis y luego se colocó en jarra de anaerobiosis incubándose durante una semana a 37 °C. El otro homogeneizado se incubó bajo las mismas condiciones en aerobiosis.

Luego que transcurrió la semana de incubación del macerado, se observó turbidez en el caldo y se procedió a sembrar por rastrilleo y asada cada homogeneizado en medios de cultivo LB, bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis incubándose a 37 °C por 48 h.

4.3 Cultivo de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*) para el crecimiento bacteriano.

Se tomaron 10 granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*) por duplicado, se lavaron con NaClO al 3% durante 5 min y el exceso fue removido con agua destilada estéril, una vez realizado este proceso, se colocaron los diez granos sobre placas de agar de medio LB en condiciones de aerobiosis. Se incubaron a 37 °C durante 24 h.

4.4 Tinción Gram

Para realizar la tinción Gram, se tomaron muestras de las colonias bacterianas, con dicha muestra se realizó un frotis, sobre un portaobjeto que contenía una gota de solución salina estéril. El portaobjeto se colocó bajo mechero y se dejó secar la muestra. Luego se añadió una gota de azul o cristal violeta, sobre la muestra por 1 min. Esta solución tiñe tanto las bacterias Gram+, como las bacterias Gram- de un color azul intenso. Posteriormente se eliminó el cristal violeta con agua destilada. Se colocó la solución de lugol (KI al 2%) durante 30 seg. Se realizaron lavados con acetona y alcohol para remover el lugol. Por último, se cargó la muestra con solución de safranina al 1% (3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenil-fenaziniumcloro) (PANREAC QUIMICA, S.A.U.) durante 1 min. Luego se enjuagó con agua y se puso a secar en estufa a 37 °C durante 15 min. Por último se observó al microscopio óptico, con un aumento de 1000X. Las células Gram+ se observaron de color azul intenso y las bacterias Gram- de color rosa (Aulton, 2004).

De acuerdo a los resultados arrojados por la tinción Gram, se realizaron las pruebas bioquímicas, que determinan ciertas características metabólicas de las bacterias, en este caso las pruebas catalasas y oxidasas se realizaron, tanto para las bacterias Gram+ como para las Gram-. Las pruebas de la tabla 1, son para la identificación de las bacterias

Gram- y las pruebas de la tabla 2, se utilizaron para la identificación de las bacterias Gram+.

4.5 Pruebas microbiológicas-bioquímicas.

Luego que se obtuvo el crecimiento bacteriano, se procedió a aislar las colonias de la placa original. Se tomaron pequeñas porciones de una colonia bacteriana crecida y bien diferenciada con un ansa de metal, este material fue rayado con el ansa sobre otra placa que contenía medio LB. El reaislamiento se realizó, para asegurar que la bacteria no estuviese contaminada y evitar inconvenientes a la hora de la identificación. Esto se realizó para la bacterias obtenidas tanto del tracto digestivo del *Sitophilus oryzae* como para las bacterias obtenidas de los granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*).

De acuerdo a los resultados arrojados por la tinción Gram, se realizaron las pruebas bioquímicas, que determinan ciertas características metabólicas de las bacterias, en este caso las pruebas catalasas y oxidasas se realizaron, tanto para las bacterias Gram+ como para las Gram-. Las pruebas de la tabla 1, son para la identificación de las bacterias Gram- y las pruebas de la tabla 2, se utilizaron para la identificación de las bacterias Gram+. Los medios base utilizados para dichas pruebas Gram- se citan a continuación: medio citrato de Simmons, 24,2 g/L, (Biocen, Cuba), medio of basal, al 1% (Himedia, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), agar con hierro de Kligler, 54,8 g/L (Becton Dickinson, EE.UU.), medio para cultivo de motilidad, fórmula de Edwards y Ewing, 20 g/L (Mommert, Schwabach, Alemania), caldo de urea de Rustigian y Stuart, 38,71 g/L (Fisher Scientific, Canadá).

Todos los ensayos para las pruebas bioquímicas se realizarán con cultivos puros de 18-24 h y se incubaron a 37 °C, según lo propuesto por Macfaddin en el año 2000.

Tabla 1. Pruebas microbiológicas y bioquímicas para la caracterización de bacterias Gram -

	Determinación	Modo de Siembra	Indicador de pH	Interpretación
Catalasas	Presencia enzimas catalasas en bacterias.	Se coloca una muestra de la colonia pura sobre una gota de H ₂ O ₂ al 30%.	-	Prueba + burbujeo (presencia de O ₂). Prueba- ausencia de burbujeo.
Oxidasas	Presencia de enzimas oxidasas en bacterias.	Se coloca una muestra de la colonia pura sobre un papel de filtro con agua estéril.	-	Prueba + coloración púrpura. Prueba- no se observa coloración.
Citrato	Fuente de carbono citrato.	Punción con aguja de inoculación desde el bisel hasta el taco (medio sólido).	Azul de bromotimol (BTB).	Prueba + coloración azul Prueba- no se observa coloración.
Of-glucosa	Fermentación de glucosa.	Punción con ansa bacteriológica en el taco (medio semisólido).	Azul de bromotimol (BTB).	Prueba + coloración amarilla. Prueba- no se observa coloración.
Kliger	Fermentación de glucosa y lactosa. Producción de H ₂ S.	Punción con aguja de inoculación desde el bisel hasta el taco (medio sólido).	Rojo fenol	Prueba + fermentación de gluc. y lac. Coloración amarilla. Producción de burbujas. Prueba- no se observa coloración ni burbujeo.
Motilidad	Presencia de flagelos.	Punción con aguja de inoculación en el taco (medio sólido).	-	Prueba + migración de bacterias. Prueba- no se observa migración.
Urea	Hidrólisis de urea en amonio.	Punción con aguja de inoculación desde el bisel hasta el taco (medio sólido).	Rojo fenol	Prueba + coloración rojo-rosa intenso. Prueba- no se observa coloración.

Para la identificación de las bacterias Gram+ presentes en el *Sitophilus oryzae* los medios utilizados fueron; Bilis Esculina 64,5 g/ L. (Laboratorios Britania Argentina), acidificación de glucosa BBA 1% (Himedia, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), LB- manitol 25 gr/L (Himedia, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), Vogues-Proskauer 17 gr/L (MCD LAB. México).

Tabla 2. Pruebas microbiológicas y bioquímicas para la caracterización de las bacterias Gram+

	Determinación	Modo de Siembra	Indicador de pH	Interpretación
Bilis Esculina BE	Hidrólisis de la esculina a esculetina y glucosa en presencia de bilis	Sobre una placa de este medio se raya una colonia con un ansa bacteriológica de metal.	-	Prueba + ennegrecimiento de la placa Prueba- ausencia de color
Acidificación de glucosa BBA	Fermentación de glucosa.	Punción con ansa bacteriológica en el taco. (medio líquido).	Rojo fenol	Prueba + coloración amailla Prueba- coloración roja.
LB- manitol	Crecimiento de la cepa y fermentación del manitol.	Punción con ansa bacteriológica en el taco. (medio semisólido).	Rojo fenol	Prueba + coloración amarillo Prueba- coloración roja.
Novobiocina	Mide la sensibilidad o resistencia de la bacteria	Se coloca un disco del antibiótico sobre la superficie del agar que previamente fue rayada por la colonia.	Halo de 1cm.	Prueba + halo de inhibición de la cepa Prueba- susceptible
Voges-Proskauer	Producción de acetyl-carbinol (AMC, acetoina) a partir de la fermentación de la glucosa	Punción con ansa bacteriológica en el taco. (medio líquido).	-	Prueba + coloración rojo, rosado en la superficie del medio. Prueba - color amarillo en la superficie del medio.

Además se realizaron las pruebas catalasas y oxidasas descritas en la tabla 1.

4.5.1 Sistema de Identificación API TB Plus

El sistema de identificación API TB Plus (Vitek System ATB expresión Bio Merieux, Francia), se utilizó para la identificación de diversas cepas bacterianas, llegando hasta la especie mediante la lectura de galerías. El equipo se compone de un lector que detecta la degradación, hidrólisis, fermentación, sensibilidad o susceptibilidad ante los sustratos presentes en la galería una vez que haya sido inoculada la cepa. Luego de la lectura, el equipo realiza una comparación de forma computarizada con una base de datos que contiene diversas cepas bacterianas de tipo clínico y ambiental, una vez que se logra la comparación entre los perfiles, la computadora muestra en pantalla la bacteria que se desea identificar.

Se utilizaron diferentes galerías de acuerdo a los resultados arrojados por las pruebas bioquímicas (tabla 1 y tabla 2). Para ello se tomó una de las colonias Gram+ aislada en 24 h de incubación, crecidas en placas. En condiciones de esterilidad, se tomaron 4 Mc Farland (escala de concentración de la cepa bacteriana), que se mide con el densitómetro ATB (Vitek System ATB expresión Bio Merieux, Francia) y se inoculó en un tubo que contenía suspensión de medio, posteriormente, se homogeneizó hasta observar turbidez y se añadieron 55 μL en cada pozo de la galería rapid ID 32 STREP V2.0. Una vez culminado este paso, la galería se cubrió y se colocó en una cámara de humedad durante 4 horas. Pasado este tiempo, se introdujo la galería en el sistema de identificación ATB Plus y se obtuvieron los resultados.

En la galería ID 32 STAPH V2.0, que también mide hidrólisis enzimática, se realizó un procedimiento similar, con la diferencia que se utilizaron 0,5 Mc Farland del inóculo, luego se sembró un volumen de 55 μL por cada cúpula. La galería se incubó en la cámara de humedad durante 24 h para luego ser identificada.

Por último, para la galería ID 32 GN V2.0, se evaluó el crecimiento de las bacterias a partir de la degradación de carbohidratos. La prueba se realizó con una cepa bacteriana Gram-, se incubaron 0,5 Mc Farland, en una solución de NaCl 0,85%. Después de homogeneizar, se toman 200 μL del primer inóculo y se transfirieron a un medio auxiliar, se homogeneizaron y se tomaron 135 μL de este medio, añadiéndolo en las cúpulas de la galería, esta se colocó en una cámara de humedad y fue leída a las 24 h.

4.6 Formulación y preparación de las películas comestibles

Para realizar la matriz polimérica de las películas comestibles se requirió la preparación de la solución formadora de película (SFP). Ella consistió en:

- **Matriz polimérica:** almidón de papa (*Solanun tuberosum*) en polvo, extraído experimentalmente en el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos (Mercedes Baragaño de Mosqueda), del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), como se describe más adelante.
- **Agente plastificante:** glicerol, grado comestible.
- **Agente dispersante:** agua destilada.

La SFP se preparó mezclando el almidón de papa con agua destilada al 4% (p/v), calentándolo durante 30 min a 98 °C (ebullición) con agitación constante. Luego se agregó 1,5 % (v/v) de glicerol. Esta mezcla se dispersó con un homogeneizador (Ultra-Turrax, T 25 basic, Ika® Werke, EE.UU.) a 18.000 rpm durante 3 min (según modificación del método de Romero-Bastidas, 2005).

Para la preparación de las películas sin bifidobacterias, se vertieron 20 mL de la SFP en placas de Petri de 10 cm de diámetro y secadas en incubadora a 60 °C por 1 día. Por otra parte, para preparar las películas con bífidobacterias, a la SFP se le añadió aseptícamente 1% (p/v) del sedimento obtenido durante la activación y el crecimiento de la cepa utilizada (ver más adelante) y se agitó suavemente evitando la incorporación de aire (Tapia y col., 2007). Luego, 20 mL de esta suspensión se vertieron en placas de Petri de 10 cm de diámetro y se secaron en un refrigerador a 4 °C por 4 días.

4.6.1 Extracción y purificación del almidón de papa

Para la obtención del almidón fue utilizada la metodología descrita por Pérez y col. (1993). Las papas blancas, según la escala de Von Loesecke (1950), utilizadas para la obtención de almidón fueron adquiridas en el mercado de Quinta Crespo, Caracas, Venezuela. Se lavaron 8 kg de papa, se pelaron y se colocaron en el congelador durante 12 h. Posteriormente, se procedió descongelar las papas, se trocearon y se licuaron

varios trozos, con una licuadora (Oster, Caracas, Venezuela). La mezcla obtenida se separó con ayuda de mallas de muselinas y luego fue centrifugada en centrífuga DAMON/IEC-División Modelo CRV-5000 a 4000 r.p.m por espacio de 15 min y se descartó el sobrenadante. Esta centrifugación se realizó 4 veces. El almidón obtenido por este procedimiento se colocó en un deshidratador de bandeja (MITCHELL modelo 645159, EE.UU.) por 18 h a 45 °C, se molió y tamizó (serie de tamices ASMT).

4.6.2 Activación de la cepa *Bifidobacterium lactis Bb12*.

Las bifidobacterias liofilizadas de origen comercial (Christian Hansen, Dinamarca), se mantuvieron congeladas hasta su uso. A 100 mL de caldo MRS (Man, Rugosa, Sharpe) (Oxoid, Unpath Ltd., Basingstoke, Reino Unido), en esterilidad, se le agregó 1 g de bifidobacterias liofilizadas, adicionando HCl-cisteína al 10%. La preparación se incubó a 35 °C – 37 °C por 24 h, en jarra Oxoid (HP11), con sobres de anaerobiosis (Oxoid, Unipath Ltd, Reino Unido).

4.6.3 Crecimiento de la cepa *Bifidobacterium lactis Bb12*.

Se prepararon 900 mL de caldo MRS estéril, al cual se le agregó HCl-cisteína al 10% y una solución de antibióticos (sulfato de polimixina B, sulfato de kanamicina, propionato de sodio, cloruro de litio, ácido nalidíxico, acetato de yodo y cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). Los 100 mL de la preparación que contenían las bifidobacterias se agregaron a los 900 mL de caldo MRS, para luego incubarlo durante 24 h a 35 °C – 37 °C. Finalizado este tiempo, este caldo con bifidobacterias activas en crecimiento, se centrifugó a 6000 rpm por 15 min a 5 °C. Luego se descartó el sobrenadante y el sedimento se incorporó en SFP como ya se describió.

4.6.4 Determinación del pH de la solución formadora de película

El pH de las películas comestibles a base de almidón de papa con *Bifidobacterium lactis* Bb12 se realizó para determinar si estos microorganismos eran capaces de sobrevivir y mantenerse viables bajo esta condición en la película y así, ser transferidas al tracto digestivo del gorgojo de arroz. Para ello, se midió el pH utilizando un potenciómetro (pH-metro) DIGITAL (Modelo Hanna), calibrado con soluciones buffer a pH 4,0 y pH 7,0. Esta determinación se realizó solo una vez a la SFP.

4.7 Bioensayo con el gorgojo de arroz

Una vez obtenida la F₁ del gorgojo de arroz (sección 4.1), se tomaron 30 individuos y se colocaron en un vial de vidrio, que contenía 2 g de alimento por cada vial. Los insectos se alimentaron con las dietas experimentales por 12 días. Dichas dietas fueron: ayuno y arveja, como controles de calidad del bioensayo; películas de almidón de papa con el probiótico y películas de almidón de papa sin el probiótico. Cada dos días, se descartaron los individuos muertos, para evitar el canibalismo entre los insectos. Al finalizar los doce días, los insectos que sobrevivieron fueron sacrificados por congelación y se midieron diversos biomarcadores como se describe más adelante. Cada dieta se estudió por triplicado.

Además se estimaron los cambios en la composición corporal a los días 0, 4 y 12 durante el recuento de bifidobacterias en el experimento para estimar la transferencia.

4.7.1 Determinación de la supervivencia y la variación de peso

Para determinar la supervivencia y la variación de peso se llevaron registros interdiario del número y el peso de los individuos sobrevivientes. El peso se registró,

como peso promedio por individuo. Se emplearon las siguientes fórmulas para la determinación de la supervivencia (S) y la variación de peso (VP):

$S \% = (\text{número total de individuos} - \text{número de muertos}) \times 100 / \text{número total de individuos}.$

$VP \% = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) \times 100 / \text{peso inicial}$

4.7.2 Determinación de la composición corporal

4.7.2.1 Contenido de agua

Los cadáveres de 30 insectos fueron pesados y luego deshidratados en una estufa a 100 °C durante una hora y media. Se calculó el contenido de agua por diferencia entre el peso total y el peso seco (AOAC International, 1984).

4.7.2.2 Contenido de grasa

Los insectos deshidratados se homogeneizaron en un Potter-Evelhem, con 2 mL de éter de petróleo durante 2 min a temperatura ambiente. Se colocó la solución éter-grasa en un vidrio de reloj, previamente tarado y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente alrededor de una hora bajo una campana de extracción de gases. Posteriormente se pesó el vidrio con el material seco y se estimó el contenido de grasa por diferencia entre los pesos final e inicial (AOAC International, 1984).

4.7.2.3 Contenido de nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular

Para determinar el contenido de nitrógeno corporal es necesario separar el nitrógeno proveniente de la cutícula del insecto, del nitrógeno de las proteínas corporales. Para ello, se realizó la extracción de las proteínas corporales en medio alcalino, para luego mineralizar la materia orgánica (digestión). De esta manera, se determinó el contenido

de nitrógeno (proteico y cuticular) mediante un método colorimétrico, como se describe a continuación.

4.7.2.3.1 Extracción de proteínas corporales

Para extraer las proteínas se incubó el material seco y desgrasado, con 2 mL de NaOH (0,5 mol/L) por 24 h, con agitación constante a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16000 x g por 15 min en tubos Eppendorf, para recuperar la proteína solubilizada en el sobrenadante y la cutícula (material insoluble en álcali) en el residuo. Se agregó 1 mL de NaOH al residuo y se repitió la extracción por 24 h bajo las mismas condiciones. Luego se realizó una centrifugación, se combinaron los dos sobrenadantes (conteniendo el nitrógeno proteico, NP) y se recuperó el residuo, el cual se filtró al vacío realizando varios lavados con agua destilada. El papel de filtro con el residuo (conteniendo el nitrógeno cuticular, NC) se secó en la estufa a 100 °C por 1 h. Tanto el sobrenadante como el residuo filtrado se utilizaron para la mineralización de la materia orgánica (digestión).

4.7.2.3.2 Digestión de la materia orgánica

Las muestras de 1 mL del sobrenadante anterior (NP) y todo el residuo cuticular (NC) se colocaron en tubos grandes de digestión. Luego se mezclaron con 2 mL de H₂SO₄ concentrado. A cada tubo se le añadió una pizca (58-61 mg) de catalizador de cobre (sulfato de cobre: sulfato de potasio, 1:9) previamente pulverizado con un mortero. Luego se realizó la mineralización de la materia orgánica en un digestor Kjeldhal a 350 °C hasta lograr la transparencia total de las muestras (usualmente 4 h). Finalmente, se dejaron enfriar las muestras digeridas, se les añadió 5 mL de agua destilada a cada una y se registró el volumen final para luego determinar el contenido de nitrógeno, con el reactivo de Nessler.

4.7.2.3.3 Determinación del contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler

Para determinar el contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler, se tomaron alícuotas de 20 µL de NC digerido ó 50 µL de NP digerido, se mezclaron con 2,5 mL de agua destilada y 0,4 mL de KOH (4 mol/L). Una vez agitado en vórtex se agregaron 0,1 mL del reactivo de Nessler (Fluka) a cada muestra. Transcurridos 10 min, se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro. Se estimó el contenido de nitrógeno, utilizando una curva estándar de sulfato de amonio, construida usando una solución patrón a una concentración de 47,19 µg/mL (10 µg/mL de nitrógeno). (Cherry, 1973, modificado por Gómez-Sotillo, 1997).

4.7.2.3.4 Determinación de proteínas presentes en las películas comestibles

Con el fin de estimar el aporte de biomasa de las bifidobacterias de la película, se cuantificó el contenido de proteína cruda, según el método establecido por la AOAC Internacional (1990). Se pesó un gramo de la película que contiene el ingrediente probiótico sobre un papel de filtro sin cenizas, el cual se colocó en tubos de digestión y se introdujo en un digestor tipo Kjeldahl. Luego se vertió una cantidad pequeña de catalizador (sulfato de cobre: sulfato de potasio 1:9) y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. El tubo y la mezcla, se colocaron en el equipo de digestión a temperatura baja hasta que finalice la formación de espuma. Luego se aumentó la temperatura y se calentó hasta que la mezcla quedara incolora. Posteriormente se destiló el material digerido (125 mL). Se utilizó el equipo de destilación Velp® Scientifi C.A. La destilación se realizó en una solución de ácido bórico al 4 % y entre 5 a 7 gotas de solución indicadora de rojo de metilo y, este se adaptó a la salida del destilador. El destilado fue titulado con H₂SO₄ 0,098 N, hasta que la solución indicadora se tornó gris.

El volumen final de la titulación se utilizó para estimar el porcentaje de proteína cruda en la película mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína cruda(\%)} = \text{volumen del ácido} \times [\text{ácido}] \times 14,007 \times 10^{-3} \times 6,25 \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

El volumen del ácido fue el volumen en mL utilizado en la titulación, $[\text{ácido}]$ 0,098 N, $14,007 \times 10^{-3}$ es el peso equivalente del nitrógeno y 6,25 es el factor de transformación para las proteínas.

4.8 Recuento de *Bifidobacterium lactis* Bb12 en la película y en gorgojos alimentados con esta película.

A las películas comestibles con y sin bifidobacterias y los intestinos de los insectos alimentados con dichas películas, se les realizó diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-11} con agua peptonada. Como las bifidobacterias son microorganismos anaeróbicos la homogenización se realizó manualmente y en condiciones anaerobias. Luego se sembró 1 mL de cada dilución, la siembra se realizó en tubos de cara plana Miller Pricket. Todas las siembras fueron realizadas en agar MRS, HCl-cisteína y la solución de antibióticos descrita anteriormente, luego se agregó una sobrecapa del medio como lo describe el método de Payne (1999) y Arroyo (1995). Fueron incubados a 37 °C por 24 h. La siembra y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) según el criterio elegido entre 25 y 250 UFC, se realizaron cada dos días, durante el periodo de experimentación. Se tomó un vial por día, que contenía películas comestibles con bífidos para determinar la viabilidad de los probióticos, y un vial que contenía gorgojos alimentados con películas comestibles para comprobar la transferencia del probiótico al intestino del gorgojo del arroz.

En este experimento se realizó un cambio de dieta a los cuatro días para demostrar la transferencia, es decir, a la población inicial alimentada con películas con bífidos se

les alimentó con películas sin bífido y viceversa. Se tomaron los viales de los insectos con películas comestibles con o sin bífido y se realizó el conteo de bacterias transferidas, de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior, hasta culminar el experimento. Para realizar este cambio de dietas, las películas con bífidos se conservaron en refrigeración a 4° C, desde el día cero del experimento hasta el cambio de la dieta, para garantizar la viabilidad de los bífidos.

4.9 Inclusión del tracto digestivo de *Sitophilus oryzae* para la microscopia electrónica de transmisión.

Se extrajo el tracto digestivo del insecto y se colocó en solución PBS 2X. Posteriormente, se fijó la muestra por 45 min hasta 2 h a 4 °C, en solución de Karnovsky, 0,1 mol/L. Se lavó 3 veces por 1 min, con tampón fosfato Millonig (TFM) 0,2 mol/L (Sigma-Aldrich). Posteriormente, la muestra se fijó en solución de OsO₄ al 1% en TFM por 2 h a 4 °C. Luego se realizaron lavados con agua destilada, durante 15 min a 4° C. La muestra fue pasada por una batería de deshidratación (5 min c/u) con etanol al 50%, 70%, 95%, a 4 °C. Finalmente, se deshidrató la muestra con CH₃CO₂OH al 100%, por 5 min a 22 °C, en dos cambios. Se añadió óxido de propileno puro, por 15 min, se realizaron 2 cambios a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se colocó el óxido de propileno y la mezcla resina epóxica LX-112resin (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) (1:1) a la muestra, por 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron 2 cambios a la muestra, con una mezcla de resina pura epóxica LX-112, durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se incluyó la muestra en moldes de plástico debidamente etiquetados y se dejó endurecer en una estufa a 60 °C durante 48 h. Una vez que se tuvo la muestra polimerizada, se pasó por un micrótopo para realizar cortes ultrafinos, y así, la toma de micrografías.

4.10 Preparación para la microscopía de barrido (SEM) de la película comestible con *Bifidobacterium lactis* Bb12.

Una vez que se obtuvo la película comestible con los bífidos incorporados, se colocaron en un desecador con sílica durante 24 h para deshidratarlas. Luego de este tiempo se cortaron tres trozos pequeños de diversas partes de la circunferencia de la película para garantizar la presencia y observación de las bacterias en el microscopio de barrido. Posteriormente los cortes se colocaron en un porta muestra y se añadió grafito líquido en los bordes del porta muestra hasta la colocación de los trozos de película con bífido para que se generara la conducción de la electricidad. Una vez seco el grafito, se colocó el porta muestra con el montaje en un sistema de vacío (Eiko Engeneering), a 10^{-3} Torr, durante 1 h. Luego de este tiempo, se comenzó el recubrimiento de oro sobre la muestra durante 15 min a 5 mA.

4.11 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para la composición corporal se realizó mediante el programa Statistica v7.0.61.0 de Statsoft ®. A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis de varianza (ANOVA de una vía); para verificar la homogeneidad de varianza se realizará una prueba *a priori* de Bartlett y para comparar los diferentes grupos se utilizará la prueba *a posteriori* de Duncan.

Para los análisis estadísticos de la viabilidad y transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 se realizó la prueba del Chi-cuadrado, prueba no paramétrica, partiendo de la prueba de Bondad de Ajuste; esta consiste en determinar si los datos de una muestra corresponden a una distribución poblacional. En este caso, es necesario que los valores de la variable en la muestra y sobre la cual queremos realizar la inferencia esté dividida en clases de ocurrencia, o equivalentemente, sea cual sea la variable de estudio,

deberemos categorizar los datos asignando sus valores a diferentes clases o grupos. Para ello utilizamos el siguiente estadístico de prueba:

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad \text{con } k-1 \text{ (grados de libertad) con un nivel de confianza 95\%}$$

Definiendo como hipótesis nula: la no existencia de diferencias significativas en la variable estudiada ($H_0 = O = E \Rightarrow X^2 \rightarrow 0$); y como hipótesis alternativa: existen diferencias significativas en la variable estudiada ($H_1 = O \neq E \Rightarrow X^2 \rightarrow \infty$).

Hipótesis para la viabilidad:

H_0 = no existen diferencias significativas de la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb12 en la película a través del tiempo del ensayo 1 al y el ensayo 2.

H_1 = si existen diferencias significativas de la viabilidad de de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 en la película a través del tiempo del ensayo 1 al y el ensayo 2.

Hipótesis para la transferencia:

H_0 = no existen diferencias significativas en la transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 de la película comestible al tracto digestivo del gorgojo del arroz entre el ensayo 1 y el ensayo 2 a través del tiempo.

H_1 = si existen diferencias significativas en la transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 de la película comestible al tracto digestivo del gorgojo del arroz entre el ensayo 1 y el ensayo 2 a través del tiempo.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización morfológica de las bacterias encontradas en el tracto digestivo del *Sitophilus oryzae*

Una vez obtenido el crecimiento bacteriano en medio líquido, posterior a la extracción de los intestinos, se pasaron a placas con medio LB mediante la siembra por rastrilleo, para verificar crecimiento bacteriano sin contaminación y un rayado con ansa bacteriológica, para obtener las colonias aisladas, 48 h más tarde. De este aislamiento se obtuvieron tres posibles cepas, morfológicamente diferentes: una de las colonias era translúcida y de pequeño tamaño (cepa A); las otras dos presentaron un crecimiento abundante pero variaban de acuerdo al color, siendo una marrón clara (cepa B) y la otra más oscura (cepa C).

En la figura 3 se encuentran representadas las cepas A, B y C, provenientes del intestino de *Sitophilus oryzae*. La cepa A, B y C fueron cultivadas medio LB. Estas cepas se desarrollaron en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, pero se observó que el crecimiento se vio favorecido en ausencia de oxígeno, demostrándose que las bacterias son anaerobias facultativas debido al mayor número de colonias que crece en dicha condición.

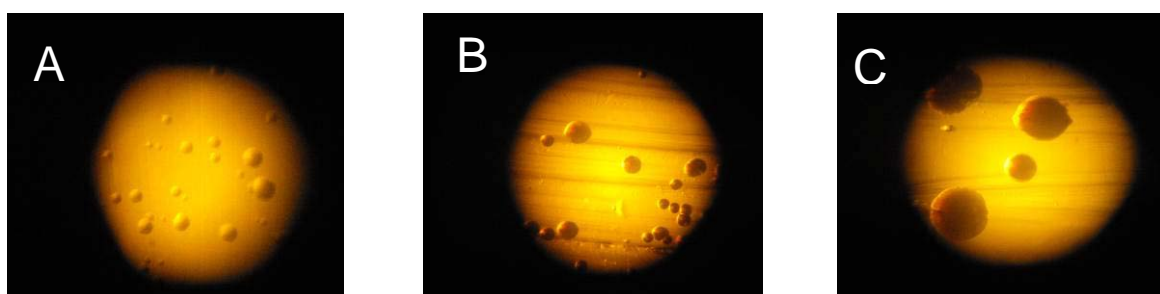


Figura 3. Colonias aisladas del tracto digestivo del *Sitophilus oryzae* observadas bajo lupa estereoscópica binocular a 3X. A; B; C colonias crecidas en medio LB.

La tinción Gram revela que todas las cepas son Gram +, de color azul como se observa en la figura. 4. La diferencia entre ellas, es la forma como se agrupan: la cepa A presenta, cocos alargados formando cadenas largas de aproximadamente 25 células y cadenas cortas de 3 a 6 (figura 2A); La cepa B (figura 2B) y la cepa C (figura 2C), las células forman racimos de 10 a 15 células.

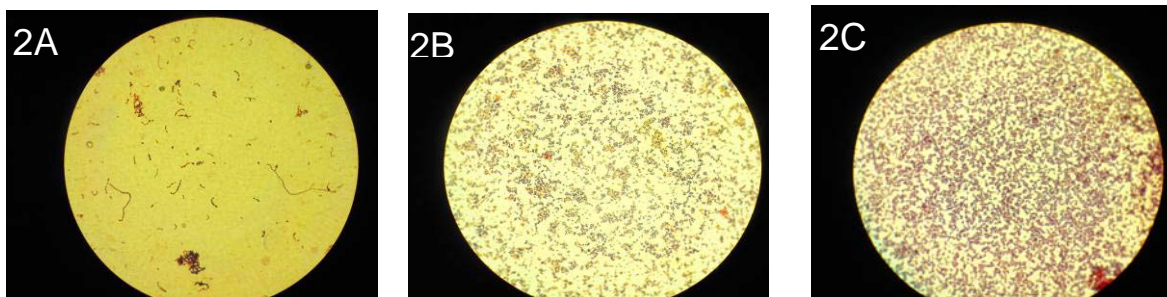


Figura 4. Tinción Gram de las colonias aisladas del tracto digestivo del *Sitophilus oryzae* observadas bajo Microscopio a 1000X.

Estas cepas son Gram+, debido a la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en un 90% en las paredes de las bacterias. Al realizar la tinción con el cristal violeta, colorante catiónico, este penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram+ como Gram-). La solución es absorbida y atrapada en la pared de las células. El lugol, formado por I₂ (yodo), entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta. La mezcla de alcohol-acetona realiza la decoloración del complejo I₂/cristal violeta, así los microorganismos Gram+ no se decoloran manteniendo un color azul, mientras que los Gram- sí se decoloran y obtienen un color rojo, por la utilización de la safranina. (Bergey, 1994).

Las cepas B y C se sembraron en placas de agar LB-manitol con disco de Novobiocina (antibiótico). Los resultados indicaron que estábamos en presencia de dos cepas diferentes, debido a que la cepa marrón clara (B) no degrada el manitol, mientras

que, la marrón oscura (C) si degrada este azúcar, ya que, se produce un viraje del pH del medio de rojo a amarillo, sin embargo, ambas crecieron en agar LB, ya que este es un medio rico, y fueron sensible a la Novobiocina, por la formación de un halo alrededor del disco, como se muestra en la figura 5.

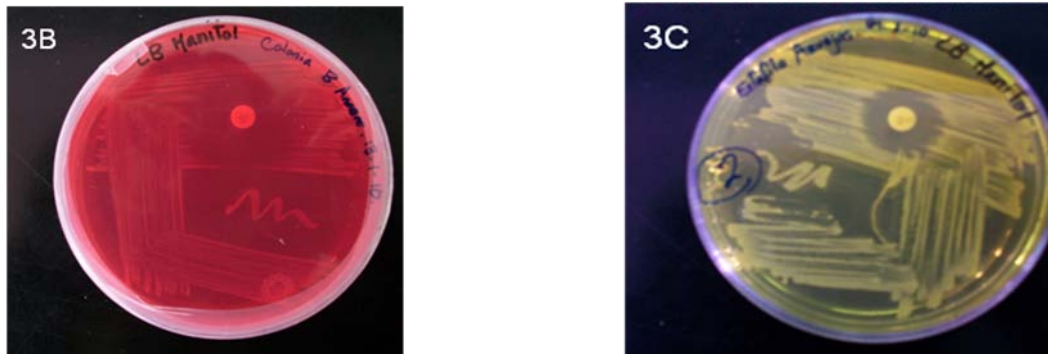


Figura 5. Crecimiento de la cepa B y cepa C sembradas en placas de LB-manitol con disco de Novobiocina

La novobiocina es un antibiótico producido por el *Streptomyces niveus*, *Streptomyces spheroides* u otros organismos relacionados, que inhibe la síntesis de la pared de la célula bacteriana por inhibición de la ADN girasa y bloquea la actividad de la Adenosina trifosfatasa (ATPasa). Tiene un espectro de acción contra bacterias Gram+ como el *Staphylococcus aureus*, y algunos organismos Gram- incluyendo el *Haemophilus influenzae* (Dangel, 2009)

5.2 Caracterización morfológica de las bacterias encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*)

Los granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*) fueron colocadas en medio LB, bajo condiciones aerobias. Las colonias presentaron un color amarillento y un tamaño de aproximadamente entre 3-4 mm. Ambas colonias, eran parecidas en color y tamaño, variando la viscosidad entre ellas.

En cuanto a la tinción de Gram, se encontraron dos tipos de células, una Gram+, la cual presentaba cocos pequeños agrupados en racimos (cepa D). La otra bacteria era una Gram-, sus células son bacilos alargados (cepa E), lo que nos condujo a la diferenciación mediante esta prueba. De acuerdo a la agrupación de las células observadas en el Gram para la cepa D, indica que estamos en presencia de un *Staphylococcus*, mientras que los bacilos se identificaron con las pruebas bioquímicas.

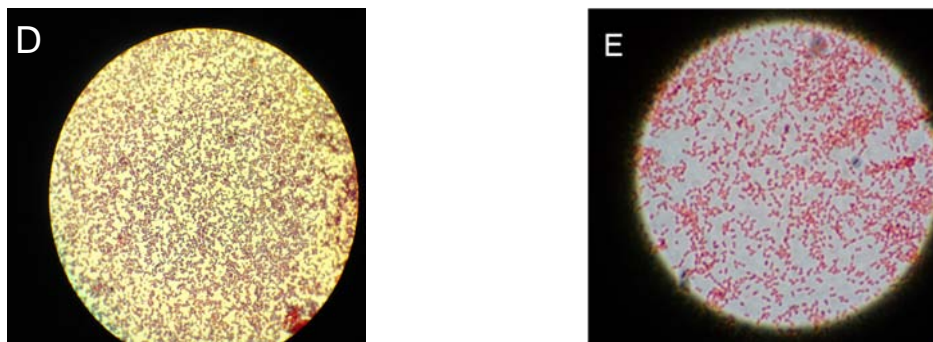


Figura 6. Tinción Gram de las cepas D y E que se encontraron en las arvejas verdes

5.3 Caracterización Bioquímica de las bacterias encontradas en el tracto digestivo de *Sitophilus oryzae*.

Una vez obtenido el aislamiento de las cepas bacterianas, se realizó el repique de las colonias en placas, en condiciones aerobias y anaerobias, incubándose a 37 °C, por 24 h. A partir de estas colonias frescas y de acuerdo al resultado obtenido en la tinción Gram, se realizaron las pruebas bioquímicas, representadas en la tabla 3. Efectivamente se identificaron 3 tipos de cepas diferentes. La prueba de la catalasa es negativa para la cepa A, mientras que, es positiva para las cepas B y C. Esto puede observarse por la formación de burbujas al agregar el reactivo de la catalasa sobre el frotis bacteriano en el portaobjeto

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas encontradas en el tracto digestivo del *Sitophilus oryzae*.

Pruebas	Cepa A	Cepa B	Cepa C
Gram	+	+	+
Catalasa	-	+	+
Infusión cerebro-corazón (ICC)	+	NR	NR
Bilis Esculina (BE)	+	NR	NR
LB-manitol	NR	-/G	+/G
Novobiocina	NR	S	S
Voges-Proskauer (VP)	-	NR	NR
Nitrato	-	NG	NG
Acidificación de glucosa (BBA)	NR	+	+

NR: no se realizó; G: crecimiento; S: sensible; NG: sin crecimiento

Cuando las flavoproteínas reducidas se unen con el oxígeno y las oxidasas presentes en la cadena respiratoria de las bacterias, se forman dos compuestos tóxicos como son; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical superóxido O_2^- . Las enzimas catalasas, eliminan de forma catalítica los intermediarios de la reducción del oxígeno, actuando como defensa biológica contra la toxicidad del oxígeno. (Chelikani y col., 2004).

Las enzimas responsables de la captación y reducción de oxígeno y de la producción de H_2O_2 , son las flavoproteínas oxidasas, también se encuentran las NADH oxidasas que pueden producir O_2^- y H_2O_2 o H_2 , como las NADH peroxidasas que pueden reducir el H_2O_2 a H_2 . (Ho y col. 2004). La catalasa está presente en la mayoría de las células bacterianas anaerobias facultativas, que contienen citocromos a excepción de las *Streptococcus*. Estos resultados podrían indicar que la cepa A es un *Streptococcus*.

Bajo condiciones de anaerobiosis, se hizo crecer la cepa A en medio LB, pero las colonias crecidas, eran pequeñas y poco abundantes. Se decidió colocarlas en medio de infusión corazón cerebro, ya que es un medio más rico que el medio LB, sin embargo, las colonias presentaban el mismo comportamiento que con el medio LB. Se decide cultivar las bacterias en agar sangre, este medio favoreció el desarrollo de las colonias y sirvió para realizar repiques del cultivo bacteriano a agar Bilis Esculina y realizar tinción Gram.

La Esculina, es un glucósido, que es un derivado acetal de un monosacárido simple. Cuando una sustancia que no es un hidrato de carbono se une a un azúcar por una unión acetal, el acetal resultante es denominado glucósido y la porción no glúcida, aglucoma. La base de la prueba es la hidrólisis de la esculina por la enzima β -glucosidasa constitutiva (enzima esculinasa), que actúa sobre la unión β del aglucoma con el monosacárido, liberando dos moléculas: glucosa y esculetina. (Paula, 2006).

Tal y como se muestra en la figura 7, la cepa A crece en agar bilis esculina mostrando un color castaño, demostrando la degradación de la esculina a esculetina en presencia de bilis.



Figura 7. Crecimiento de la cepa A en medio de bilis esculina y representación de la hidrólisis de la esculetina

Además, a la cepa A se le realizó la prueba de Voges-Proskauer, que determina el acetilmetilcarbinol (AMC, acetoína), como producto final de la fermentación de la glucosa. El resultado de esta prueba fue negativo, lo que nos indica que la bacteria pertenece al grupo *Streptococcus*, como lo demuestra la agrupación de las células en la tinción Gram, la prueba de la catalasa negativa y la hidrólisis de la esulina en presencia de la bilis. (Macfaddin, 2000)

Para las cepas B y C, se realizó la prueba de la acidificación de la glucosa (BBA), debido a que sus células son redondeadas y agrupadas en racimos, podríamos asociarlas a los géneros, *Staphylococcus* y/o *Micrococcus*, por lo tanto, se procedió a descartar en cuál de los dos grupos se ubicaba estas cepas.

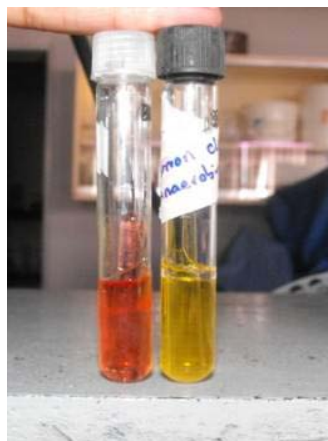


Figura 8. Prueba de la acidificación de la glucosa en las cepas B y C

En la figura 8, observamos la acidificación de la glucosa, representado por el tubo de caldo amarillo, bajo condiciones anaerobias. Al realizar el inóculo bacteriano en el caldo, esta hace virar el color del caldo de rojo a amarillo, ya que tiene un indicador que es rojo fenol. Ambas cepas (B y C) acidificaron el medio, infiriéndose que se encuentran en el género de los *Staphylococcus*.

5.4 Identificación de las cepas bacterianas del tracto digestivo del *Sitophilus oryzae* mediante el Sistema de Identificación ATB Plus

Cepa A

La identificación de la cepa A, se realizó mediante la galería rapid ID 32 STREP V2.0, los resultados se observan en la tabla 4:

Tabla 4. Resultados de la galería rapid ID 32 STREP V2.0 de la cepa A

Pruebas de la Galería				Pruebas en contra		
				<i>Gemella Morbillorum</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Gemella haemolysans</i>
ADH (-)	SOR (-)	β NAG (-)	SAC (-)	β GLU 1%	MAN 75%	β GLU 0%
β GLU (+)	LAC (-)	GTA (-)	LARA (-)	PYRA 25%	HIP 92%	β MAN 0%
β GAR (-)	TRE (+)	HIP (-)	DARL (-)	β MAN 0%	β MAN 1%	TRE 0%
Bgur (-)	RAF (-)	GLYG (-)	M β DG (-)	TRE 9%	LAC 79%	-
α Gal (-)	VP (-)	PUL(-)	TAG (-)	SAC 81%	SAC 100%	-
PAL ($\dot{\iota}$)	APPA (-)	MAL (+)	β MAN (+)	-	-	-
RIB (-)	β GAL (-)	MEL (-)	CDEX (-)	-	-	-
MAN (-)	PYRA (+)	MLZ (-)	URE (-)	-	-	-

Arginina Dihidrolasa, β glucosidasa, β galactosidasa, β glicuronidasa, α galactosidasa, Fosfatasa Alcalina, Ribosa (acidificación), Manitol (acidificación), Sorbitol (acidificación), Lactosa (acidificación), Trehalosa (acidificación), Rafinosa (acidificación), Sacarosa (acidificación), L-Arabinosa (acidificación), D-Arabitol (acidificación), Ciclodextrina (acidificación), Producción de Acetoína, Alanina-Fenilalanina-Prolina Arilamidasa, β Glactosidasa, Acido Pyroglicámico Arylamadasa, N -Acetil- β Glucosaminidasa, Glycyl-Triptofano Arylamidasa, Hidrólisis de Hipurato, Glycogeno (acidificación), Pullulan (acidificación), Maltosa (acidificación), Melibiosa (acidificación), Melezitosa (acidificación), Metil-B-D Glucopiranosidasa (acidificación), Tagatosa (acidificación), β Manosidasa, Ureasa.

En esta prueba se obtienen tres posibles resultados, que describen el comportamiento de las diferentes enzimas bacterianas al degradar los diferentes sustratos: negativo (-) para la bacteria que no pueden degradar el sustrato y positivo (+) para la bacteria que tiene la capacidad de utilizar estos sustratos para sus procesos metabólicos.

La especie que se identifica como cepa A, es *Aerococcus viridans*. Una de las pruebas que apoya la identificación de este género, aparte de la galería, es el crecimiento de la bacteria en un medio de Bilis Esculina (Park y col., 1990), descartando así las otras opciones debido a que las especies de *Gemella* no hidrolizan la esculina, gelatina y la urea. (Berger, 1992).

La *Aerococcus viridans* está representada por células redondeadas en forma de tétradas, no mótil, Gram+. Su crecimiento es relativamente bajo, produciendo colonias pequeñas, traslúcidas. Fermenta la manosa y el manitol. (Pien y col., 1984). Esta bacteria está distribuida en todo el mundo y es contaminante del aire. Pueden encontrarse en alimentos como la carne, vegetales y en pequeñas proporciones, en la piel de los seres humanos. También se encuentra en los hospitales, causando infecciones nosocomiales. (Kristencen y col., 1995). En muchas circunstancias, *Aerococcus* es una bacteria saprofítica, considerada también como microorganismo oportunista, donde carecen las condiciones de esterilidad en hospitales, alimentos, produciendo bacteriemia, endocarditis, meningitis. (Colman, 1967).

Este género bacteriano fue aislado por primera vez en langostas, produciendo la enfermedad de Lobsters, estudiada en varias especies de langostas por Stewart en el año 1966, desde allí hasta el año 2004, se han creado muchas representaciones de modelos para entender este padecimiento en los crustáceos. Esta bacteria es un parásito

facultativo, se encuentra en la microflora de las langostas y produce letargo, anorexia y quitinólisis, ocasionando una necrosis en su exoesqueleto. (Lavallée y col., 2001). Los métodos de control para esta enfermedad incluyen la prevención al daño del exoesqueleto de las langostas, higiene y reducción de la temperatura del agua. (Bower y McGladdery, 2004).

Cepa B.

Para la cepa B se utilizó la galería específica para *Stafilococos* (ID 32 STAPH V2.0). En la tabla 4, se muestra que el perfil de la bacteria, coincide con las enzimas y sustratos presentes en la galería, por lo tanto, define a esta cepa como *Staphylococcus chromogenes*.

El género *Staphylococcus* es muy amplio, ya que esta bacteria es ambiental, puede crecer en presencia o ausencia del oxígeno, y se considera patógena para los seres humanos, siendo la especie más virulenta *Staphylococcus aureus*. (Gutiérrez, 2006). Este puede encontrarse en la piel, adhiriéndose a superficies corporales y en conjunto los ácidos teicoicos y el péptidoglicano tienen la característica que activan el sistema inmune del complemento y sirven además de evasores de la fagocitosis (Engelhardt y col. 1998), también invaden las vías respiratorias de los seres humanos y pueden estar dentro de los tractos digestivos de una variedad de animales.

En el murciélago existe una relación simbiótica con el género *Staphylococcus*, encontrándose como parte de la flora bacteriana presente en su tracto digestivo. Al igual que los seres humanos pueden presentar especies de *Staphylococcus* en la piel, las presas de los vampiros también las poseen en todo su cuerpo y posiblemente esta

bacteria invade el tracto digestivo del quiróptero por el contacto entre presa y predador (Caverri, 2006).

Bacot (1914), hizo estudios similares sobre las bacteria que se encontraban en el canal alimenticio de pulgas durante su metamorfosis, y demostró que el canal

Tabla 5. Resultados de la galería ID 32 STAPH V2.0 para la cepa B

Pruebas de la Galería			
URE (+)	LAC (+)	PAL (-)	RIB (+)
ADH (+)	TRE (-)	PYRA (-)	CEL (-)
ODC (?)	MAN (-)	NOVO (-)	-
ESC (-)	RAF (-)	SAC (+)	-
GLU (+)	NIT (+)	NAG (+)	-
FRU (+)	VP (-)	TUR (-)	-
MNE (-)	βGAL (-)	ARA (-)	-
MAL (+)	ArgA (-)	βGUR (-)	-

Ureasa, Arginina Dihidrolasa, Ornitina Descarboxilasa, Esculina (hidrólisis), Glucosa (fermentación), Fructosa (fermentación), Manosa (fermentación), Maltosa (fermentación), Lactosa (fermentación), Trehalosa (fermentación), Manitol (fermentación), Rafinosa (fermentación), Nitrato (reducción), Voges Proskauer, β Galactosidasa, Arginina Arylamidasa, Fosfatasa Alcalina, Pyrrolidonil Arylamidasa, Novobiocina, Sacarosa (fermentación), N-acetyl-Glucosamina, Turanosa (fermentación), Arabinosa (fermentación), β Glucuronidasa, Ribosa (fermentación), Celiobiosa (fermentación).

alimenticio de las larvas de pulgas pueden ser infectadas con las bacterias que se encuentra en el alimento, estas bacterias son *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus albus*. Él también mostró que una infección de bacterias en el tracto digestivo de la larva, puede persistir hasta el período que descansa la larva en el capullo, y no existen pruebas satisfactorias que tal infección pueda hacer que la larva sobreviva al estado pupal.

Cepa C

A diferencia de la cepa B, el sistema de identificación API sólo pudo caracterizarla a nivel de género, porque cada especie definida por este sistema, tiene pruebas en contra. En la tabla 6 se observa el perfil de este microorganismo.

Tabla 6. Resultados de la galería ID 32 STAPH V2.0 para la cepa C

Pruebas de la Galería				Pruebas en contra		
				<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
URE (+)	LAC (+)	PAL (-)	RIB (+)	URE 1%	ODC 0%	ADH 0%
ADH (+)	TRE (+)	PYRA (+)	CEL (-)	VP 95%	βGAL 79%	MNE 76%
ODC (+)	MAN (+)	NOVO (-)	-	RIB 18%	ARA 1%	PAL 83%
ESC (-)	RAF (-)	SAC (+)	-	ODC 0%	MAL 8%	RIB 19%
GLU (+)	NIT (+)	NAG (+)	-	ARA 1 %	TUR 0%	ODC 0%
FRU (+)	VP (-)	TUR (+)	-	-	RIB 21%	βGAL 88%
MNE (-)	βGAL (-)	ARA (+)	-	-	-	NOVO 85%
MAL (+)	ArgA (-)	βGUR (+)	-	-	-	-

Ureasa, Arginina Dihidrolasa, Ornitina Descarboxilasa, Esculina (hidrólisis), Glucosa (fermentación), Fructosa (fermentación), Manosa (fermentación), Maltosa (fermentación), Lactosa (fermentación), Trehalosa (fermentación), Manitol (fermentación), Rafinosa (fermentación), Nitrato (reducción), Voges Proskauer, β Galactosidasa, Arginina Arylamidasa, Fosfatasa Alcalina, Pirrolidionil Arylamidasa, Novobiocina, Sacarosa (fermentación), N-acetyl-Glucosamina, Turanosa (fermentación), Arabinosa (fermentación), β Glucuronidasa, Ribosa (fermentación), Celiobiosa (fermentación).

Para *Staphylococcus haemolyticus*, existen 5 pruebas en contra, donde la urea y la L-arabinosa como sustrato, no son utilizados por la bacteria, la ribosa es utilizada débilmente, al igual que la enzimas ornitina descarboxilasas, mientras que la vía Voges-Proscauer, para producir acetil-carbinol es utilizada en la bacteria en un 95% y la galería muestra que es negativa. Este se relaciona con diferentes patologías como;

bacteriemias, sepsis, infecciones de heridas, infecciones urinarias y conjuntivitis. La denominación de *S. haemolyticus* se debe a su capacidad de hemólisis. (Arbeit, 1997)

Otra opción para la cepa C que se identifica en la galería es *S. simulans*, pero encontramos que la L-arabinosa, D-maltosa, D-turanosa no son sustratos utilizados por la bacteria, encontrándose en un rango de 0% y la ribosa es utilizada en un 21%.

S. Xyloxus es la última opción que muestra el programa de identificación con 7 pruebas en contra. Se observa que las enzimas ornitina descarboxilasa y arginina hidrolasa en dicha bacteria no se expresan y en la galería aparecen positivas. Caso inverso, sucede con la β -galactosidasa y la fosfatasa alcalina, la bacteria las produce en un rango del 80%, mientras que la galería las reconoce como pruebas negativas. La ribosa es débilmente utilizada como sustrato.

Para la prueba de sensibilidad a la novobiocina, tenemos que la bacteria es susceptible en un 85%, la galería la lee como prueba negativa, sin embargo, en las pruebas de sensibilidad que se realizaron con discos de novobiocina en agar LB-manitol, se registró alta sensibilidad (figura 3).

Las tres especies reportadas por los ensayos realizados con la galería ID 32 STAPH V2.0 están involucradas en patologías humanas y se les reconoce primariamente por la asociación a infecciones nosocomiales endógenas o exógenas. (De Paulis y col. 2003). Sin embargo, cualquiera de estas especies de *Staphylococcus* pudieran ser la cepa C, ya que éstas son especies ambientales, se caracterizan por presentar plasticidad para invadir cualquier hábitat y desarrollarse bajo condiciones de anoxia o en presencia de oxígeno, pueden desarrollar simbiosis como sucede en los mamíferos, encontrándose en la piel de

muchos de ellos (cerdos, vacas, hombre) (Holt y col., 1994), y en insectos como lo describe Bacot.

5.5 Caracterización Bioquímica de las bacterias encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*)

Una vez obtenido el crecimiento de las bacterias presentes en las arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*), en condiciones aerobias, se procedió a realizar la identificación mediante pruebas bioquímicas. En este grano se obtuvieron dos bacterias diferentes. De acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas (tabla 7), existe una similitud con la cepa C del tracto digestivo de los gorgojos de arroz. Ambas bacterias degradaron los mismos sustratos, acidifican la glucosa y son catalasa positiva.

Tabla 7. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*).

Pruebas	Cepa D	Cepa E
Gram	+	-
Catalasa	+	+
LB-manitol	+/G	NR
Novobiocina	S	NR
Oxidasa	NR	-
Kliger	NR	R/R
SIM	NR	-
Urea	NR	-
Citrato	NR	-
Acidificación de glucosa (BBA)	+	NR

NR: no se realizó; G: crecimiento; S: sensible; R: rojo.

No obstante, la cepa E es una Gram-, a diferencia de las demás bacterias encontradas. Su catalasa es negativa, esto es indicativo que la bacteria no contiene la enzima catalasa para la reducción del oxígeno.

En cuanto a la prueba de la oxidasa, se determinó que el microorganismo si presenta esta enzima a nivel intracelular. La reacción se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular. El que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones. (Macfaddin, 2000).

El medio kliger (agar con azúcar triple y hierro), resultó ser alcalinóalcalino, lo que indica que no fermenta la glucosa por ser una bacteria aerobia. Es un medio de cultivo diferencial que cumple dos propósitos; 1) determinación de la fermentación de carbohidratos; 2) determinación de H₂S. Para la determinación de la fermentación, este medio presenta dos azúcares, 1% de lactosa y 0,1% de glucosa. La fermentación se lleva a cabo en anaerobiosis (en el pico de flauta) como en la aerobiosis (en el taco). En el pico de flauta, la glucosa es catabolizada por la vía anaerobia de Embden-Meyerhof-Parnas, usado por microorganismos aerobios y anaerobios para producir el intermediario clave, el ácido pirúvico. Este ácido luego es degradado a través del ciclo de Krebs por aerobios y anaerobios facultativos para producir energía, CO₂ y H₂O (figura 7). (Macfaddin, 2000).

Cuando la fermentación es sólo de la glucosa, el resultado de la prueba es alcalino en el pico de flauta y ácido en el taco (rojo/amarillo). En la fermentación de glucosa y lactosa tanto el pico de flauta como el taco son ácidos (amarillo/amarillo). Puede que no exista la fermentación de ambos carbohidratos y ese es el resultado de nuestra prueba, dando alcalino-alcalino (rojo/rojo). Ciertas bacterias no pueden fermentar carbohidratos,

estas pueden estar presentes en el tracto intestinal, solo degradan peptonas que tenga el medio para su nutrición. (Macfaddin, 2000).

Con respecto a la producción de H_2S , se produce por los indicadores de este compuesto presente en el medio como el citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio. Al estar presente el H_2S , se observa una coloración negra dentro del tubo de ensayo, que no es más que sulfuro ferroso, también puede formarse burbujas y gases. En nuestro caso, no se obtuvo esta coloración, por lo tanto la cepa E no es capaz de producir ácido sulfhídrico. (Macfaddin, 2000).

A su vez, esta bacteria no es mótil, por la ausencia de cilios o flagelos. Por otra parte, es indol negativa, no presenta las enzimas triptofanasas, involucradas en la producción del indol, es decir, la bacteria no es capaz de separar el indol a partir del triptófano.

Con respecto a la urea, la cepa E no es capaz de hidrolizar la urea en amoníaco, por la ausencia de la enzima ureasa, una importante enzima microbiana que descompone los compuestos inorgánicos. Esta enzima se considera constitutiva, debido a que es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o ausencia del sustrato, en este caso, la urea. (Laine y col., 1996).

Por último, tenemos el citrato, que actúa como un sustrato como única fuente de carbono en el medio, para determinar si la bacteria es capaz de crecer en condiciones de alcalinidad, dicha cepa no degrada el citrato, probablemente, sea un microorganismo que no contenga un mecanismo de transporte o permeasas que permitan que el citrato penetre en el interior de las células. (Terragno y col., 2007).

5.6 Identificación de las cepas bacterianas encontradas en los granos de arvejas verdes partidas (*Pisum sativum*) mediante el Sistema de Identificación ATB Plus.

Cepa D

La cepa D encontrada en la arveja, por su morfología, pruebas bioquímicas e identificación por el sistema API TB Plus, resultó ser la misma que la cepa C obtenida en el tracto digestivo del gorgojo del arroz, mostrando tres posibles especies del género *Staphylococcus* como son *S. haemolyticus*, *S. simulans* y *S. xyloxyus*. Por lo cual, esta cepa será considerada como *Staphylococcus sp.*

Nuestras arvejas, fueron previamente tratadas con un lavado de 5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 3%, demostrando que el tiempo de lavado es corto, para lograr la esterilidad total y evitar el crecimiento microbiano. Además que la siembra bacteriana de las arvejas se realizó como un control, para probar si el *Staphylococcus* era una contaminación ambiental, o podía estar presente en el alimento, así que se realizó el experimento bajo los mismos parámetros de siembra del intestino del gorgojo de arroz.

Es un hecho bien conocido, que las bacterias pueden transferirse mediante el consumo de alimento, al tracto digestivo de diversos organismos de la escala zoológica. En el caso de neonatos lactantes, a través de la leche materna suelen transferirse bacterias lácticas al intestino virgen, que promueven el bienestar metabólico del infante a largo plazo. Estos microorganismos pueden establecerse en el hospedero mientras se suministre el alimento. (Ishibashi y col., 1997).

Cepa E

Mediante la galería ID 32 GN V3.0 se pudo identificar la cepa E, obteniendo un resultado con perfil aceptable, identificando a la bacteria como *Acinetobacter lwoffii*, como se observa en la tabla 8.

Esta bacteria Gram-, pertenece al grupo de las proteobacteria. Las especies de *Acinetobacter* son cocobacilos estrictamente aerobios, no fermentadores, no móviles, oxidasa negativos que se presentan en pares al microscopio. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza, siendo importantes en el suelo contribuyendo a su mineralización. (Ledermann, 1971). *Acinetobacter* es también una importante fuente de infección en los hospitales para los pacientes debilitados. Son capaces de sobrevivir en diversas superficies (tanto húmedas como secas) en el ámbito hospitalario. Ocasionalmente son aislados de los productos alimenticios y algunas cepas son capaces de sobrevivir sobre diversos equipos médicos e incluso sobre la piel humana sana. (Gerischer, 2008).

Tabla 8. . Resultados de la galería ID 32 GN V3.0 para la cepa E

Pruebas de la Galería			
RHA (-)	MNT (-)	FUC (-)	5KG (-)
NAG (-)	ACE (+)	SOR (-)	GLYG (+)
RIB (-)	LAT (+)	ARA (-)	mOBE (+)
INO (-)	ALA (+)	PROP (-)	2KG (-)
SAC (-)	MAN (-)	CAP (-)	3OBU (-)
MAL (-)	GLU (-)	VALT (-)	pOBE (-)
ITA (-)	SAL (-)	CIT (-)	SER (-)
SUB (+)	MEL (-)	HIS (-)	PRO +

Ramnosa, N-Acetyl Glucosamina, D-Ribosa, Inositol, D-Sacarosa, Maltosa, Itaconato, Suberato, Malonato, Acetato, DL-Lactato, L-Alanina, Manitol, D-Glucosa, Salicina, D-Melobiosa, L-Fucosa, D-

Sorbitol, L-Arabinosa, Propionato, Caprato, Valerato, Citrato, Histidina, 5CetoGluconato, Glicógeno, 3-hidroxiBenzoato, 2-CetoGluconato, 3-hidroxibutirato, 4-hidroxiBenzoato, L-Serina, L-Prolina.

Acinetobacter lwoffii (cepa E) no se transfirió al interior del gorgojo del arroz, probablemente porque la bacteria no puede sobrevivir a las condiciones de anaerobiosis parcial o total del tracto digestivo del coleóptero.

6 Formulación de películas comestibles a base de almidón de papa con *Bifidobacterium lactis* Bb12 como ingrediente probiótico.

La materia prima utilizada para realizar la base de las películas comestibles fue el almidón de papa y este fue extraído del tubérculo de manera convencional (AOAC, 2003). El único parámetro de la composición proximal estudiado fue la humedad que nos da una idea de la estabilidad del almidón en el tiempo. El almidón de papa nativo posee unos valores de humedad que se encuentran en el rango de 7,00% a 13,30%. En nuestro caso fue de 7,45%, este resultado concuerda con lo reportado por Hoover (2001) y Sangeetha (2006). El valor obtenido se encuentra dentro del rango óptimo para realizar películas comestibles (Singh y col., 2005), ya que, disminuye la probabilidad de crecimiento de microorganismos y permite una mejor secado, brindando una mayor integridad al vehículo. (Kester y Fennema, 1986).

El plastificante usado para las películas comestibles a base de almidón de papa fue el glicerol, a una concentración del 1,5% (v/v). Rojas (2007) realizó ensayos preliminares y describe que cuando se agregaba las bífidodacterias a la solución formadora de películas (SFP), observaba un cambio en la matriz del gel, retardando el tiempo de gelificación adecuada de las películas servidas en placas, por esto se procedió a colocar a la mezcla el glicerol, obteniendo películas más gruesas, firmes, elásticas y flexibles, debido a que reduce la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas

poliméricas del almidón incrementando así el espacio intramolecular. (Laohakunjit y Noomhorm, 2004).



Figura 9. Películas comestibles con el ingrediente probiótico *Bifidobacterium lactis* Bb12

En la figura 9, se puede apreciar que las películas comestibles con glicerol y bífidos, secadas en refrigeración a 4 °C durante 4 días, se despegan fácilmente de la placa de Petri por la flexibilidad conferida por el glicerol, además que a esta temperatura se logra mantener la viabilidad de las bifidobacterias.

Durante la producción de probióticos o alimentos funcionales con bifidobacterias, la viabilidad de las bacterias se ve afectada por la acidez del medio de cultivo, los procesos de secado por aspersión en frío y por la presencia de oxígeno en el empaque. De éstos, el ambiente ácido derivado de los procesos de fermentación es el principal factor que limita la viabilidad de las bifidobacterias. Durante el tránsito intestinal en seres humanos, las bifidobacterias deben sobrevivir a condiciones extremas de acidez en el estómago y a la inmediata presencia de sales biliares del duodeno para asegurar su funcionalidad. (Collado y Sanz, 2007; Ventura y col., 2007)

El pH es considerado como un indicador directo de la viabilidad de las bifidobacterias, se ha reportado que el rango de pH de 6,5 - 7 es óptimo para el

crecimiento de la bacteria, no crece a valores menores de 4,5 - 5 o mayores de 8 - 8,5 (Medina, 2002). Sin embargo, la sobrevivencia de las bifidobacterias a las condiciones de acidez varía entre especies y cepas. En nuestro caso el pH medido en la SFP que contenían ingrediente probiótico es de 5,19, un ambiente ácido para las bífidos, de acuerdo a lo descrito anteriormente.

No obstante, Berrada (1991) reporta el crecimiento de dos cepas comerciales de bifidobacterias, in vitro en medio que simula al jugo gástrico (pH 1- 2), se encontró, que una cepa fue inhibida en 0,5 unidades logarítmicas, mientras que para la otra, el crecimiento declinó hasta en 4 unidades logarítmicas. En un modelo experimental de simulación del tracto gastrointestinal, *B. bifidum* mostró ser tolerante a la acidez cuando el pH disminuyó de 5,0 a 1,8 en un período de 80 min, con un 20% de activa de *B. lactis* permaneció sin cambio a pH 3,0 durante 180 min, declinando lentamente a pH 2,0 y hasta cero a pH de 1,0 en 60 min. (Pochart y col. 1992).

6.1 Microscopia electrónica de barrido de las películas a base de almidón de papa con *Bifidobacterium lactis* Bb12.

Para demostrar la presencia de *Bifidobacterias lactis* Bb12 en las películas comestibles a base de almidón de papa, se realizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB), que caracteriza la topografía de una muestra. Debido a su gran profundidad de campo hace que pueda observarse en foco, los componentes de la muestra contenida en dicha distancia (Urbina y col., 1997).

En esta imagen (figura 10A), podemos observar la integridad de la superficie de la película comestible, mostrando una textura casi lisa, lo que permite distinguir fácilmente a los bífidos que se encuentran dispersas en la película. Esta figura, también muestra que el ingrediente probiótico se encuentra tanto expuesto en la superficie (ver

círculos) de la película como en el interior de la misma, mostrando pequeñas elevaciones del rastro de la bacteria (ver flechas).

En la figura 10B, observamos una bífido en forma de bacilo bien definida, encontrándose solitaria sobre la superficie de la película. A pesar de que los dos gramos de bífidos fueron homogeneizados en la solución formadora de películas, las bacterias toman una distribución al azar dentro de la mezcla y al secarse, se pueden encontrar en muchas disposiciones, ya sean dispersas, solitarias o agrupadas, como es el caso de la figura 10C, (ver recuadros), donde las bífidos se encuentran formando racimos, encontrando gran concentración de estos microorganismos.

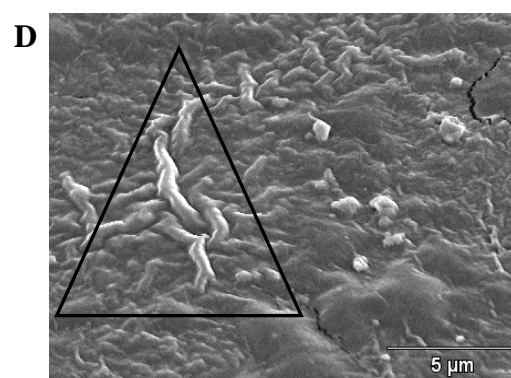
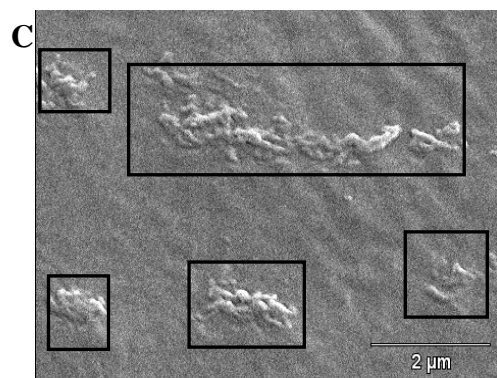
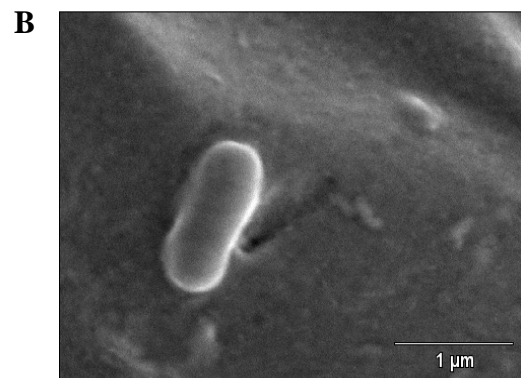
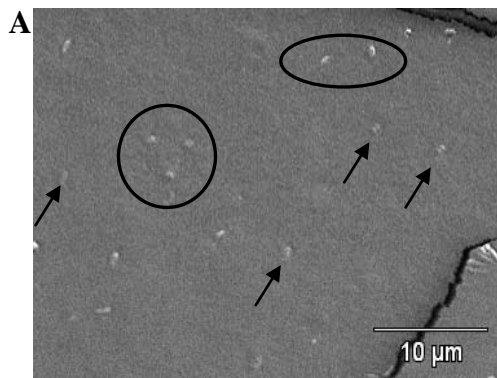


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de las películas comestibles con el ingrediente probiótico *Bifidobacterium lactis* Bb12. A, B y C, superficie de la película. D, parte posterior de la película.

En la figura 10D, observamos un campo repleto de bífidos, se encuentran dispuestas en forma de cadenas y se puede apreciar la bifurcación que caracteriza a estos microorganismos (ver triángulo). Esta parte de la película, es la cara posterior, que se encuentra pegada a la cápsula de Petri, a diferencia de las imágenes anteriores, podemos observar que la película presenta una textura rugosa, con una mayor concentración aparente de bífidos. En esta cara, la mayor parte de las bacterias, se depositan en el fondo, lo cual es un comportamiento esperado, ya que estos microorganismos son anaerobios y al estar sedimentados en la película, se encuentran en un ambiente anaerobio parcial, que favorece la viabilidad de las bacterias.

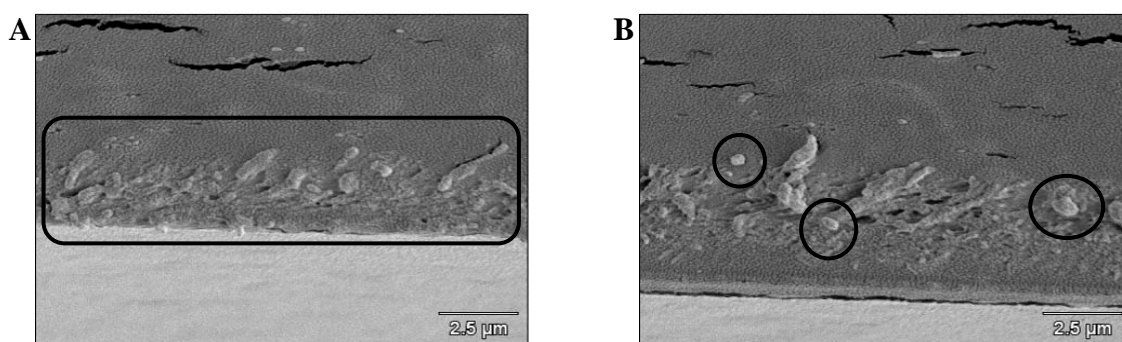


Figura 11. Microscopía Electrónica de Barrido de las películas comestibles con el ingrediente probiótico *Bifidobacterium lactis*. Observación del canto de la película (corte transversal)

En la figura 11A, observamos un racimo de bifidobacterias en la sección transversal de la película (canto), se distinguen bacilos expuestos y otros en el interior de la película (ver rectángulo, figura 11A), encontrándose dispuestas de varias maneras. En la imagen 11B, se observa la cara frontal de varios bífidos, donde el resto de su cuerpo se encuentra embebido en el interior de la película, por lo tanto, estamos viendo la cara

transversal de la bacteria, es por esto que visualizan en formas redondeadas (ver círculos, figura 11B).

7 Efecto de las películas formuladas sobre algunos biomarcadores como son la supervivencia, la variación de peso y la composición corporal del gorgojo de arroz.

7.1 Supervivencia

Una vez formuladas las películas comestibles a base de almidón de papa con y sin el ingrediente probiótico, se procedió a evaluar el efecto que tienen estas dietas, junto a los controles de calidad para el experimento, representados por el ayuno (control negativo) y la arveja (control positivo).

En la figura 12 se muestra, la supervivencia de los gorgojos para cada una de las dietas ensayadas durante 12 días. La mayoría de los experimentos llevados a cabo con el bioensayo, tienen una duración de 8 días, este tiempo es suficiente para que ocurran cambios metabólicos en el animal, como una consecuencia del tipo de alimentación suministrada. Sin embargo, se extendió los días de estudio, para ubicarlo dentro del mismo tiempo de los experimentos de transferencia de las bifidobacterias al interior del intestino del animal (ver más adelante).

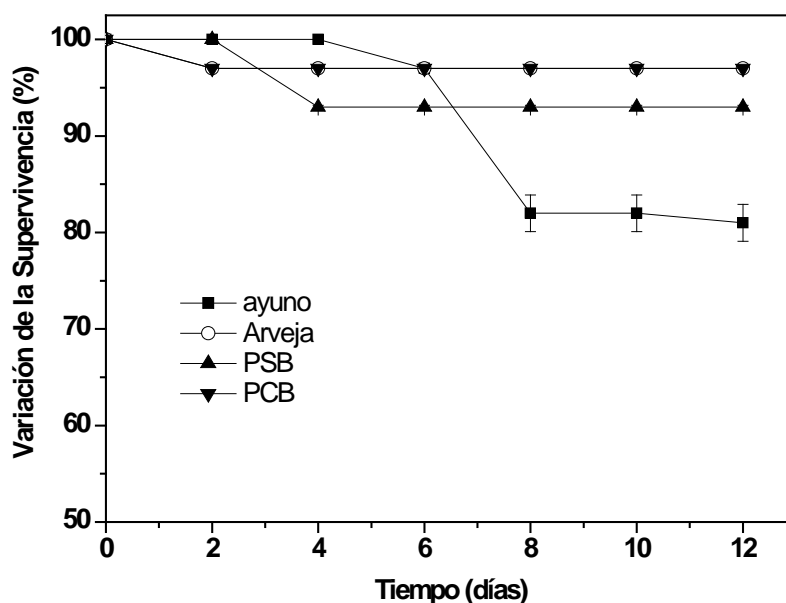


Figura 12. Supervivencia del *Sitophilus oryzae* alimentados con películas comestibles a base de almidón de papa con y sin *Bifidobacterium lactis* Bb12. PSB= Películas sin bífidos;
PCB= Películas con bífidos

Al observar la supervivencia de los insectos para cada dieta (figura 12) nos damos cuenta que en el ayuno, la mortalidad se manifiesta a partir del sexto día. En este tiempo, la reserva de alimento contenida en el buche se agota (Carmona y col., 2001) y comienzan los procesos de degradación de metabolitos, que conlleva un ayuno prolongado (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998). La supervivencia para el día 12 es de un 80%, sin embargo, los resultados reportados por Ortiz (2010), muestran una elevada mortalidad para el mismo tiempo del bioensayo, obteniendo una supervivencia del 9%. Probablemente la diferencias observadas se deban al peso del animal, para nuestro ensayo se tomaron individuos adultos de 1,8 mg de peso promedio. Esta elevada supervivencia, solo significa que los insectos pueden resistir a la falta de alimentos y agua, por periodos prolongados. Esto es posible por el almacenamiento de alimentos en el buche y por la utilización de la grasa y el glucógeno, presentes en los cuerpos grasos, que constituyen un centro metabólico importante para el animal, sobre todo en condiciones de estrés. (Terra, 2003).

La arveja representa un alimento con alta calidad nutricional, debido su elevado contenido de nutrientes. No es tóxica para el animal, por lo cual se utiliza como un alimento, en donde se mantienen a los insectos en el laboratorio satisfactoriamente (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). Los insectos alimentados con dicha leguminosa, presentan una supervivencia del 97% a los 12 días de experimento (figura 12), esto significa que el 3% de la población muere y en valores absolutos, 1 de cada 30

individuos muere. No obstante, la supervivencia observada para experimentos de 8 días es de 100% (Rojas, 2007), esta pequeña variación de dicho parámetro puede deberse al estado fisiológico intrínseco de un individuo dentro de la población, que no es posible detectarlo al inicio del experimento cuando se pesan los animales.

En cuanto a las películas comestibles a base de almidón de papa, observamos que la supervivencia disminuye a partir del segundo día, manteniéndose estable hasta el final del experimento, con una supervivencia de 93% (figura 12). Esta tendencia muestra que las dietas a base de almidón de papa no tienen un impacto deletéreo sobre los insectos si lo comparamos con el ayuno (Rojas, 2007). Lo que permite inferir que esta dieta rica en carbohidratos disponibles (Hernández, 2006), es aprovechada por el insecto y sirve como una buena fuente de energía para su mantenimiento, sin embargo, la presentación del alimento es importante para la ingesta del mismo. (Acciacaferri, 2001), ya que los gorgojos del arroz están adaptados a alimentarse del grano y lo aprovechan para depositar sus huevos una vez que lo horadan. Probablemente cuando se les presenta la película comestible como alimento, pueden pasar por un periodo de adaptación y dependiendo del individuo, pueden o no comerla.

En el caso de los insectos que están consumiendo películas comestibles con el ingrediente probiótico, observamos una supervivencia que es igual que el control positivo (97%), este valor es mayor que el registrado para la película sin bífidos. El ingrediente probiótico tiene un efecto positivo sobre los gorgojos, que se puede ver bajo dos puntos de vistas; de un lado, el hecho de incluir bífidos en las películas comestibles, se puede considerar que el insecto está consumiendo una mayor cantidad de biomasa, como se discute más adelante. Por otro lado, si estas bacterias son transferidas al tracto

digestivo del insecto, podría estar repercutiendo en el aumento de la absorción de los nutrientes en el *S. ozyae*, al igual que sucede en humanos. (Gibson y Wang, 1994).

7.2 Variación de Peso

El peso corporal es un parámetro, que permite evaluar el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Este se determinó, relacionando el peso de las poblaciones dividido entre los individuos que sobrevivieron a las diferentes dietas, con el peso al día cero para cada tratamiento, expresado en porcentaje (Carmona y col., 1998). La variación de peso fue registrada cada 48 horas hasta el final del experimento y se encuentra representada en la figura 13.

En dicha figura, se observa que la mayor disminución de peso se encuentra en los gorgojos bajo la condición de ayuno, mostrando una variación de peso del 68% de su peso inicial, además, el ayuno resultó ser estadísticamente diferente al resto de las dietas (tabla 9). A pesar de que los insectos utilizan sus reservas, de trehalosa, glucógeno, lípidos para el sustento de la vida, estas no son suficientes para impedir la disminución del peso corporal.

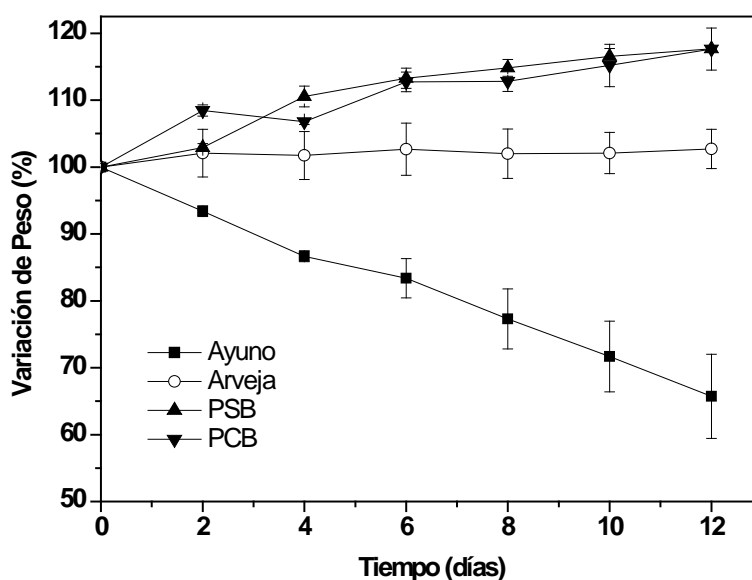


Figura 13. Variación de peso del *Sitophilus oryzae* alimentados con películas comestibles a base de almidón de papa con y sin *Bifidobacterium lactis* Bb12. PSB= Películas sin bífidos; PCB= Películas con bífidos

Con respecto a la arveja (figura 13), se observó un aumento de peso de 3%, con respecto a los valores iniciales. El incremento de peso reportado para experimentos de 8 días varía entre un 3% - 10%, Galeno (2006), Lovera (2008), Rojas (2008) y para experimentos de 12 días de duración Ortiz (2010), reporto valores de peso se ubican en el rango antes mencionado. Asimismo, los resultados de supervivencia y variación de peso indican, que la ingesta de nutrientes proporcionados por la arveja, son utilizados por los insectos para mantener las condiciones fisiológicas óptimas para el funcionamiento del organismo.

En cuanto a las películas comestibles con y sin bífido, observamos en los insectos una ganancia de peso mayor que el control positivo, llegando casi al 20% de aumento de peso por individuo (figura 13). Asimismo, Rojas (2007) destaca que las películas comestibles con y sin ingrediente probiótico, presentan un incremento de peso superior al control positivo, sin embargo las diferencias entre estas dietas, no son significativas. Por el contrario, en este trabajo si se encontró diferencias significativas entre las películas antes mencionadas y la arveja (tabla 9).

7.3 Variación de la composición corporal en *Sitophilus oryzae* alimentados con películas comestibles con y sin *Bifidobacterias lactis* Bb12

La composición corporal, representa el estudio del contenido de agua, grasa, proteínas y carbohidratos, en el insecto. Estos parámetros son utilizados para medir los cambios fisiológicos producidos en el organismo, que varían de acuerdo a los nutrientes ingeridos por la dieta (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). De hecho, ellos constituyen

una medida indirecta del metabolismo (Carmona y col., 1998; Millán y Carmona, 2005), ya que, el alimento una vez ingerido, es atacado por la acción de enzimas digestivas y los monómeros conformacionales básicos obtenidos, son absorbidos en el intestino, siendo transportados por diferentes rutas metabólicas. Dependiendo de las condiciones fisiológicas del animal, estos pueden utilizarse: para la obtención de energía o para moléculas de reserva de energía, para el recambio tisular y para la formación de metabolitos.

La tabla 9 muestra los valores de obtenidos de los parámetros medibles de la composición corporal con sus respectivas desviaciones estándar.

7.3.1 Contenido de agua corporal

El agua corporal es un parámetro que representa el 50% del peso del insecto (Forbes, 1997). La pérdida de agua puede ser compensada de varias formas: por el consumo de agua propiamente dicha, de la ingesta de alimentos y por la producción de agua metabólica. Esta se produce cuando el oxígeno, aceptor final de la cadena transportadora de electrones, comparte sus electrones con los hidrogeniones producidos durante dicho proceso. (Lehninger, 2000).

En la figura 14, se muestra el contenido de agua corporal para las diferentes dietas, en ella se puede observar que no hay diferencia significativa (tabla 9), entre el agua corporal de los gorgojos que fueron alimentados con arveja ($57,00\% \pm 2,30$) y los que se mantuvieron en ayuno ($55,69\% \pm 1,22$). Por otro lado, también se observa un incremento del agua corporal (9,75%), en los insectos que ingirieron películas comestibles sin bífidos. Este incremento del agua corporal es significativamente diferente de todos los demás tratamientos (tabla 9).

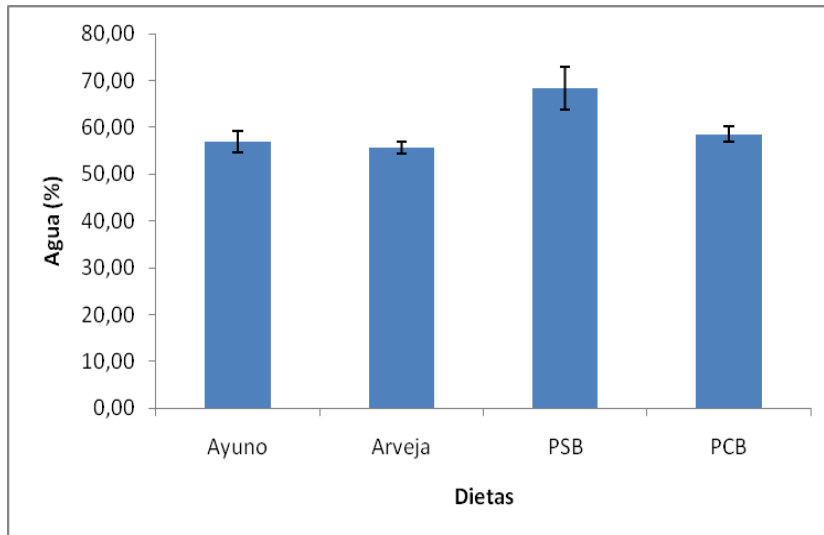


Figura 14. Porcentaje de agua corporal en gorgojos de arroz alimentados con diferentes dietas. PSB: películas sin Bífidos; PCB: películas con *Bifidobacterium lactis* Bb12

Los insectos poseen un sistema osmorregulador del agua muy eficiente, debido a que poseen órganos especializados como los Túbulos de Malpigi. (Klowden, 2007), como órganos excretores, reabsorben agua y sales de la hemolínfa del insecto (Terra y Ferreira, 2003). Los insectos que se encontraban en ayuno, provenían de arvejas verdes partidas, quizás, la reserva de nutrientes que presentaban estos animales se tradujo en agua corporal metabólica de reserva, evitando la mortalidad de todos los individuos, esto podría explicar el hecho de que no se haya encontrado diferencias significativas entre las poblaciones de insectos sometidos a la condición de ayuno y la arveja.

Por otro lado, el aumento de agua encontrado en los insectos alimentados con películas comestibles sin bífidos, se corresponde, con el contenido de agua proporcionada por la película. Es probable que los espacios intramoleculares de las películas sin bífido presenten mayor cantidad de agua, lo que significa un mayor suministro de agua para los insectos, en cambio, en las películas con el suplemento probiótico, dichos espacios estarían ocupados por las bifidobacterias, restándole el agua a la película.

7.3.2 Grasa corporal.

El contenido de grasa corporal es un biomarcador importante para el estudio de los efectos producidos por el contenido de nutrientes de las dietas, particularmente en el estudio de la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados de apio y plátano (Galeno, 2006) y en larvas de *Tribolium castaneum*, donde se demuestra el efecto del alcohol sobre la acreción grasa. (Millan, 2005).

En la figura 15, se observa que los insectos en ayuno, disminuyeron el contenido de lípidos en un 35% ($3,90\% \pm 0,69$), con respecto a aquellos alimentados con arvejas ($6,08\% \pm 0,50$), esto es indicativo de la movilización de la grasa para mantener las funciones vitales del gorgojo. Asimismo, estos dos tratamientos son estadísticamente diferentes (tabla 9).

Para los gorgojos alimentados con las películas comestibles, hubo un aumento de grasa de aproximadamente 50%, si lo comparamos con la población del control positivo (dietas arveja) (figura 15). Este incremento significativo de la grasa podría atribuirse a: 1) La gelatinización del almidón para la fabricación de las películas, lo hace más biodisponible; 2) El glicerol contenido en la SFP. Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de insectos alimentados con películas comestibles con bífidos ($10,78\% \pm 1,18$) y aquellas alimentadas con películas sin bífido ($11,45\% \pm 2,90$) (tabla 9).

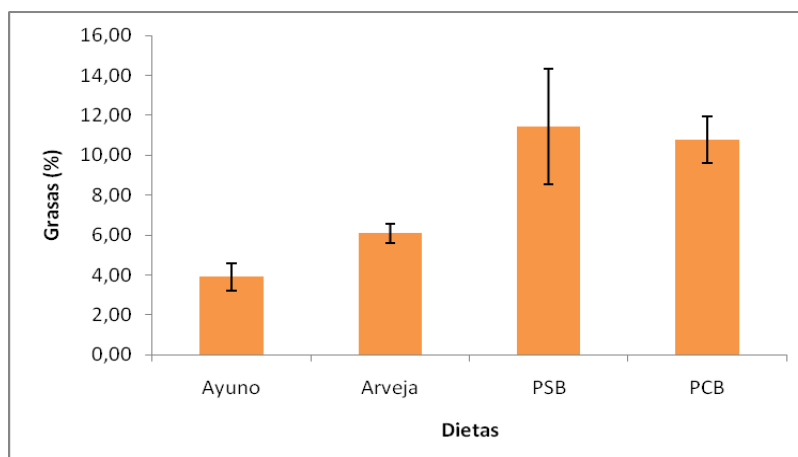


Figura 15. Porcentaje de grasa corporal en gorgojos de arroz alimentados con diferentes dietas. PSB: películas sin Bífidos; PCB: películas con *Bifidobacterium lactis* Bb12

Rojas (2007) reportó para experimentos realizados en 8 días, que los insectos alimentados con películas con bífido mostraron un aumento en el contenido de grasa del animal, mientras que, los insectos que consumían películas de almidón de papa disminuían su contenido graso ($21,1\% \pm 1,07$ PCB/ $20,2\% \pm 2,36$ PSB), encontrando diferencias significativas entre los dos tratamientos. En nuestro trabajo, no existen diferencias significativas entre los tratamientos antes mencionados, además, el contenido de grasa de las películas ensayadas y en el tiempo de duración del experimento (12 días) son diferentes, como se muestra en la figura 15.

7.3.3 Contenido de nitrógeno proteico.

Las proteínas de una dieta sirven como combustible metabólico, compensan las pérdidas obligatorias de nitrógeno y suministran aminoácidos suficientes para que ocurra la síntesis de proteínas corporales (Torun, 1989, citado por Carmona y col., 2001). El método más asequible para determinar el contenido de proteínas corporales, es medir el nitrógeno corporal y establecer una proporcionalidad entre esta medida y el contenido de nitrógeno de las proteínas (Lopez y col., 2002).

La figura 16, muestra que en gorgojos bajo la condición de ayuno, los valores de nitrógeno protéico son mayores ($1,11\% \pm 0,06$), que en las poblaciones de insectos alimentados con arvejas ($0,94\% \pm 0,12$) y estas dietas son estadísticamente diferentes

(tabla 9). Analizando este resultado en conjunto con el obtenido para la grasa corporal, se puede inferir que los insectos que sobreviven a los ayunos utilizan primero la grasa corporal y preservan las proteínas, con lo cual aseguran el mantenimiento de las funciones vitales para su supervivencia.

Por otra parte, el contenido de nitrógeno proteico en insectos alimentados con películas comestibles con bífidos ($0,82\% \pm 0,17$) es similar al contenido de nitrógeno de los gorgojos que ingieren arvejas. Sin embargo, es menor al de los insectos alimentados con películas comestibles sin bífidos ($1,26\% \pm 0,42$), siendo este valor diferente estadísticamente al de las películas con bífidos.

Carmona (1997), demostraron que los gorgojos alimentados con dietas aprroteicas cubren los requerimientos energéticos, más no los proteicos. Asimismo, al no ser utilizadas las proteínas corporales con fines energéticos, los carbohidratos de la dieta, ejercen un efecto protector sobre dichas proteínas. (Millan y Carmona, 2005).

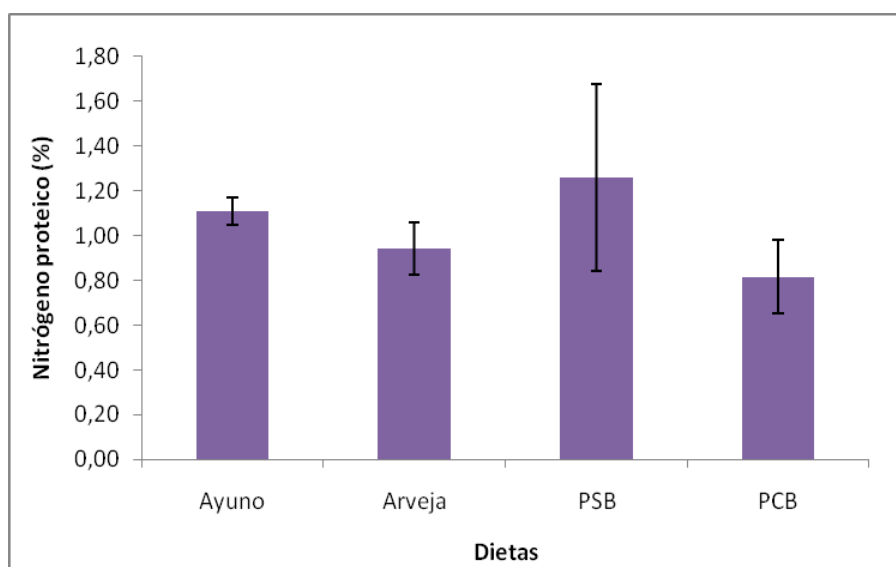


Figura 16. Porcentaje de nitrógeno proteico en gorgojos de arroz alimentados con diferentes dietas. PSB: películas sin Bífidos; PCB: películas con *Bifidobacterium lactis* Bb12

Las películas comestibles estudiadas, son dietas donde existe un desbalance de nutrientes, una de ellas, está constituida únicamente por almidón de papa, es decir, una dieta aproteica, y la otra al contener bífidos, podría considerarse esencialmente proteica. Esto se observa claramente, en experimentos de 8 días de duración, realizados con películas comestibles de papa, donde el contenido de nitrógeno es mayor en las películas con bífidos (Rojas, 2007). Sin embargo, cuando se realiza un experimento de más larga duración no parece cumplirse lo anteriormente expuesto, probablemente por la disminución de la viabilidad que sufren los bífidos, en el tiempo que dura el ensayo.

Por último, el nitrógeno cuticular y la variable “otros” son parámetros estudiados en la composición corporal. El nitrógeno cuticular es una estimación del nitrógeno proveniente de la quitina y/o proteínas que conforman el exoesqueleto del insecto. Este no tiene significado metabólico per se, ya que, no se ve influenciado por la dieta si no por la edad del animal. Es por esto que no se discute en este trabajo, sin embargo, los valores se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Peso promedio y composición corporal de los gorgojos alimentados con películas comestibles a base de almidón

Dietas	Peso promedio al día 12 (mg)	Agua (%)	Grasa (%)	NP (%)	N C (%)	Otros (%)
Ayuno	1,23 ± 0,09 ^a	57,00 ± 2,30 ^a	3,90 ± 0,69 ^a	1,11 ± 0,06 ^a	4,42 ± 0,45 ^a	37,11 ± 3,03 ^a
Arveja	2,42 ± 0,11 ^b	55,69 ± 1,22 ^{ac}	6,08 ± 0,50 ^b	0,94 ± 0,12 ^b	3,44 ± 0,07 ^b	37,45 ± 3,83 ^{ac}
PSB	2,18 ± 0,10 ^c	68,28 ± 4,60 ^b	10,78 ± 1,18 ^c	1,26 ± 0,42 ^{ab}	3,31 ± 0,18 ^{bc}	20,79 ± 5,27 ^{ad}
PCB	2,12 ± 0,12 ^c	58,53 ± 1,59 ^{ad}	11,45 ± 2,90 ^{c,d}	0,82 ± 0,17 ^{cb}	5,28 ± 0,05 ^d	26,64 ± 2,13 ^{bd}

El peso promedio al inicio del ensayo (día 0) fue de 1,88 ± 0,13 mg para todas las dietas. Los valores representan X ± DS (n = 4). PSB: películas comestibles sin *Bifidobacterium lactis* Bb12, PCB: película comestible con *Bifidobacterium lactis* Bb12, NP: nitrógeno proteico, NC: nitrógeno cuticular. Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0,05). Anova de una vía.

Por otra parte, la variable “otros”, agrupa todos los parámetros que no fueron medidos (esqueletos carbonados de los compuestos, carbohidratos, cenizas y minerales). Este parámetro no fue discutido porque es variable entre las dietas estudiadas y no aporta una información específica, de los cambios producidos por la dieta (tabla 9).

8 Valoración con la película formulada con el ingrediente probiótico el contenido de proteína como indicador del aporte de biomasa.

Para estimar la biomasa de bífidos presentes en las películas comestibles, se realizó el análisis de proteína cruda, encontrándose $3,26\% \pm 0,06$ de proteína que para 2 gramos de películas con bífidos. Dicho resultado se aproxima al valor reportado por Rojas (2007), de 3,5% para la misma película. Este autor considera, que el elevado contenido en proteínas proporcionado por las bacterias a la película, es prometedor para incluirlas en la fabricación de diversos alimentos.

A la fecha existen pocos reportes en la literatura relativos a la adición de probióticos con el objeto de diseñar películas y coberturas comestibles funcionales. La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El uso de probióticos constituye un intento deliberado de modificar la relación con nuestro medio ambiente microbiano inmediato, de formas que beneficie la salud humana. (Tapia, 2007).

8.1 Viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb12 mediante recuento microbiológico en las películas comestibles.

Para medir la viabilidad de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 en las películas comestibles a base de almidón de papa, se realizó un recuento bacteriano, expresado como el logaritmo de la unidad formadora de colonia (UFC) por gramo de película, en función del tiempo.

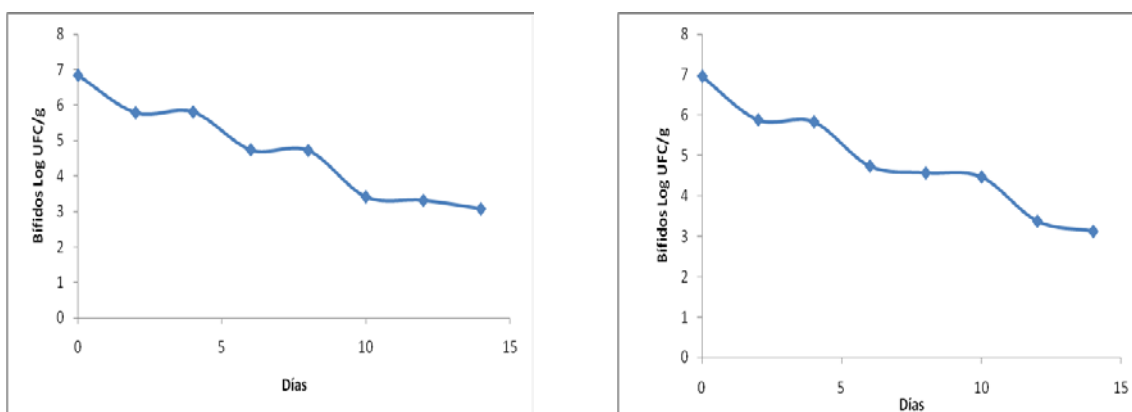


Figura 17. Viabilidad de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 en la película comestible a base de almidón de papa. **A:** ensayo 1; **B:** ensayo 2

Podemos observar en la figura 17 A y 17 B, dos ensayos de viabilidad realizados. Para ambos experimentos se partió de un inóculo de 10^8 bacterias/mL. El criterio que se tomó para el conteo de los bífidos fue de 25 a 250 colonias por cada dilución. El recuento obtenido para el día cero para los ensayos 1 y 2 fue de 6,8 Log UFC/g y 6,95 Log UFC/g respectivamente. A medida que transcurre el tiempo la viabilidad de estas bacterias fue disminuyendo paulatinamente hasta el día 14, donde se encontraron apenas, un centenar de colonias viables.

Rojas (2007) reporta que el título inicial (día 0) para las bífidos incluidas en el almidón de papa fue de 11,3 Log UFC/g y para el día 8 no se encontraron bacterias viables. Estos resultados difieren a los observados en el presente trabajo, donde el título

inicial fue más bajo y la viabilidad en el día 8 fue 4,8 Log UFC (ensayo1) y 4,47 Log UFC (ensayo 2). Estas diferencias probablemente, se deban a la cantidad de bifidobacterias utilizadas por Rojas (2007), efectivamente, este tomó 2% de bífidos para fabricar las películas. Por lo cual podríamos inferir, que un sustrato pobre con una elevada concentración de bífidos, conduciría más rápidamente a la mortalidad de las mismas. Este hecho se evidencia, cuando la concentración de los bífidos es de 1% y en la película son incluidos prebióticos (inulina y oligofructosa), que son utilizados como alimento por las bacterias. Esto trae como consecuencia que la viabilidad mejora en un ciclo logarítmico, y las bifidobacterias se mantienen vivas en la película durante 15 días. (Ortiz, 2010).

Con el fin de comprobar si nuestros resultados de viabilidad son iguales para diferentes periodos de tiempo, se aplicó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado (X^2). El valor de X^2 fue de 0,999, para 7 grados de libertad y 95% de confianza. Como el valor del estadístico de prueba está muy por debajo de los grados de libertad, se acepta la hipótesis nula; no existe diferencia significativa de la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb12 entre los dos ensayos. Podemos concluir que la variable periodo de tiempo no afecta la reproducibilidad de los mismos.

8.2 Transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 mediante recuento microbiológico en el tracto digestivo del gorgojo de arroz

La transferencia de bifidobacterias al intestino del gorgojo de arroz se realizó en paralelo con la viabilidad de las bacterias, para garantizar el mismo contenido del microorganismo en las películas. Para este experimento, se midió la concentración de bífidos que se transfieren de la película comestible al intestino del *Sitophilus oryzae*. Además, 2 grupos de insectos fueron alimentados con películas con bífidos y con

películas sin bífidos simultáneamente. Al cuarto día se realizó un cambio de dieta, es decir los que comían películas con el probiótico, se alimentaron con la película sin bífidos y viceversa (figura 18). El tiempo de 4 días, fue elegido para el cambio de dieta porque en anteriores investigaciones se demostró que la máxima cantidad de bacterias transferidas se encontraban en el rango de 3 - 5 días. (Rojas, 2009; Ortiz, 2010).

Al igual que en los ensayos de viabilidad, la transferencia se realizó 2 veces y se encuentran representadas en la figura 18. Cuando el insecto consume películas con bífidos al inicio del experimento (círculos llenos), vemos que la cantidad de bacterias que son transferidas al tracto digestivo del gorgojo aumenta rápidamente en dos días, y se alcanza un plató a los 4 días. Con el cambio de dieta (círculos vacíos), se puede observar que el título de bacterias que se encuentra en el intestino del animal disminuye sustancialmente hasta el día 14. Esto sugiere un efecto de lavado de las bífidos parecido al que ocurre en humanos (figura 18B). (Gibson y Wang 1994).

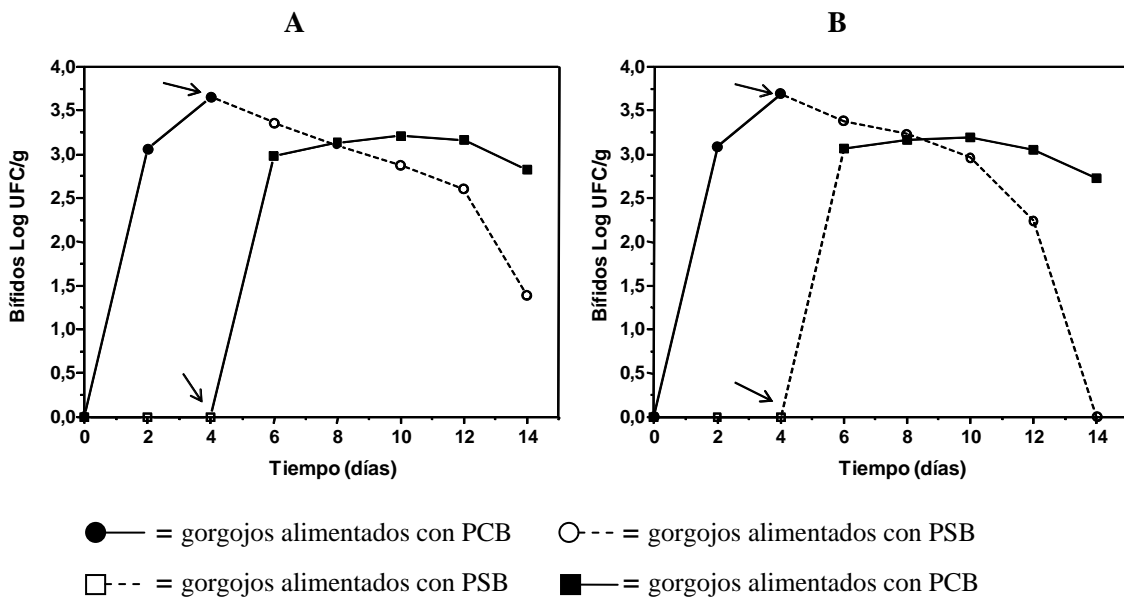


Figura 18. Transferencia de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 de la película comestible a base de almidón de papa al tracto digestivo del gorgojo de arroz. Las flechas indican el cambio de dieta. PSB= películas sin bífidos; PCB= películas con bífidos; A= experimento 1; B= experimento 2. La dieta se intercambió al día 4.

Por otro lado, la curva representada por cuadros (figura 18), simboliza a los insectos que inicialmente comen la película sin bífidos por 4 días. Cuando se les cambió la dieta a películas con bífido, se comienza a observar el incremento en el título de la bacteria transferida al intestino de los gorgojos (cuadros llenos). Esta segunda transferencia, para el día 4, es aproximadamente igual a la de los gorgojos alimentados inicialmente con películas con bífidos (3 Log UFC/g), en el día 2, sin embargo, no se alcanza los valores de transferencia del día 4, para la misma película. Esto podría explicarse porque la viabilidad de los bífidos en las películas va disminuyendo a partir del día 6, de un ciclo cada 2 días (figura 18).

Mediante la prueba de Chi-cuadrado se compararon los resultados de transferencia de bífidos al tracto digestivo del gorgojo de arroz del ensayos 1 y 2 (figura 18 A y B), ya sea, cuando comenzaron a alimentarse con películas con bífidos los primeros cuatro días y con película sin bífido en el resto del experimento; como aquellos alimentados con película sin bífidos los primeros 4 días y con bífidos el tiempo restante del ensayo. En ambos casos el X^2 fue 0,999, para 7 grados de libertad y un 95% de confianza, indicando que son similares estadísticamente. Al igual que para la viabilidad, esta prueba se realizó con el fin de saber si el factor periodo de tiempo en la realización de los ensayos afectaban el experimento.

García y col. (2006) cultivaron el contenido del tracto intestinal de la *Apis mellifera* (Hymenoptera) y del polen. De acuerdo a las características macroscópicas, microscópicas y las pruebas bioquímicas de utilización de sustratos, se identificaron bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* y *Arthrobacter*. Los resultados obtenidos sugieren que el contenido del tracto intestinal de las abejas recién nacidas muestra una baja diversidad

de bacterias en relación con las forrajeras, que sugiere un incremento a medida que la abeja asume su papel de obrera. En cuanto al intestino de las abejas adultas y el polen maduro, algunas de las bacterias aisladas (*Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*) son comunes para ambas muestras, sugiriendo que las abejas pueden ir adquiriendo su microbiota normal por medio del alimento.

De acuerdo con varios autores (Guilliam, 1997; Jeyaprakash y col., 2003), *Lactobacillus* se encuentra registrado como parte de la microbiota bacteriana de *A. mellifera*. Esta bacteria se aisló de las muestras de polen joven, donde este microorganismo participa en las primeras etapas de su fermentación. La importancia de la microbiota en este insecto, tiene que ver con el proceso de transformación del polen para hacer posible su digestión por parte de las abejas. (Guilliam, 1997).

Podemos concluir, que las películas comestibles actúan como un vehículo para transferir las *Bifidobacterium lactis* Bb12 al tracto digestivo de los gorgojos de arroz, así como, las *Lactobacillus* se transfieren al tracto digestivo de las abejas mediante el polen.

8.3 Experimento piloto

Los resultados antes mostrados de composición corporal para un experimento de 12 días con gorgojos alimentados con películas con o sin bífidos, nos dan una idea de lo que ocurre con los parámetros corporales, en un periodo de ingesta más prolongado que los experimentos habituales para dicho bioensayo. Sin embargo, dichos resultados no pueden explicar lo que ocurre durante la transferencia. Para ello se realizó la composición corporal de insectos en el día 0, a los 4 días y a los 12 días del experimento

en paralelo con el ensayo 2 de la transferencia, siendo un valor agregado en el trabajo, ya que se realizó una sola vez y no presenta desviación estándar (figura 19 y figura 20).

Una manera de vislumbrar los cambios observados por algún tratamiento en particular, es comparando los valores observados, con los valores basales del insecto antes de comenzar el experimento o en el cambio de dieta. Los valores basales están representados por el día 0, insectos alimentados con arveja y los valores obtenidos cuando se cambió la dieta (día 4), gorgojos alimentados con película bífidos (figura 19) o sin bifidobacteria (figura 20).

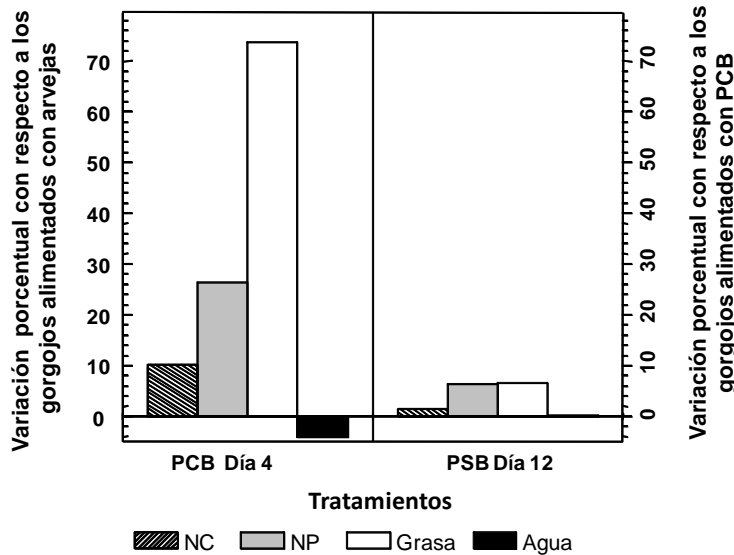


Figura 19. Variación porcentual de la composición corporal en gorgojos alimentados con películas con bífidos (PCB) y con películas sin bífidos (PSB). NC= Nitrógeno cuticular; NP= Nitrógeno proteico. La línea cero, representa los niveles basales de los parámetros corporales, al día 0 o los niveles basales de los gorgojos alimentados con PCB, al día 4.

En la figura 19, podemos observar el efecto sobre la composición corporal de los insectos alimentados con la película con bífido. De hecho, observamos que el cambio porcentual de grasa (74%) y de nitrógeno proteico (26%) incrementan con respecto a los valores basales de los gorgojos alimentados con arveja. Sin embargo, el contenido de agua disminuye en un 3%. Por otra parte, cuando se comparan los valores basales

alcanzados por los parámetros corporales a los 4 días (películas con bífidos), con aquellos valores obtenidos para 7 días de alimentación con película base (día 12 del experimento), observamos que tanto para la grasa, como para el nitrógeno proteico se produce un aumento del 6%. El agua y el nitrógeno cuticular presentan valores similares a los basales. De acuerdo a lo antes descrito, los cambios más importantes cuantitativamente, ocurren cuando se pasa de una dieta de arvejas a una con película con bífidos.

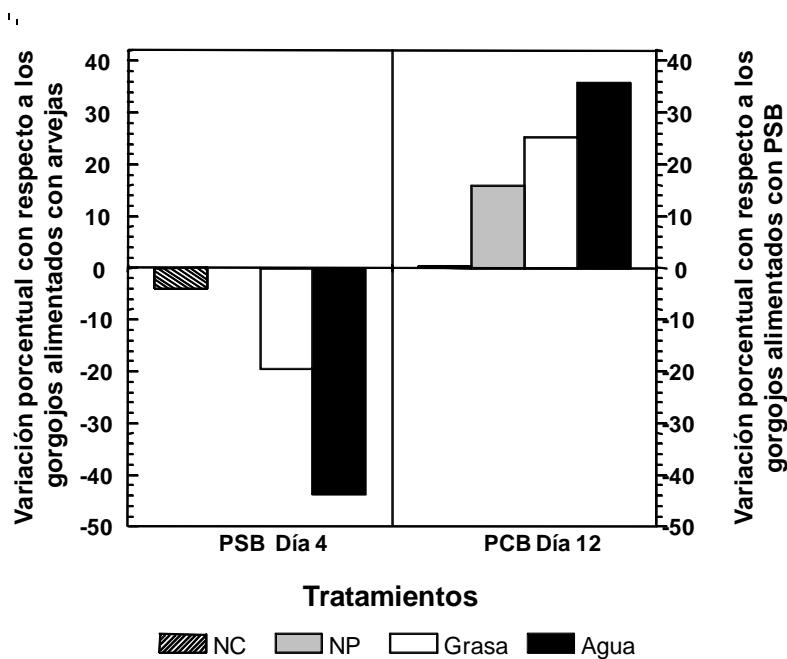


Figura 20. Variación porcentual de la composición corporal en gorgojos alimentados con películas sin bífidos (PSB) y con películas con bífidos (PSB). NC= Nitrógeno Cuticular; NP= Nitrógeno Proteico. La línea cero, representa los niveles basales de los parámetros corporales del día 0 o los niveles basales de los gorgojos alimentados con PSB al día 4.

Ahora bien, cuando los gorgojos ingieren película sin bífido por 4 días y se compara con los valores basales en el día 0, observamos en la figura 20, que hay una pérdida de agua de 44% y una disminución de la grasa de un 20%. En contraste, los valores basales de nitrógeno proteico se mantienen, esto es un claro ejemplo del efecto

protector que tiene los carbohidratos de la dieta sobre el nitrógeno corporal. Cuando se alimentaron a los insectos con películas con bífidos todos los valores de nitrógeno proteico, agua, grasa aumentan. Para este experimento los cambios son notorios en las dos dietas suministradas (sin bífidos y con bífidos) y pone en evidencia que la alimentación con bifidobacterias produce cambios en los parámetros corporales en los insectos. Sin embargo, lo que todavía no se puede saber, si estos cambios son producidos, por la biomasa ingerida o por algún cambio de tipo fisiológico inducido por esta bacteria. Para ello, se debería hacer un ensayo donde se alimenten los insectos con películas que contenga bacterias no viables, de manera de demostrar si los cambios producidos, se deben a la biomasa ingerida.

9 Microscopía Electrónica de Transmisión del tracto digestivo del *S. oryzae* para la observación de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 transferidas mediante la película comestible

Existen diferentes técnicas para comprobar la presencia de microorganismos en el canal alimentario de los insectos, una de ellas, es la identificación microbiológica de la microbiota presente, mediante técnicas de extracción del intestino de los insectos, en donde se puede realizar su cultivo y verificar la presencia de las bacterias mediante el conteo de las colonias. Otra de las técnicas utilizadas, es la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), que ha sido exitosa para la identificación de endosimbiontes presentes en intestino de hormigas (Caetano, 2009).

En nuestro trabajo, se logró la extracción del tracto digestivo de *Sitophilus oryzae*, además de la metodología completa de la MET, hasta la inclusión por separado del intestino anterior, medio y posterior en resina epon, pudiendo realizar cortes gruesos de cada región del intestino y así, observar la integridad del tejido, obteniendo fotografías

bajo microscopio de luz, a un aumento de inmersión de 1000X. En estos se pudieron evidenciar las diferentes estructuras que caracterizan el intestino del animal.

La MET fue aplicada para identificar las bifidobacterias que se transferieron al intestino del gorgojo y para ubicar las bacterias caracterizadas en el tracto digestivo. Sin embargo, cuando se realizaron los cortes finos de las muestras y fueron observadas bajo el microscopio electrónico, no se obtuvieron imágenes en donde se apreciaran bien dichas estructuras, debido a la falta de contraste de la muestra. No obstante, en las fotografías tomadas bajo el microscopio de luz, de cortes transversales del intestino medio, se pueden evidenciar las estructuras características de cada uno de los intestinos (figura 21, figura 22 y figura 23).

En la figura 21, observamos diferentes estructuras de un corte transversal del intestino medio de *S. oryzae*, lo que se define claramente en la fotografía es la presencia del alimento disgregado, probablemente por la actividad de las enzimas digestivas. Este alimento se encuentra cerca del glucocálix, que es una región que circunda las microvellocidades, donde se encuentran asociadas enzimas digestivas como glicopeptidasas, lipasas y trehalasa. Por otra parte, en dicho alimento se encuentran algunas bifidobacteria, con su forma característica (figura 22, círculo). Además también podremos observar, la presencia de células regenerativas a lo largo de todo el epitelio, gotas de grasas y el ciego gástrico. En la región cercana al ciego gástrico (figura 22, ovalo grande), se observa la presencia de bastones o bacilos que se perciben de un color azul más oscuro que el resto. Aunque la resolución de la fotografía no brinda un mejor detalle, se puede considerar la presencia de los bífidos en el intestino del *Sitophilus oryzae*.

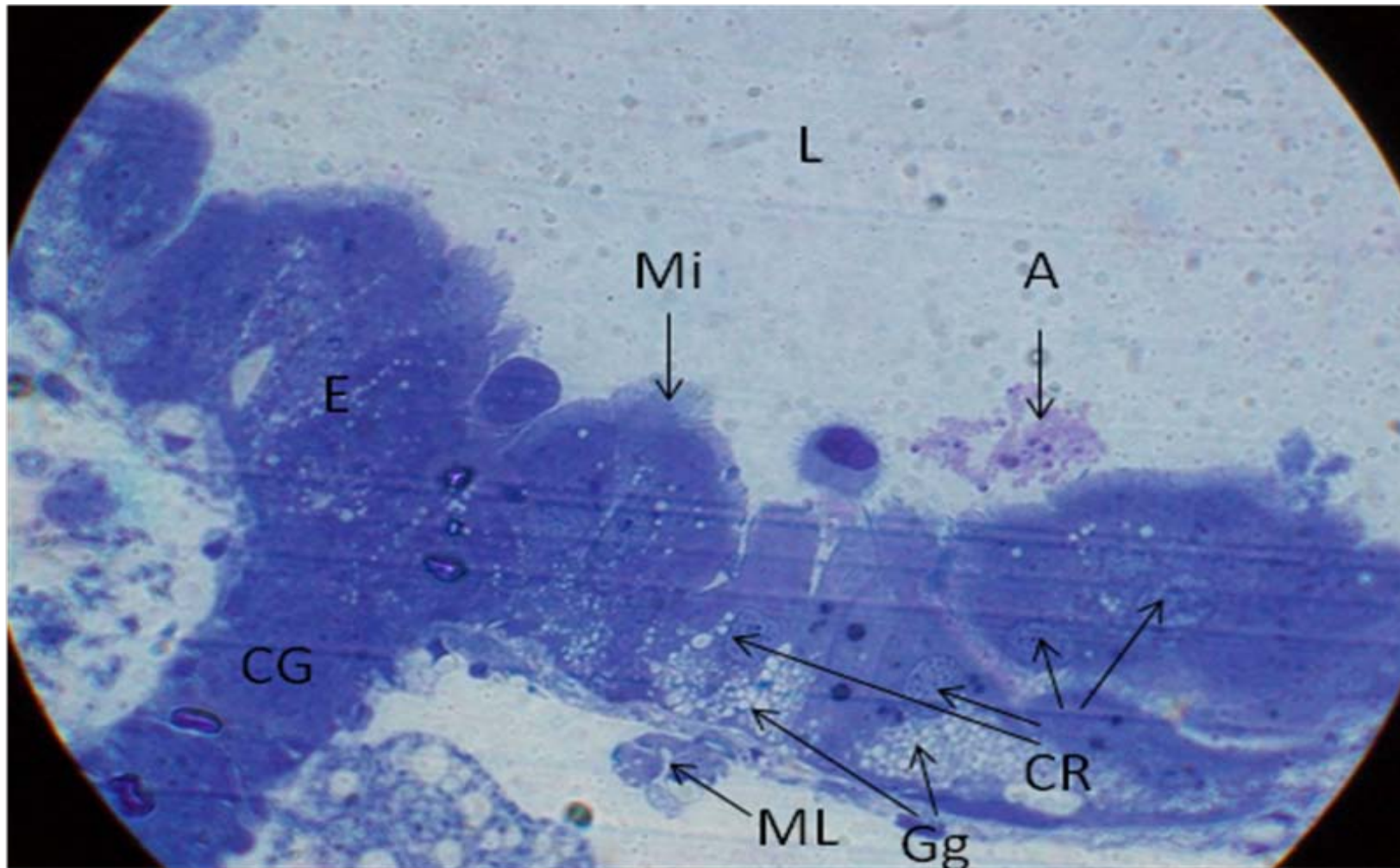


Figura 21. Intestino medio del *Sitophilus oryzae*; Mi; microvellosidades, L; lumen intestinal, A; alimento, CR; células regenerativas Gg; gotas de grasa; CG; ciego gástrico, E; epitelio; ML; músculo longitudinal

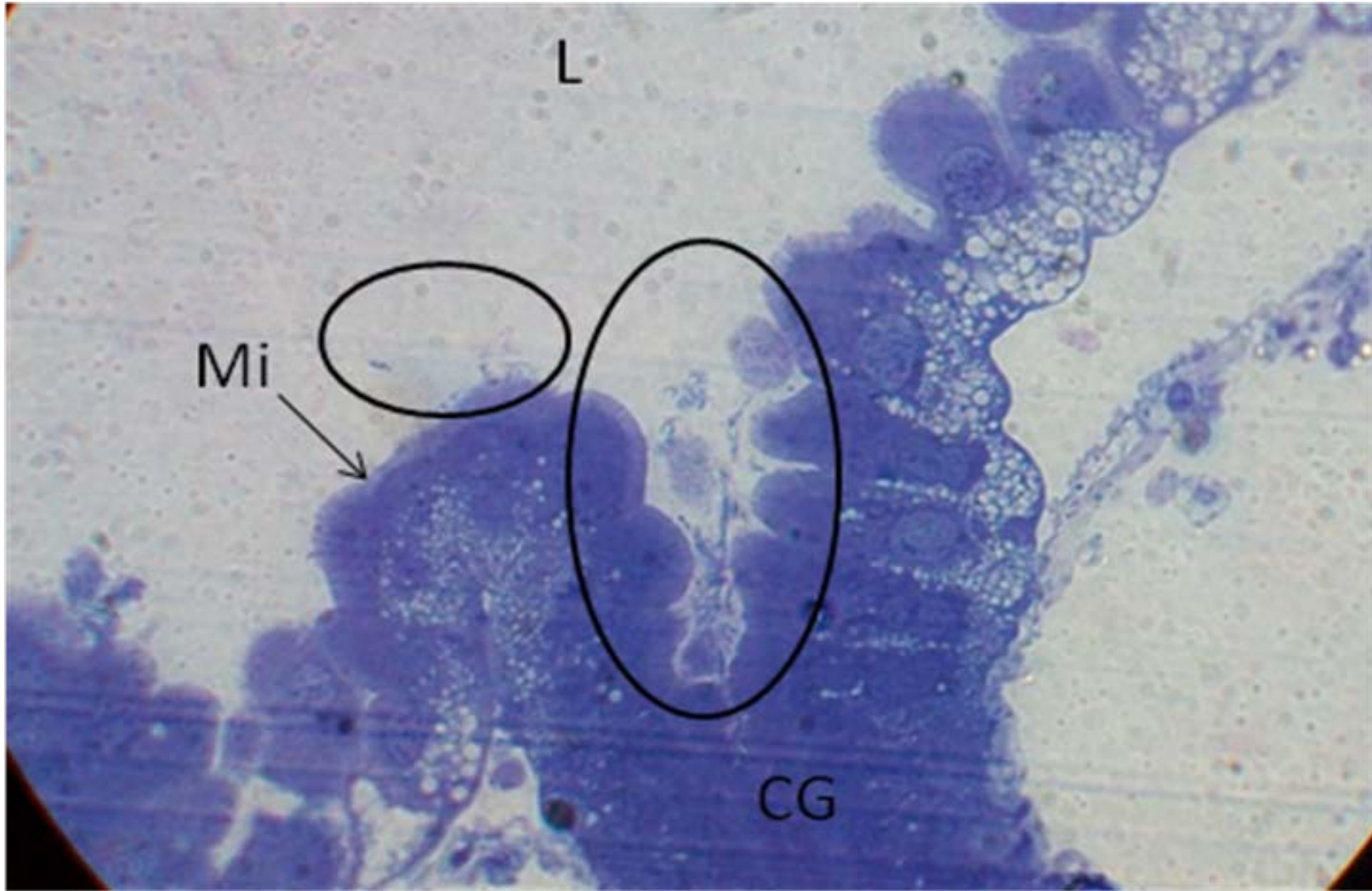


Figura 22. Parte del intestino medio del *Sitophilus oryzae*; Mi; microvellosidades, L; lumen intestinal, CG; ciego gástrico, lo que está encerrado en círculos es parte del alimento disgregado por enzimas.

Por otro lado, tenemos imágenes de los ciegos gástricos del gorgojo de arroz figura 23, en donde se presume la existencia de diversos microorganismos, encerrados en bacteriomas, definiendo este término, como el espacio en donde pueden encontrarse grandes concentraciones de bacterias. Esta suposición se llega por comparaciones con la investigación de Caetano (2009).

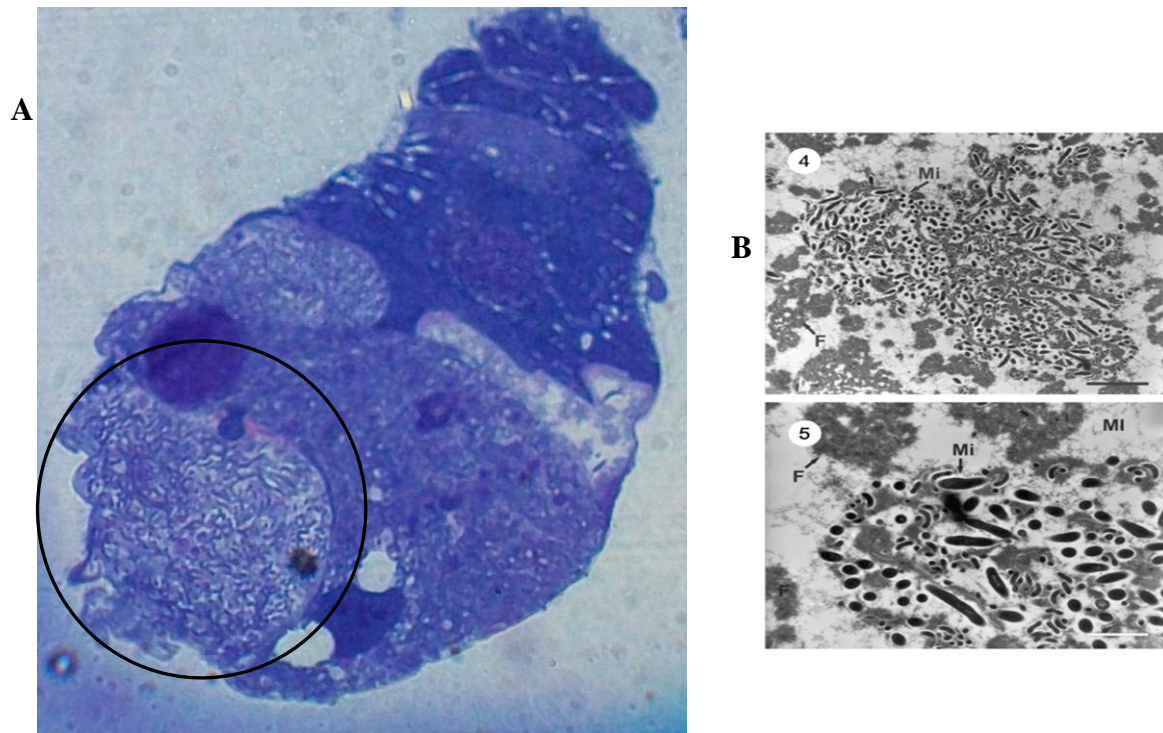


Figura 23. **A.** Ciego gástrico del intestino medio de *Sitophilus oryzae*, con presuntos bacteriomas que contienen bacilos, cocos y otros microorganismos. **B.** Micrografías del intestino medio hormigas en donde se presentan concentraciones de microorganismos. Tomado de Caetano (2009)

A pesar de que estamos comparando dos taxones diferentes (coleópteros e himenopteros), la similitud es apreciable, en cuanto a los posibles microorganismos reportados por Caetano (2009) y los que se pudieron hallar en nuestra investigación. Además, los microorganismos identificadas por microbiología, previo a las película comestibles con bífido, eran cocos y en la figura 23, se pueden observar cocos que

forman parte de las bacterias facultativas de estos insectos y bacilos que inferimos son *Bifidobacterium lactis* Bb12.

Aunque no se pudieron obtener las micrografías del tracto digestivo con la MET, los cortes gruesos observados en el microscopio de luz, dan una primera imagen del intestino medio y sus estructuras, además de una primera aproximación de donde se internaliza el alimento y de la posible ubicación de los microorganismos, ya que, a medida que evolucionó esta investigación, diversos autores indicaban que la microbiota de los insectos se encontraba en mayor concentración en el intestino posterior, no obstante, para el *Sitophilus orizae*, aparentemente los microorganismos se observaron en el intestino medio y encerrados en bacteriomas. Esto demuestra la diversidad estructural, existente en el reino animal y dentro de un mismo orden de clasificación.

10 Conclusiones

- En el tracto digestivo del gorgojo de arroz, se identificaron tres cepas bacterianas anaerobias facultativas, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus sp*. Estas podrían considerarse como parte de la microbiota habitual del intestino del insecto.
- En los granos de arvejas se identificaron dos microorganismos, *Staphylococcus sp* y *Acinetobacter lwoffii*, estas bacterias son anaerobias facultativas.
- El grano de arveja sirve como vehículo para la transferencia del *Staphylococcus sp*, ya que este microorganismo se encontró tanto en el tracto digestivo del insecto, como en esta leguminosa. Demostrándose que se pueden incorporar bacterias al interior del intestino, contenidas en el alimento.
- El valor de pH registrado en la solución formadora de película con *Bifidobacterium lactis* Bb12 fue de 5,19, lo que permitió la supervivencia y viabilidad del suplemento probiótico dentro de la película.
- Se formularon satisfactoriamente películas comestibles a base de almidón de papa y a través de la técnica de microscopía de barrido, se comprobó la integridad de la película y la presencia del suplemento probiótico.
- Los gorgojos alimentados con películas comestibles con bífidos durante 12 días, presentaron una supervivencia similar a los gorgojos alimentados con arvejas (control positivo), al igual que los insectos alimentados con películas a base de almidón sin bífidos y no presentaron diferencias significativas con respecto a la dieta control.
- La variación de peso registrada para los gorgojos alimentados con películas comestibles con y sin bífidos fueron similares, aumentando el peso de los insectos hasta casi un 20% de su peso inicial, presentando diferencias significativas en cuanto a los gorgojos que se alimentaron con arvejas.
- El mayor contenido de agua corporal, se obtuvo en gorgojos que fueron alimentados con películas comestibles sin bífidos, sugiriendo que este film, al no

estar presentes los bífidos, la película contiene mayor cantidad de agua que los insectos pueden utilizar.

- La ingesta de carbohidratos complejos, ocasionó un aumento en las reservas de grasa, en gorgojos alimentados con películas con y sin bífidos. Este efecto pareciera verse incrementado por el glicerol, presente en la solución formadora de películas.
- El contenido de proteína como indicador de biomasa en películas comestibles con el suplemento probiótico es de 3,5%, considerándose un valor de proteína alto que es aportado a los gorgojos cuando se alimentan con esta dieta.
- La viabilidad de las *Bifidobacterium lactis* Bb12 en películas comestibles a base de almidón de papa, fue de 14 días. Esta no se ve afectado en el tiempo del experimento siempre y cuando el ensayo se realice bajo las mismas condiciones de esterilidad y se siga la metodología indicada.
- La transferencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12 al tracto digestivo del *Sitophilus oryzae*, ocurre independientemente de la dieta inicial (arveja o película sin bífidos) que ingieren los gorgojos, demostrándose así que las películas comestibles actúan como un vehículo de transferencia de microorganismos.
- El contenido de bífidos en el interior del tracto digestivo de los insectos se mantiene mientras el insecto lo ingiere en la dieta, esto es similar a lo que ocurre en seres humanos.
- La composición corporal durante la transferencia indica que las bifidobacterias promueven un aumento del contenido de grasa y nitrógeno proteico cuando los gorgojos inicialmente se alimentan con arvejas o con películas sin bífidos. Lo que podría deberse a la biomasa proporcionada por los bífidos o por cambios inducidos en la fisiología del intestino.
- Los cortes gruesos observados bajo microscopía óptica, demuestran la presencia de *Bifidobacterium lactis* Bb12, en el intestino medio del *Sitophilus oryzae*, lo que comprueban su transferencia.

11 Referencias

- A.O.A.C. International.** 1984. Official methods of analysis. Peroxide value: 28: pp 022 –023.
- A.O.A.C. International.** 2003. Métodos de análisis de la asociación oficial de química analítica para determinar humedad, fibra, cenizas, grasa y proteína, chapter 32: 1, 2, 5 y 14, Washintong. U.S.A.
- A.O.A.O. International.** 1990. Oficial Methods of Analisis. 13th ed. Association of Analytical Chemist. Washington D.C.
- Abdelali, H., Cassand, P., Saussothe, B., Koch-Bocabeille, B., Narbonne, J.** 1995. Antimutagenicity of components of dairy products. *Mutations Res.* 331. pp 133-141.
- Acciacaferrri, D.** 2001. Comparación de tres variedades de *Phaseolus vulgaris* en el bioensayo con gorgojos de arroz (*Sitophilus oryzae*).
- Airbeit.** 1997. The Staphilococci in Human Disease. New York: Churchill Livingstone. 253-286.
- Alcalá, L., Betriu, C., Sanchez, J. Reig, M.** 2004. Bacterias Anaeróbicas. *Revista Procedimientos en Microbiología Clínica.* Editores Cercenado Emilia, Cantón Rafael. España. 53 pp 616-619.
- Amster H., Rochat F., Saudan K., Mignot O., Aeschlimann J.** 2004. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 10; (1) : pp 55-63.
- Araya-Kojima, T., Yaeshima, T., Ishibashi, N., Shimamura, S., Hayasawa, H.** 1995. Inhibitory effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria Microflora* 14: pp 59 – 66.
- Arroyo, L., Cotton, L., Martin, J.** 1995. AMC Agar: A composite medium for selective enumeration of *Bifidobacterium longum*. *Cultured Dairy Products Journal* 30: pp 12 15.

- Azuma, M., Takeda, S., Yamamoto, H., Endo, Y. Eguchi, M.** 1991. Goblet cell alkaline phosphatase in silkworm midgut epithelium: its entity and role as an ATPase. *Journal of Experimental Zoology* 258 pp 294–302.
- Bacot, A.** 1914. On the survival of bacteria in the alimentary canal of fleas during metamorphosis from larva to adult. *J. Hyg. (Plague Supplement III)*, (Jan. 14) pp 655-664.
- Barbehenn, R., Stannard, J.** 2004. Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *Journal of Insect Physiology*. 50 pp 783–790.
- Barrio M., 2006.** Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría. *Review Pediatría Aten Primaria*. Suplemento1 pp 99-118
- Bartram, H., Scheppach, W., Gerlach, S., Ruckdeschel, G., Kelber, E., Kasper, H.** 1994. Does yogurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites in healthy subjects? *American Journal of Clinical Nutrition* 59 pp 428-432.
- Beesley, J., Betts, M.** 1985. Virus diagnosis: a novel use for the protein A-gold probe. *Medical laboratory science*. 42: 2 pp 161-165
- Bello, P., De Leon Y., Acevedo E., Paredes, L.** 1998. Isolation and partial characterization of amaranth and banana starches. *Journal Starch/Stärke*: 50: 10 pp 409-413.
- Berger, U.** 1992. The genus *Gemella*. *The Prokaryotes*. 2nd edición. Springer-Verlag. New York. NY. pp 1643–1653.
- Bergey, D., John, G., Noel, R., Krieg, P., Sneath, H.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Berrada, N., Lemeland, J., Laroche, G., Thouvenot, P., Piaia, M.** 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal Dairy Sci*. 74: pp 409-413.

Bezkorovainy, A., Miller-Catchpole, R. 1989. Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria. CRC Press, Boca Raton, FL.

Blanshard, J. 1987. Starch granule structure and function: a physicochemical approach. In: Starch: Properties and Potential. Galliard, T. (ed). New York, USA. pp 16-54.

Breznak, J., Brune, A. 1994. Role of microorganism in the digestion of lignocellulose by termites, *Annual Review of Entomology*. 39 pp 453–487.

Brower, S., McGladdery, S. 2004. Synopsis of infection diseases of commercially exploited shellfish. <http://www.sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis>.

Brune, A. 2003. Symbionts aiding digestion. In: Encyclopedia of Insects. Primera Edición. Editado por Cardé, R. T. & Resh, V. H. Academic Press, New York, in press.

Caetano, F., Bution M., Zara, F. 2009. First report of endocytobionts in the digestive tract of ponerine ants. *Micron* 40: pp 194–197.

Cagigas, A., Blanco, J., 2002. Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Alimentación Nutrición*; 16: 1 pp 63-8.

Canavoso, L., Jouni, Z., Karnas, K., Pennington, J, Wells, M. 2001. Fat metabolism in insect. *Annual Review Nutrition*; 2001 pp 21: 23-46.

Capron, A., Cesbron-Delauw, M., Darcy, F. 1990. New molecular approaches to the diagnosis and prevention of toxoplasmosis. *Bulletin Academy National Medicine*. 174: 3 pp 387-394.

Carmona, A. y Casotto, M. 2001. Índice de eficiencia alimentaria (FER) en gorgojos de arroz (*Sitophilus orizae*): Herramienta para evaluar la utilización metabólica del alimento. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. 3 pp 49-53.

Carmona, A., Gómez – Sotillo, A. y Casotto, M. 1997. Toxicología nutricional: un enfoque “antropocéntrico”. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. 1 pp 37-40.

- Carmona, A., Gómez – Sotillo, A. y Casotto, M.** 1998. Toxicología nutricional: un enfoque “antropocéntrico”. Memorias del Instituto de Biología Experimental. 1 pp 37-40.
- Carrascosa, J., Castón, J.** 1998. Tinción negativa. En: Piqueras JR y Megías Megías L, editores. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). *Aplicaciones Biológicas*. Universidad de Granada España. pp 21-30.
- Chapman, R., AnddeBoer, G.** 1995. Regulatory Mechanisms in Insect Feeding, Chapman and Hall. New York. pp 137–156.
- Chaverri, G.** 2006. Flora bacteriana aeróbica del tracto digestivo del vampiro común *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). Revista de Biología tropical, septiembre, año/vol. 54, número 003. Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. pp 717–724.
- Cheftel, J.** 1999. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. 2ª ed., Acirbia Zaragoza. Tecnología de los cereales. pp 94-97.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.** 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2) pp 192–208.
- Cherry, J.** 1973. Molecular biology of plants. En: Columbia University Press, editors a text manual. Columbia, USA. pp 37-42.
- Cobo, E., Campero, C., Mariante, R., Benchimol, M.** 2003. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. *Veterinary Parasitology*. 117: 3 pp 195-211.
- Collado, C., Sanz, Y.** 2007. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology* 103: pp 1147-1157.
- Colman, G.** 1967. *Aerococcus*-like organisms isolated from human infections. *J Clin Pathol*; 20: pp 294-297.
- Cubillos, A.** 1983. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Deposito de documentos de la FAO.

- Dale, C., Wang, B., Moran, N., Ochman, H.** 2003. Loss of DNA Recombinational Repair Enzymes in the Initial Stages of Genoma Degeneration. *Mol. Biol. Evol.* 20(8) pp 1188–1194.
- Dangel, V., Harle, J., Goerke, C., Wolz, C., Gust, B., Pernodet, J.-L., Heide, L.** 2009. Transcriptional regulation of the novobiocin biosynthetic gene cluster. *Microbiology* 155: pp 4025-4035.
- De Paulis, A., Predari, S., Chazarreta, C., Santoianni, J.** 2003. Five-test simple heme for species-level identification of clinical significant coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal Clin Microbiol*; 41: 1219-1924. *Journal Syst Bacteriol*; 25: pp 62-79.
- Drake, H., Daniel, S., Küsel, K., Matthies, C., Kuhner, C., Braus-Stromeier, S.** 1997. Acetogenic bacteria: what are the in situ consequences of their diverse metabolic versatilities? *Biofactors*. 6: 1 pp. 13 - 24.
- Elmer, G., Surawicz, C., McFarland, L.** 1996. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA* ; 275: pp 870–876.
- Engelhardt, H., Peters, J.** 1998. Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. *Journal Structure Biological*. 124: 2: 3 pp 276-302.
- Famá, L., Rojasb, A. Goyanesa, S. Gerschenson, L.** 2003. Películas comestibles de aplicación industrial. Jornadas Sam/ Conamet/ Simposio. Buenos Aires- Argentina.
- Felis, G., Torriani, S., Dellaglio, F.** 2004. The status of the species *Lactobacillus rogosae* Holdeman and Moore 1974. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 15 pp 86–93.
- Finlay, B., Falkow, S.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity. revisited. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 61. pp136–169.
- Forbes, G.B.** 1997. Composición del organismo. en: Conocimientos actuales sobre nutrición. 7ª ed. Instituto nacional de ciencias de la vida. Washington, DC. pp 8-14

- Fuller, R.** 1992. Probiotics: the scientific basis. London: *Chapman & ed Hall*. pp 209-224.
- Galeno, F.** 2006. Digestibilidad in vitro y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- García, D., Rojas, M., Sánchez, J.** 2006. Cultured Microbiological Content of the Intestinal Tract and Stored Pollen of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana*. 11; (1) pp 123 – 129.
- Gennadios, A., Weller, C.** 1991. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. *Cereal Foods World*. 36 pp 1004.
- Gerischer, U.** 2008. *Acinetobacter Molecular Biology*, 1st ed. Edición, Caister Academic Press.
- Gibson, G., Roberfroid, M.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal. Nutrition*. 125: pp 1401-1412.
- Gibson, G., Wang, X.** 1994. Inhibitory effects of bifidobacteria on other colonic bacteria. *Journal Applied Bacteriology* . 77: pp 412-420.
- Gil R., Silva F., Pereto J., Moya A.** 2004. Determination of the Core of a Minimal Bacterial Gene Set. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. pp 518–537.
- Gillott, C.** 2005. Entomology. Third Edition. Edition Springer. Canadá. pp 487-507.
- Glenn R.** 1999. Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin . American Society for Nutritional Sciences. *Journal Nutricion*. 129: pp 1438S–1441.
- Gómez-Sotillo, A., Carmona, A.** 1998. *Canavalia ensiformis* affects survival and body composition of *Sitophilus oryzae* adults. Recent Advances of Research on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed. Wageningen, Holand; 3: pp 295-299.

- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.** 1993. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *The Journal of Food Science*. 58 pp 206-211.
- Gram, H. 1884.** Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschr Medicine*. 2. pp 185–189.
- Griffiths, G., Lucocq, J., Mayhew, T.** 2001. Electron microscopy applications for quantitative cellular microbiology. *Cellular Microbiology*. 3: 10 pp 659-668.
- Grijalva, O., Giraldo, G.** 2006. Simbiosis bacteriana en Insectos. Boletín de Museo de Entomología de la Universidad del Valle. Cali Colombia. 7 (2) pp 24-40.
- Guarner, F., y Malagelada, J.** 2003. Flora intestinal en la salud y la enfermedad. *The Lancet, Revista Médica Británica*. pp 512-519.
- Guilbert, S.** 1988. Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis. In: Food preservation by moisture control. *CC Seow (ed.)*. London: Elsevier. pp 119-219.
- Guilbert, S., Biquet, B.** 1996. Food Packaging Technology. Edible films and coatings. G. Bureau, J.L. Multon (eds.), VCH Publishers, Inc, Primera edición, New York, U.S.A.
- Guilliam, M.** 1997. Identification and Roles of Non-Pathogenic Microflora Associated with Honey Bees. *FEMS Microbiol Lett*. 155: pp 1-10.
- Gutiérrez, A.** 2006. *Staphylococcus*: las ramificaciones de un racimo. Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia. Asociación Colombiana de Infectología. 10; (3): pp 486-492.
- Hayat, M.** 1986. Basic techniques for transmission electron microscopy. Academic Press (London). pp 232-264.
- Heddi, A., Grenier, A., Chadourian, C., Charles H., , Nardon, P.** 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp 6814–6819.

Hellingwerf, K., Crielaard, W., Hoff, W., Matthijs, H., Mur, L., Van Rotterdam, B. 1994. Photobiology of bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 65: 4 pp 331 - 47.

Hernández, O. 2006. Películas y coberturas comestibles a base de diferentes almidones: digestibilidad in vitro de películas y caracterización física de coberturas sobre fresas (*Fragaria ananassa*). Tesis especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Ho, Y., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., Ho D. 2004. Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. *Journal Biology Chemical* 279 (31) pp 32804–812.

Holt, J., Krieg, P., Sneath, J., Staley, T. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Williams y Wilkins, Baltimore, Maryland. EE.UU. pp 787.

Hoover, R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review, *Carboh. Polym.:* 45(3), pp 253-267.

Ishibashi, N., Taki, S. 1993. Effects of insecticides on movement, nictation and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. *Journal Nematol.* 25: 204-213.

Ishibashi, N., Yaeshima, T., Hayasawa, H. 1997. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malasyan Journal American Society for Nutrition* 3 pp 149-159.

Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg E. 1987. Review of Medical Microbiology. Seventeenth Edition. Editorial El Manual Moderno, S.A. D.F., México. Capítulo I. pp 30-37; 66-68.

Jeyaprakash, A., Marjorie, A., Hoy, M., Allsopp, M. 2005. Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences. *Journal Invertebrate Pathology.* 84: pp 96–103.

Kandler, O., Weiss, N. 1986. Regular, nonsporeforming Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2 pp 1208–1234.

- Karlson, P.** 1963. New concepts on the mode of action of hormones. *Perspectives in Biology and Medicine*. 6: 203-214 pp 16335-16338.
- Kawase, K.** 1982. Effects of nutrients on the intestinal microflora of infants. *Jpn. Journal Dairy Food Sci.* 31: pp A241-A243.
- Kawase, K., Suzuki, T., Kiyosawa, I., Okonogi, S., Kawashima, T., Kuboyama, M.** 1981. Effects of composition of infant's formulas on the intestinal microflora of infants Bifidobacteria Microflora. *The Journal of Nutrition* 2: pp 25-31.
- Kennedy, J., White, C., Cabral, J., Sá-Correia, I.** 1987. Starch biomass: a chemical feedstock from enzyme and fermentation processes. En: Starch: properties and potential, Critical Reports on Applied Chemistry., vol 13; Galliard, T., (Ed). Society of Chemical Industry by John Wiley & Sons. Chapter 6: pp 115-149.
- Kester, J., Fennema, O.** 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology* 40(12): pp 47-59.
- Kingsley, C., Gregor, R.** 2007. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Canadá. 45 pp 282-288; 0266-825.
- Klowden, M.** 2007. Physiological systems in insects. 2nd Ed. Editorial. El Sevier. Idaho, EE.UU. pp 293-335.
- Korshunov, U., Sinitsyna, N., Ginodman, G., Pinegin, B.** 1985. Correction of intestinal microflora in chemotherapeutic dysbacteriosis using bifidobacterial and lactobacterial autologous strains. *Z. Mikrobiol. Epidemiology Immunobiology*. 9: pp 20-25.
- Kristence, B., Nielsen, G.** 1995. Endocarditis caused by *Aerococcus urinae*, a newly recognized pathogen. *Journal Clinical Microbiology Infection*. 14. pp 49-51.
- Krochta, J., Mulder-Johnston, C.** 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*. 51 pp 60-74.

- Laine, L., Lewin, D., Naritoku, W., Estrada, R., Cohen, H.** 1996. Prospective comparison of commercially available rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest. Endosc.*, V.44. pp 523-526.
- Lang, A., Filser, J., Henschel, J.** 1999. Predation by ground beetles and wolf spiders on herbivorous insects in a maize crop. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 72 pp 189-199.
- Laohakunjit, N., Noomhorm, A.** 2004. Effect of Plasticizers on Mechanical and Barrier Properties of Rice Starch Film. *Starch - Stärke*. 56: pp 348-356.
- Lavallée, J., Hammell, K., Spangler, E., Cawthorn, R.** 2001. Estimated prevalence of *Aerococcus viridans* and *Anophryoides haemophila* in American lobsters *Homarus americanus* freshly captured in the waters of Prince Edward Island, Canada. *Diseases of aquatic organisms*. 46 (3) pp 231-236.
- Law, J., Wells M.** 1989. Insects as Biochemical Models *The Journal of Biological Chemistry* by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in U.S.A. pp 16335-16338.
- Ledermann, W.** 1971. Bacilos Gram negativos no fermentadores de aislamiento habitual. Instituto de Bacteriología. Chile; 13: pp 15-20.
- Lehane, M.** 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*. 42:525-50.
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M.** 2006. Bioenergetic and metabolism. En: Principles of Biochemistry. Cuarta edición. Editorial Worth publishers, Nueva York. pp 512-520.
- Lieber, C.** 2004. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metabolism Review*, 36 pp 511-529.
- Liescher, S.** 1961. Sind die Därme des mit Muttermilch ernährten Säuglings vorherrschenden Bifidusbakterien als nützliche Vitaminlieferanten für den Säuglings-Organismus anzusehen. *Z. Kinderheilk* 85: pp 265-276.

Lo, N., Beninati, T., Stone, F., Walker, J., Sacchi, L. 2007. Cockroaches that lack *Blattabacterium* endosymbionts: The phylogenetically divergent genus *Nocticola*. *The Journal Royal Society. Biol. Lett.* 3 pp 327-330.

Lopez, J., Garcia, E., Schwartz, S. 2002. El cuerpo humano: metabolismo proteico. En: De La Torre, M. Farmacéutica Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana. Editorial Glosa, S.L.

López, Y. 1999. Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de las enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 8-68.

Lovera, M. 2008. Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.) Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 38-63.

Lugo, D. 2009. Evaluar por medio de un método químico-enzimático el efecto del consumo de carbohidratos simples y complejos sobre el contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Macfaddin, J. 2000. Biochemical Test for Identification of medical Bacteria. 3th edition. Editorial Médica Panamericana. Estados Unidos. pp: 54-72; 73-91; 223-235; 397-410; 306-311: 92-97.

Macfaddin, J. 2000. Biochemical Test for Identification of medical Bacteria. 3th edition. Editorial Médica Panamericana. Estados Unidos. pp 54-72; 73-91; 223-235; 397-410; 306-311: 92-97.

Macfarlane, G., Gibson, G. 2007. Metabolic activities of the normal colonic flora. In: Gibson SAW, ed. Human health—the contribution of microorganisms. *London: Springer-Verlag.* 17 pp 52.

MacFarlane, G., Herzberg, M., Wolff, L., Hardie, N. 1992. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leucocyte phagocytosis and cigarette smoking. *Journal Periodontol.* 63 pp 908-913.

- Margulis, Y., Sagan, D.** 1986. Origins of sex : three billion years of genetic recombination. Departamento Microbiología y Ecología Yale University Press, New Haven and London.
- Martín, C., Smith, A.** 2007. Starch biosynthesis. *Reviews The plant cell*, pp 1059-1524. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=160895&blobtype=pdf>. [Consulta: 11 de Octubre de 2009].
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R.** 2003. Genus and Species-Specific PCR Primers for the Detection and Identification of Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiology*. 4: pp 61-69.
- Mayer, J.** 1948. Lactic acid-bifidus milk. *Zeitschrift f_r Kinderheilkunde*. 65 pp 319-345.
- McFall-Ngai, M.** 2007. Adaptive immunity: care for the community. *Nature* 445: 153. pp 0028-0836.
- McHugh, T., Krochta, J.** 1994. Milk-protein-based edible films and coatings. *Food Technology*. 48 pp 97-103.
- Medina, I.** 2002. Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bifidobacterias presentes en haces de lactantes. Tesis especial de grado. Facultad de Ciencias. (Licenciado en Biología). Mérida, Universidad de Los Andes.
- Metchnikoff, E.** 1908. *Optimistic studies* New York: Putman's Sons, pp 161-183.
- Millán, G.** 2007. Uso de biomarcadores para evaluar la biodisponibilidad de nutrientes en *Tribolium castaneum*. Tesis de postgrado (Doctor en Ciencias). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 27-212.
- Millán, G., Carmona, A.** 2005. Estudios nutricionales en *Tribolium castaneum*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. 4: pp 53-56.
- Minagawa, K.** 1970. Studies on the importance of lysozyme in infant's nutrition. *Acta Paediatr. Jpn.* 74: pp 761-767.
- Misra, A., Kuila, R.** 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*, *Indian Journal Dairy Science* 48 pp 612-614.

- Mitsuoka, T.** 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, 3: 1 pp 11-28.
- Mitsuoka, T., Kaneuchi, C.** 1977. Ecology of the bifidobacteria. *Journal Clinical Nutrition*. 30: 1799-1810.
- Mizutani, T., Mitsuoka, T.** 1980. Inhibitory effect of some intestinal bacteria on liver tumorigenesis in gnotobiotic C3H/HE male mice. *Cancer Lett.* 11: pp 89-95.
- Modler, H., McKellar, R., Yaguchi, M.** 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology. Journal PubMed*. 23: 29 pp 41.
- Modler, H., McKellar, R., Yaguchi, M.** 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors *Review Canadian Institute of Food Science and Technology. Journal PubMed* 23: pp 29-41.
- Moran, N., Degnan, S., Santos, H., Ochman, H.** 2005. The Players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 102. pp 16919-16926.
- Nava, S., Ortíz, E.** 2007. Estudio anatómico-histológico del sistema digestivo de *Stenomacra marginella* (herrich-schaeffer, 1850) (hemiptera: heteroptera: largidae) *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* 23: 3 pp 49-57.
- Nealson, K.** 1999. Post-Viking microbiology: new approaches, new data, new insights. *Origins of Life Evolution Biosphere*. 29: 1 pp 73-93.
- Nishizawa, Y.** 1960. Physiological activity of bifidobacteria. *Shonika Shinryo* 23: pp 1213-1218.
- Ohlstein, B., Spradling, A.** 2007. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential Notch signaling. *Science*; 315:988.
- Oliver, K., Russell, A., Moran, N., Hunter, M.** 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100. pp 1803-1807.

Ortiz, S. 2010. Propiedades Físicas, Mecánicas, y Bioensayo con *Sitophilus oryzae* de Películas Comestibles de almidón con Probióticos, Prebióticos y Omega-3. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela.

Park, J. Grossman, O. 1990. *Aerococcus viridans* infection. *Case report and review. Clinical Pediatrics*. (Phila) 29: pp 525–526.

Pastor, C., y Ortolá, M. 2002. Aplicación de films comestibles en fresas (*Fragaria spp*) de la variedad Ventana. Departamento de Tecnología de Alimentos – Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. pp 223-226.

Paula, F. 2006. Bacteriología. Sección de Bacteriología de Microbiología e Inmunología. Departamento de Microbiología e Inmunología On-line. <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter12.htm>.

Payne, J., Morris, A., Beers, P. 1998. Note: Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. *Journal Application Microbiology* 86: pp 353-353.

Perdigón, G., Locascio, M., Medici, M., Holgado, A., Oliver, G. 2003. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. *BIOCELL*. 27(1): pp 1-9.

Pien, F. Wilson, W. Kunz, K. 1984. *Aerococcus viridans* endocarditis. *Mayo Clin. Proc.* 59: pp 47–48.

Pinotti, A., García, M., Zaritzky, N. 2004. Caracterización de películas biodegradables compuestas de hidrocoloides. Facultad de Ciencias Exactas. Facultad de Ingeniería. La Plata, Argentina

Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., Rambaud, J.C. 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *American Journal of Clinical Nutrition* 55: pp 78–80.

Rasic, J. 1983. The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutrition and health. *Nutrition European Dairy Journal*. 4: pp 80-88.

- Raverdy, S., Foster, J., Roopenian, E., Carlow, C.** 2008. The *Wolbachia* endosymbiont of *Brugia malayi* has an active pyruvate phosphate dikinase. *Biochemical and Molecular Etudies*. 160: 2 pp 163-166.
- Richards, A., Richards, P.** 1977. The peritrophic membranes of insects. *Annual Reviews Entomology*. 22 pp 219-240.
- Rivas, C., Mota, M.** 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2da edición corregida. Editorial Fefmur. Capítulo 21. Universidad de la República Facultad de Medicina. Montevideo. Uruguay.
- Rojas, C.** 2007. Evaluación nutricional de películas comestibles con ingredientes pre y probióticos usando como modelo biológico el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 62-93.
- Rost-Roszkowska, M., Pilka, M., Rzymaska, R., Klag, J.** 2007. Ultrastructural studies of midgut epithelium formation in *Lepisma saccharina* L. (Insecta, Zygentoma). *Journal Morphologic*. 268: pp 224-231.
- Saavedra, J., Bauman, N., Oung, I., Perman, J., Yolken, R.** 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Journal Pediatrics* ; 344: pp 1046–1049.
- Sangeetha, M.** 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food Hydrocolloids*: 20(5), pp 557–566.
- Scarborough, C., Ferrari, J., Godfray, H.** 2005. Aphid protected from pathogen by emdosymbiont. *Sciences* 310. (5755). pp 1781.
- Seki, M., Igarashi, M., Fukuda, Y., Simamura, S., Kawashima, T., Ogasa, K.** 1978. The effect of *Bifidobacterium* cultured milk on the "regularity" among group. *Nutricion Food*. pp 379-387.
- Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T.** 1985. A new morphologically characterized cell wall prepa ration (whole peptidoglycan) from

Bifidobacterium infantis with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* 45: pp1300-1307.

Singh, N., Kaur, L., Sodhi, N., Sekhon, K. 2005. Physicochemical, cooking and textural properties of milled rice from different Indian rice cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 89: 2 pp 253–259

Singleton, P., Sainsbury, D. 2006. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. Third Edition. John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 0-470-03545-5.

Siunov, A., Nikitin, D., Suzina, N., Dmitriev, V., Kuzmin, N., Duda, V. 1999. Phylogenetic status of Anaerobacter polyendosporus, an anaerobic, polysporogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 49: 3 pp 1119 – 24.

Spratto, G., Woods, A. 2006. Interacción entre los Medicamentos y la Comida. Clifton Park, NY: Thomson Delmar Learning and Medical Economics of Thomson Healthcare. De PDR Nurse's Drug Handbook 2007 Edition.

Stewart, J., Zwicker, B. 1972. Natural and induced bactericidal activities in the haemolymph of the lobster, Homarus americanus: products of hemocytes plasma interaction. *Canadian Journal of Microbiology.* 18 pp 1499-1509.

Tamime, A., Arshall, V., Robinson, R. 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal Dairy Reseach.* 62: pp 151 – 187.

Tapia, M., Rojas-Graü, M., Rodríguez, F., Ramírez, J., Carmona, A., Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal Food Sci.* 72 pp 190-196.

Taylor, M., Marshall, R., Stack, M. 1994. Morphological differentiation of Tritrichomonas foetus from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Australian Veterinary Journal.* 150: 1 pp 73-80.

Terra, W., Cristofolletti, P. 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 113 pp 725–730.

- Terra, W., Ferrereira , C.** 2005. A Biochemical and Immunocytochemical Study Insect Biochemistry and Digestive system. Biochemistry of digestion. Encyclopedia of Insects. Academic press. *Elsevier. Florida.* pp 313-323.
- Terra, W., Ferrereira, C.** 2003. Digestive System. Encyclopedia of Insects. Academic press. *Elsevier. Florida.* pp 313-323.
- Terragno, R., Caffer, M., Binsztein. N.** 2007. Manual de Pocedimientos Diagnóstico y caracterización de *Shigella* spp. Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv. Text manual. Columbia, USA. pp 37-42.
- Thompson, N., Suarez, R.** 2003. Metabolismo f the insects. Edition Copyright © 2003, Elsevier Science (USA). . *University of California, Riversi.* pp 703-706.
- Torres, G., Basurto C., Vázquez, A., Alvarado, B.** 1999. Control biológico de hongos fitopatógenos de la raíz de fresa con cepas antagónicas de *Bacillus subtilis*. Memorias del X Congreso Latinoamericano de Fitopatología.
- Urbina, T., Caro, J., Vincent, M.** 1997. Caries Dentaria y Fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años de la I, III, IV, VII, XI, XII regiones. Chile. Depto. Odontológico Ministerio de Salud Chile.
- Van Heijenoort, J.** 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Oxford Journals · Life Sciences & Medicine · Glycobiology* 11: 3 pp 25R – 36R.
- Vandeputte, G., Delcour J.** 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch, *Carbohidratos Polimeros.* 5: 83 pp 245–266.
- Vasiljevic, T., Shah, N.** 2008. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal,* 18: pp 714-728.
- Ventura, M., Keny, G., Zhang, Z., Fitzgerald, F., Van Sinderen, D.** 2005. The *clpB* gene of *Bifidobacterium breve* UCC 2003: transcriptional analysis and first insights into stress induction. *Microbiology* 151: pp 2861- 2872.

- Visotto, L., Oliveira M., Guedes, R., Ribon, A., Good-God, P.** 2009. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Insect Physiology*. 55 pp 185–191.
- Von Loesecke, H.** 1950. Bananas. Segunda Edición. New York: Interscience.
- Vonk, H., Western, J.** 1984. Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion.”. *The Journal of Molecular Evolution*. 10 pp 49.
- Werren, J., Oneill, S.** 1997. The evolution of heritable symbionts. Oxford University Press. pp 1-41.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., L Pool-Zobel, B.** 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 7 pp 451S–5S. www.biolib.cz/en/image/id32232/[Consulta: 09 de Octubre de 2009]
- Xu, J.** 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*. 15: 7 pp 1713-31.
- Yaeshima, T., Takahashi, S., Ishibashi, N., Shimamura, S.** 1996. Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a microplate hybridization method. *International Journal of Food Microbiology*. 30 pp 303-313.
- Zegarra, M., Montesinos, S.** 2011. Aplicaciones de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis de Fractura de una Aleación de Cu – 10 al. Universidad de Chile.
- Zillig, W.** 1991. Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1: 4 pp. 544-51.
- Zumft, W.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 4 pp 533 - 616.