

Capítulo V

↑ Microbiota en fluido ruminal bovino, CMINA

125

Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA)

Juan Camilo Ovalle Másmela
Lina Marcela Botero Rute
Rocío Fenney Herrera León
Fernando Rodríguez Villamizar
Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.
Autor de correspondencia: Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal; correo electrónico: hjimenez@agrosavia.co

La CMINA conserva 164 accesiones de bacterias, divididas en dos grandes grupos: el primero está conformado por bacterias anaerobias aisladas del tracto gastrointestinal de algunos herbívoros domésticos y silvestres, entre los cuales se encuentran razas de bovinos criollos, chigüiro, danta y agutí; el segundo grupo corresponde a bacterias ácido-lácticas aisladas de ensilajes de avena y maíz del altiplano cundiboyacense. Adicionalmente, la colección cuenta con 4 accesiones de hongos anaerobios ruminales. Los microorganismos contenidos en esta colección son nativos y de interés pecuario, principalmente, y esta fue conformada a partir de colectas realizadas en el país, por lo que representan una riqueza genética de la diversidad microbiana colombiana. Con el fin de conservar esta diversidad y evitar su erosión y pérdida, se requiere la implementación de técnicas de conservación a largo plazo, efectivas y a bajo costo, que garanticen la preservación de las características genéticas y fisiológicas de los microorganismos que la componen.



Bacterias en fluido ruminal, CMINA ↑

Importantes esfuerzos han sido realizados para la implementación de técnicas de conservación a largo plazo, como la criopreservación a temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, además del estudio de protocolos para la implementación de la liofilización, procesos que buscan asegurar la identidad genética y la actividad biológica de los microorganismos; sin embargo, el grupo de investigación asociado a la colección se mantiene en constante búsqueda de otras alternativas de conservación, eficaces y a bajo costo, para garantizar la integridad de las accesiones y de sus copias o duplicados de seguridad. Por otro lado, las condiciones de conservación de microorganismos de origen ruminal requieren de mayor estudio, dado que son sensibles a las condiciones ambientales naturales, motivo por el cual deben replicarse las condiciones del rumen para su cultivo, mantenimiento y posterior conservación.

Para el caso de los hongos ruminales de la CMINA, la conservación en nitrógeno líquido ha afectado, con el tiempo, la viabilidad de estas accesiones, lo que ha llevado a mantener el estudio de nuevas metodologías de conservación para este tipo de microorganismos. Además de la autenticación y caracterización

de las cepas de la colección a partir de atributos como la morfología, la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), las variables cinéticas y la producción de algunas enzimas, la colección almacena la información en bases de datos que garantizan su trazabilidad, además de que cuenta con pasaportes de cada cepa en aras de conservar una colección lo más cercana posible a los estándares internacionales.

Cabe agregar que el mantenimiento y control de calidad de las cepas hace parte de los procedimientos de rigor en una colección de microorganismos, razón por la cual esta tarea es tan importante para la CMINA. Así, teniendo en cuenta que las accesiones se almacenan por largos periodos de tiempo, se hace una revisión periódica de su viabilidad para garantizar que se mantenga en el tiempo o que, por lo menos, disminuya muy lentamente.

Los rumiantes

Los rumiantes han sido uno de los aliados clave para la supervivencia de los humanos, no solo por proveer proteína de buena calidad, sino también por ser fuente de abrigo, transporte, fuerza, religión y herramientas. Los rumiantes comprenden el suborden Ruminantia, el orden Artiodactyla y la clase Mammalia. Actualmente hay más de 180 especies de rumiantes que varían en tamaño y habitan diferentes áreas geográficas del mundo. Estos animales herbívoros poseen la habilidad de convertir los forrajes en carne y leche (figura 27), característica que se basa en la posibilidad de degradar los hidratos de carbono estructurales presentes en los forrajes gracias a la acción de microorganismos anaerobios que habitan en el rumen (Jami et al., 2014; Krause et al., 2003).



Figura 27. Bovino de la raza Criolla Casanare.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Juan Camilo Ovalle Masmela

El retículo-rumen

Este órgano es una cámara de fermentación con capacidad de almacenamiento variable en los rumiantes en la cual se almacenan los alimentos que ingiere el animal y donde son fermentados por las poblaciones microbianas (Dehority, 2002). El retículo-rumen se localiza en el lado izquierdo de la cavidad abdominal del animal y está dividido en sacos y varios pilares (figura 28). Para el caso de la región del retículo, el epitelio forma pliegues que conforman una estructura en forma de panal, mientras que, en cuanto al rumen, la pared ruminal está cubierta de papilas en las que ocurren los procesos de absorción (Hofmann, 1989; Van Soest, 1994, capítulo 3). Es importante resaltar que el rumen no es un órgano glandular, razón por la cual no secreta enzimas digestivas capaces de hidrolizar los constituyentes que conforman el tejido vegetal de los forrajes que consumen los rumiantes. Una vez el forraje se aloja definitivamente en el rumen después de ser triturado por la acción mecánica de la masticación y un periodo de rumia, es activamente colonizado y transformado por la acción de los microorganismos anaerobios, con la ayuda de los movimientos peristálticos de la pared del rumen (Theodorou & France, 2005).

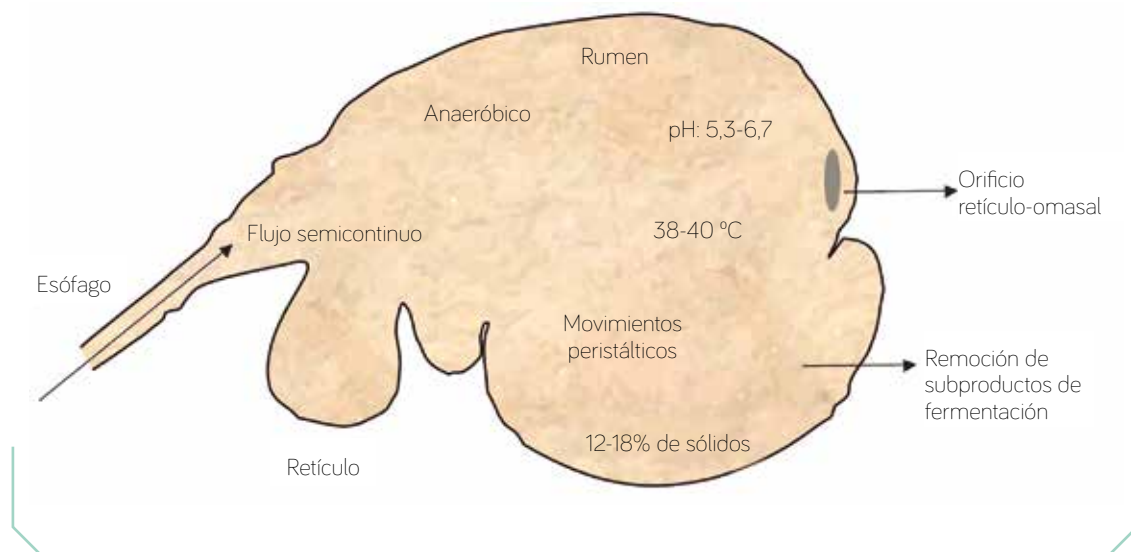


Figura 28. Modelo esquemático del rumen.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Hugo Rodolfo Jiménez

Microorganismos del rumen

La mayoría de los rumiantes del mundo todavía se alimenta principalmente de dietas basadas en forrajes, los cuales son triturados por procesos de masticación y rumia que mejoran el desempeño de los microorganismos en el rumen al degradar los componentes solubles e insolubles de los tejidos vegetales (Theodorou & France, 2005). Los microorganismos se adhieren y colonizan los tejidos vegetales infligiendo un daño físico que permite la penetración de la totalidad de las células vegetales. A lo largo de este proceso, los microorganismos liberan diversas enzimas que hidrolizan las complejas cadenas de polisacáridos de la fibra en azúcares más simples como monómeros y dímeros (Krause et al., 2003; Theodorou & France, 2005). Los mismos microorganismos fermentan estos azúcares y producen diferentes AGV, como el acético, el propiónico y el butírico, principalmente, así como metano y dióxido de carbono. Aunque el animal eructa los gases al ambiente, los AGV se absorben a través de la pared del rumen y luego son conducidos por el torrente sanguíneo, donde finalmente se convierten en azúcares y lípidos requeridos por el animal para la producción de energía y la construcción de tejidos. En cuanto a la proteína microbiana producida durante este proceso, esta se hidroliza a aminoácidos y péptidos, y luego cada aminoácido se desamina a amoníaco y un ácido graso. Parte del amoníaco, la energía y otros productos del metabolismo microbiano, junto con algunos componentes del alimento, proporcionan los materiales para la síntesis de nuevas células microbianas. El resto de las proteínas y energía generadas por la transformación de los tejidos vegetales ingeridos por el animal se utilizan en los procesos de crecimiento, mantenimiento y producción (Cammack et al., 2018).

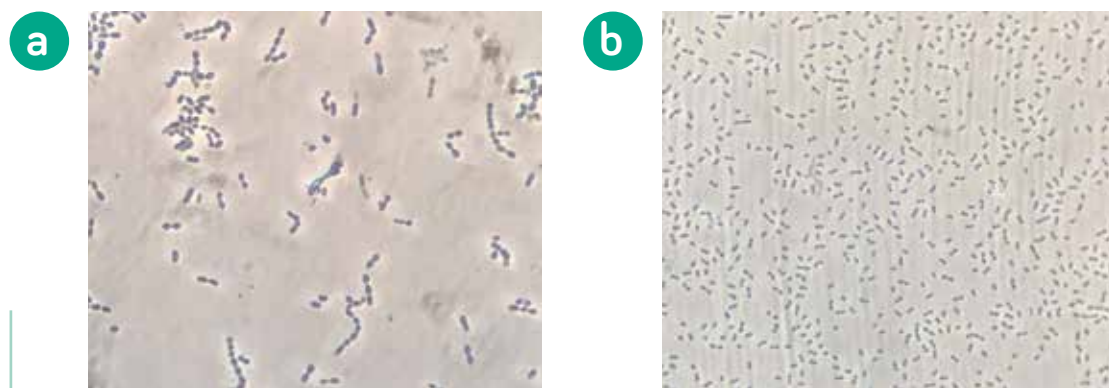


Figura 29. Bacterias anaerobias ruminales en fresco. *a. Streptococcus bovis*; *b. Ruminococcus flavefaciens*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Juan Camilo Ovalle Másmela

Bacterias

Las bacterias son el grupo predominante en el rumen: se calcula que el 95 % de las células (10^{10} - 10^{11} células/g de contenido) corresponden a este grupo, y su biomasa representa del 70 al 80 % del total de los microorganismos allí presentes (Fouts et al., 2012; Puniya et al., 2015; Theodorou & France, 2005). Debido a su amplia diversidad metabólica, se ha considerado clasificar a las bacterias según la preferencia de uso de sustratos y la producción de subproductos de la fermentación (Cammack et al., 2018). Con base en lo anterior, las bacterias se pueden clasificar en degradadoras de celulosa, hemicelulosa y almidón; utilizadoras de ácido; bacterias proteolíticas, y bacterias lipolíticas, entre otras; algunas especies se encuentran en dos o más de estas categorías (Edwards et al., 2004; McSweeney et al., 2005). Para el caso de dietas ricas en fibra, que contienen celulosa y hemicelulosa, las bacterias más representativas son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Prevotella ruminicola* (figuras 29 y 30) (Domingues Millen et al., 2016).

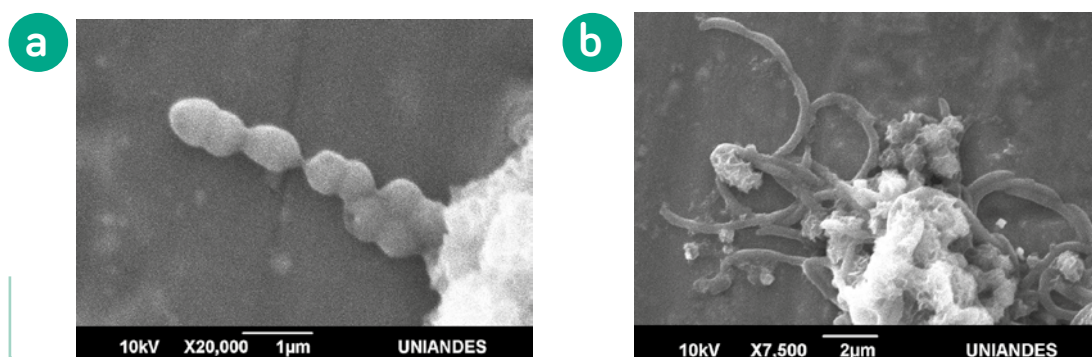


Figura 30. Bacterias anaerobias ruminales de la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) en microscopía electrónica confocal. **a.** *Streptococcus bovis*; **b.** *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes

Hongos

Los hongos del rumen son un grupo inusual de microorganismos zoospóricos simbióticos que desempeñan una función relevante en la colonización y transformación de los tejidos vegetales en el rumen (Orpin, 1975). Estos microorganismos son anaerobios obligados y su abundancia podría llegar hasta el 20 % de la biomasa microbiana total (según el método de cuantificación) en el rumen (Rezaeian et al., 2004); sin embargo, su contribución a la degradación

de los tejidos vegetales aún no se ha determinado con exactitud. Poseen una maquinaria enzimática compleja necesaria para la descomposición de los componentes de la pared celular de la planta, incluidas las celulasas, xilanasas, mannasas, esterasas, glucosidasas y glucanasas (Gruninger et al., 2014). Además de su potencial enzimático, los hongos pueden fracturar físicamente los tejidos vegetales y, así, facilitar los procesos de colonización microbiana (Akin & Borneman, 1990). El ciclo de vida de los hongos se alterna entre una etapa de zoospora (móvil) y una etapa vegetativa (no móvil) (figura 31). Las zoosporas producidas en el esporangio son atraídas a los tejidos vegetales recién ingeridos, presumiblemente por la respuesta quimiotáctica a azúcares solubles o ácidos fenólicos (Windham & Akin, 1984; Wubah & Kim, 1996). Las zoosporas liberadas se adhieren a los fragmentos de alimento, donde se enquistan y posteriormente germinan para producir un talo compuesto de rizoides y esporangios. El sistema rizoidal puede ser altamente ramificado y puede penetrar profundamente en los tallos de las plantas, con lo que ayuda a la degradación de los componentes de la pared celular. Los hongos anaerobios han sido clasificados en una sola familia, Neocallimasticaceae, dentro del filo Neocallimastigomycota, recientemente establecido. Actualmente, se han descrito once géneros de hongos anaerobios: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Orpinomyces*, *Buwchfawromyces*, *Oontomyces*, *Feramyces*, *Pecoramyces* y *Liebetanzomyces* (Gruninger et al., 2014; Joshi et al., 2018).

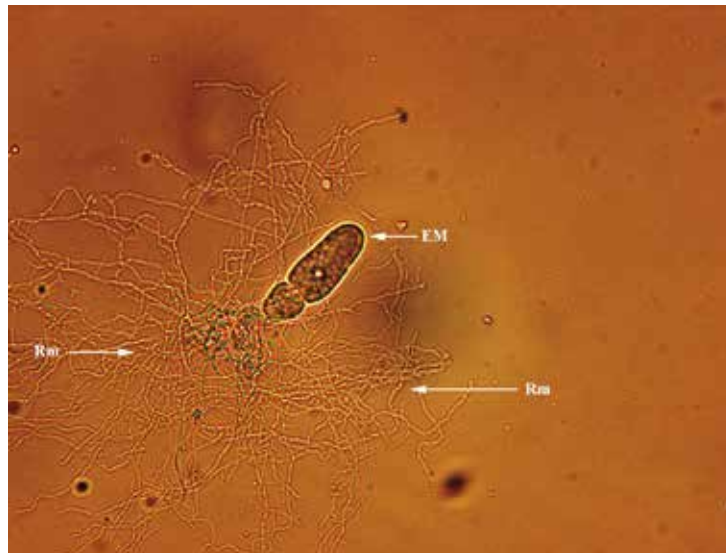


Figura 31. Hongo anaerobio ruminal monocéntrico en microscopía convencional.

Nota: Rm: rizomicelio filamentoso; EM: esporangio maduro.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: : Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal

Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de microorganismos anaerobios facultativos, Gram-positivos, no pigmentados, no esporulados y catalasa-negativos. Estos tienen la capacidad de fermentar un amplio rango de fuentes de carbohidratos a subproductos como el ácido láctico, el ácido acético y el CO₂. También tienen la capacidad de producir moléculas antimicrobiales como las bacteriocinas (Kandler, 1983). La producción de ácido láctico es clave en la conservación de alimentos, ya que se acidifica el medio, lo que evita el deterioro y extiende la vida útil de los productos, además de que actúa como inhibidor para el crecimiento de microorganismos considerados como indeseables. Como característica principal para su crecimiento *in vitro*, las bacterias lácticas requieren aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de crecimiento, y además son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Hassan & Frank, 2001; Stanley, 1998).

Las BAL pueden ser aisladas de diversos ambientes naturales, como el tracto gastrointestinal de vertebrados, productos lácteos, suelos y plantas (Narvhus & Axelsson, 2003). De acuerdo con la actual clasificación taxonómica, las BAL se agrupan en el filo Firmicutes, la clase Bacilli y el orden Lactobacillales, que comprende las siguientes familias: Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Lactobacillaceae y Streptococcaceae (Stiles & Holzapfel, 1997). Adicionalmente, según el criterio taxonómico genético, existen doce géneros de bacterias lácticas: Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Pediococcus, Vagococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Tetragenococcus, Carnobacterium y Weissella (figura 32) (Fox et al., 2017).

Las bacterias lácticas pueden clasificarse también por un criterio taxonómico fenotípico que incluye la apariencia morfológica (bacilos o cocos), la fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativas, heterofermentativas facultativas o heterofermentativas estrictas), el intervalo de temperatura de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes o no halotolerantes) (Drinan et al., 1976; Morales et al., 2011; Ni et al., 2015).

Además de ácido láctico, se ha reportado que las BAL producen otros productos de fermentación con actividad antibacteriana y antifúngica, como ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Ariyapitipun et al., 1999; Drinan et al., 1976; Morales et al., 2011; Ni et al., 2015). Por otro lado, se ha sugerido que las BAL pueden actuar como promotoras del crecimiento en plantas como el repollo y el tomate en la medida que producen compuestos volátiles relacionados con la promoción del crecimiento (Giassi et al., 2016; Parada et al., 1998; Vieco-Saiz et al., 2019).

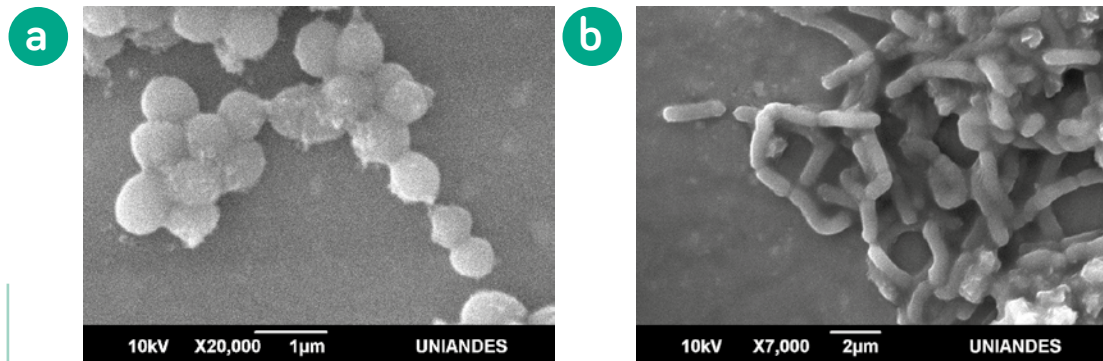


Figura 32. Bacterias ácido-lácticas de la CMINA en microscopía electrónica confocal. **a.** *Pediococcus acidilactici*; **b.** *Lactobacillus rhamnosus*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de los Andes

Cultivo de microorganismos anaerobios

Para el aislamiento de microorganismos anaerobios ruminales, se debe tener en cuenta los siguientes materiales. Con respecto a los microorganismos, se debe recordar su sensibilidad a las condiciones aerobias normales.

Redes de gasificación

Es importante contar con una red de gases, ya sea por tubería de cobre o por mangueras de silicona flexible; el calibre y grosor será el requerido según el tipo de acople de la manguera (figura 33).



Figura 33. Acoples utilizados para la red de gases de CO₂.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

La red de gasificación debe contar con agujas de cánula en acero inoxidable (1,5 × 150 mm) (figura 34) acopladas a la red. Respecto de los gases necesarios para generar una atmósfera anaerobia, se recomienda el uso de cilindros de gas con CO₂, N₂ o en mezcla de gases CO₂, N₂ y H₂ (80:15:5) libres de oxígeno (menos de 5 ppm) y de alta pureza (Cox & Mangels, 1976).



Figura 34. Aguja de gasificación de cánula en acero inoxidable.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

Para los puntos de distribución de medios de cultivo, es necesario contar con o elaborar un sistema de gasificación para tubos anaerobios (figura 35); este sistema permitirá garantizar que los medios de cultivo se mantengan anaerobios gracias a la atmósfera reducida en O₂.



Figura 35. Montaje de gasificación para tubos tipo Hungate y Blach.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

Ambientes anaerobios

Los microorganismos anaerobios requieren de condiciones anoxigénicas para su crecimiento y viabilidad, por lo que existen diferentes ambientes que pueden asegurar la atmósfera necesaria para su desarrollo. La colección CMINA realiza sus procesos en cámara anaeróbica (figura 36). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, el oxígeno es eliminado de la cámara gracias a un catalizador de paladio que reacciona con una mezcla de gases que contiene $H_2 \leq 5\%$ y forma agua. Para asegurar el ambiente anaerobio, la cámara cuenta con una esclusa de vacío programable que permite reducir los niveles de oxígeno contenidos en los materiales, y además previene el contacto con las condiciones ambientales externas. Una de las ventajas de la cabina es que permite el ajuste de dos temperaturas dentro del globo, una temperatura general y otra que se da gracias a la incubadora integrada. La cámara está hecha de PVC flexible y cuenta con un marco de aluminio.



Figura 36. Cámara anaeróbica usada en la CMINA.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Lina Marcela Botero

Los procesos anaeróbicos también pueden llevarse a cabo en jarras de anaerobiosis (figura 37), las cuales están diseñadas para una capacidad específica y son aptas para tubos y cajas de Petri tanto de vidrio como de plástico. Las jarras deben llevar en su interior un generador de CO_2 ; la absorción del

oxígeno ocurre en 30 minutos y genera niveles de oxígeno menores al 1 %; el interior de la jarra se mantiene en un nivel del 9 al 13 %.



Figura 37. Jarra de anaerobiosis.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Lina Marcela Botero

Otro método para garantizar las condiciones anoxigénicas es el uso de la cámara anaeróbica portátil, la cual consta de una bolsa hermética que permite la entrada del material a trabajar, así como la entrada de gases, mediante una manguera ubicada en un extremo de esta, lo que permite trabajar bajo diversas condiciones de atmósfera, según se requiera; su principal utilidad se da en salidas de campo, ya que permite manipular muestras que requieran estar protegidas de las condiciones ambientales normales, además de su fácil uso y transporte. Para su uso, se requiere de cilindros pequeños de gases para su purga y llenado.



Figura 38. Cámara anaeróbica portátil.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Lina Marcela Botero

Tubos de cultivo

El material de vidriería utilizado para la elaboración de los medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos, debe ser específico para este uso, por lo que se cuenta con dos tipos de tubo de cultivo que garantizan que la condición anaerobia se mantenga. El primer tipo de tubo es el Hungate, hecho de vidrio de borosilicato tipo 1, clase B, que se utiliza con un tapón de caucho butilo y una tapa rosca con abertura de 9 mm que permite la entrada de agujas al interior sin cambiar la atmósfera interna; la importancia de los tubos yace en el tipo de tapón, que debe ser de butilo, ya que evita el paso de oxígeno al interior del tubo (figura 39).

Por otro lado, el segundo tipo de tubo es el Blach (figura 40), útil para el método de *roll-tube* y para el aislamiento de hongos anaerobios; además, el diámetro de la boquilla permite una mejor manipulación para el aislamiento de colonias. Los tubos utilizan un tapón de butilo sostenido en un agrafe de aluminio; la manipulación de los agrafes necesita de un agrafador (la estructura que sostiene los tubos en la figura 39), ya que es la única manera de asegurar y quitar el agrafe.



Figura 39. Tubo tipo Hungate con tapón de butilo y tapa rosca.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Juan Camilo Ovalle Masmela



Figura 40. Tubo tipo Blach con tapón de butilo, agrafe y agrafador/desagrafador.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Lina Marcela Botero

Soluciones

Entre las soluciones que se utilizan para el cultivo de microorganismos anaerobios se encuentran las soluciones *buffer*, la solución de conservación anaerobia, la solución de AGV (composición en mL/L: ácido acético: 17; ácido butírico: 4; ácido propiónico: 6; ácido isobutírico: 1; ácido 2-metil-butírico: 1; ácido n-valérico 1; ácido isovalérico: 1, mezclados en un frasco ámbar y almacenados a 4 °C) y la solución indicadora de anaerobiosis; dichas soluciones son esenciales para la elaboración de medios de cultivo anaerobios y su implicación en el desarrollo de los microorganismos ruminales (Rodríguez et al., 2011).

Para la preparación de la solución de dilución anaerobia se utiliza la mezcla de las sales I y II (composición en g/L: sal I: K_2HPO_4 : 3; sal II: KH_2PO_4 : 3; $[NH_4]_2SO_4$: 6; NaCl: 6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1,23; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,79; disolver en el volumen requerido, mezclar en plancha de agitación y almacenar a 4 °C en botella ámbar); para un volumen de 100 mL, se agregan 15 mL de cada sal, 0,6 g de Na_2CO_3 , 0,1 mL de solución indicadora de resazurina (0,1 g de resazurina en 100 mL), 40 mL de agua destilada y 0,1 g de HCl-cisteína. La solución debe ser reducida, gasificada y, finalmente, esterilizada en autoclave.

Para realizar la solución de conservación anaerobia, se debe preparar solución de dilución anaerobia y mezclarse con un 15 % (p/v) de glicerol; la solución debe reducirse en condiciones de ebullición, distribuirse en tubos Hungate y, finalmente, esterilizarse en autoclave.



Medios de cultivo

La literatura ha reportado varios medios de cultivo para recuperar, según las necesidades concretas, microorganismos anaeróbicos ruminales. La tabla 8 muestra una serie de medios de cultivo usados por la colección para este fin.

Tabla 8. Medios de cultivo empleados en la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) para el aislamiento de microorganismos ruminales anaerobios.

Fuente	G/C*	CMC**	Xilán	Dilución
Carbono	Glucosa y celobiosa	Carboximetilcelulosa	Xilán	No aplica
Nitrógeno	Extracto de levadura	Extracto de levadura	Extracto de levadura	No aplica
Minerales	Sal I y sal II	Sal I y sal II	Sal I y sal II	Sal I y sal II
Vitaminas	Fluido ruminal	Fluido ruminal	Fluido ruminal	No aplica
AGV	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico	Ácidos: acético, butírico, propiónico, isobutírico, 2-metil-butírico, n-valérico e isovalérico
Otras	Resazurina y HCl-cisteína	Resazurina y HCl-cisteína	Resazurina y HCl-cisteína	Resazurina y HCl-cisteína

* G/C: glucosa/celobiosa. ** CMC: carboximetilcelulosa.

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

El mantenimiento de los medios de cultivo bajo condiciones anaerobias requiere el uso de agentes reductores de oxígeno, como el tioglicolato de sodio, el HCl-cisteína, el sulfuro de sodio nonahidratado, el ditioneol y el ditionito.

En la CMINA se utiliza resazurina y HCl-cisteína, que, en condiciones de ebullición y gasificación con CO₂, respectivamente, permiten la identificación y reducción completa del oxígeno presente en el medio de cultivo; aunque se utilizan principalmente para la preparación de caldos de cultivo, también tienen aplicabilidad en agar. La acción de la resazurina está mediada por la presencia-ausencia de oxígeno en el medio de cultivo; es así como, en la preparación, el medio se debe mantener en ebullición hasta alcanzar el punto de viraje de azul violeta a incoloro; sin embargo, cabe recalcar que el volumen preparado debe ser mayor al deseado, puesto que puede evaporarse. Para finalizar la reducción del medio, se debe añadir HCl-cisteína y proceder a gasificar mínimo 30 minutos antes de ser dispensado y esterilizado (Rodríguez et al., 2011).

Aislamiento y cuantificación

La CMINA hace uso de diferentes técnicas de aislamiento y cuantificación de microorganismos, los cuales están divididos en dos grandes grupos: bacterias anaerobias ruminales aisladas del tracto gastrointestinal de herbívoros y bacterias ácido-lácticas aisladas de muestras de ensilaje de maíz. Para su aislamiento, es necesario garantizar ciertas condiciones de transporte (figura 41): en el caso de las bacterias ácido-lácticas, es muy simple, ya que estas son bacterias facultativas y únicamente se debe transportar la muestra de ensilaje en un recipiente hermético debidamente rotulado; no obstante, en el caso de las bacterias de origen ruminal, la muestra —fluido ruminal— puede ser transportada de dos formas: la primera es en un frasco de vidrio ámbar a una temperatura de entre 39 y 41 °C, para mantener la viabilidad de los hongos ruminales, así como de algunas bacterias fastidiosas sensibles a los cambios de temperatura; la segunda forma de transporte es en nitrógeno líquido, proceso en el que el fluido ruminal es dispensado en tubos Falcon de 50 mL que contienen 10 mL de glicerol.

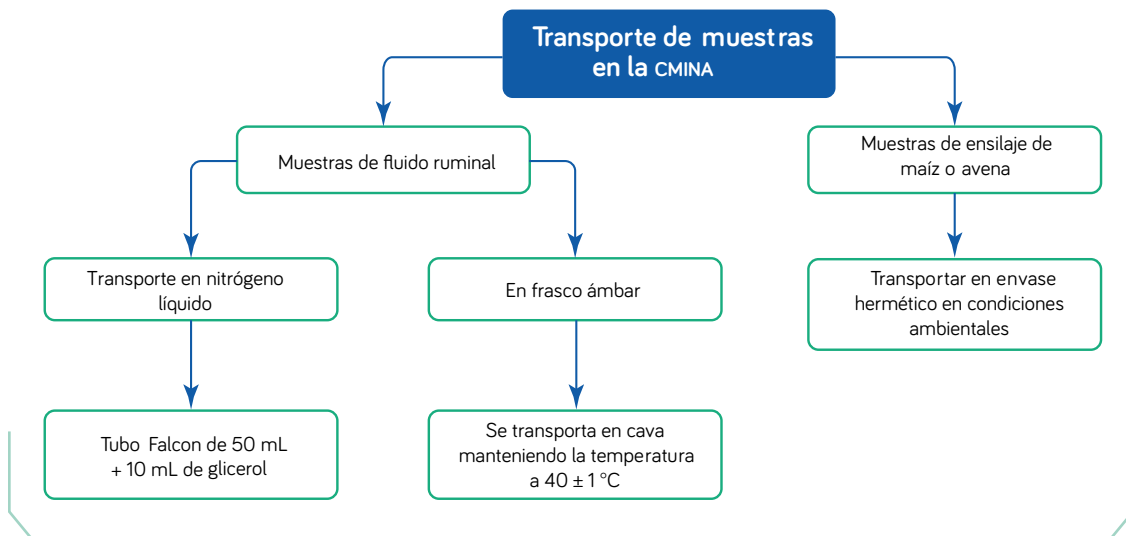


Figura 41. Procedimiento de transporte de una muestra para su aislamiento.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Método de *roll-tube*

La metodología de *roll-tube* ha sido ampliamente utilizada para el aislamiento de microorganismos anaerobios provenientes del rumen, pues posee la ventaja de mantener las condiciones anoxigénicas para la recuperación de bacterias y hongos, principalmente. La técnica fue desarrollada por Hungate (1969) y se basa en partir de una muestra con una concentración alta de microorganismos, la cual debe ser diluida el número de veces que se considere necesario para obtener una menor concentración y, por tanto, garantizar el crecimiento de colonias microbianas fácilmente aislables; el equipo de curadores de la CMINA realiza esta tarea utilizando solución de dilución anaerobia, mientras, paralelamente, se realiza el medio de cultivo sólido de interés, que es preparado en condiciones anaerobias, depositado en tubos tipo Blach con agrafe y esterilizado; el volumen de medio de cultivo para cada tubo es de 4,5 mL.

Después de la esterilización, los medios sólidos se ponen en baño de María a 60 °C para que se mantengan en estado líquido, previo a la inoculación. Para la inoculación, después de atemperar el medio de cultivo (que se mantiene en estado líquido) con agua fría para evitar que los microorganismos mueran al tener contacto con el medio caliente, se toman 0,5 mL de las diluciones con jeringa estéril y se depositan en el tubo Blach con el medio.



Figura 42. Crecimiento bacteriano con el método de *roll-tube*.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Autor: Fernando Rodríguez Villamizar

El medio inoculado debe ponerse en posición horizontal y colocarse sobre una superficie rodante con agua fría, permitiendo que el agar se desplace en todas las direcciones y se solidifique en una capa delgada en el interior del tubo. Una vez solidificados los tubos, se deben incubar de forma inclinada, a 30°, para evitar que el agua formada por sinéresis entre en contacto con las colonias que se forman.

La figura 42 muestra el crecimiento de colonias después del tiempo de incubación bajo la técnica de *roll tube*; de allí, las colonias pueden ser tomadas con asa estéril en cabina de anaerobiosis y repicadas en caldos anaerobios para su crecimiento.

Número más probable (NMP)

En este método, la muestra de contenido ruminal es diluida serialmente (1:10) en soluciones anaeróbicas; el número de diluciones depende de la turbidez del cultivo madre, pero se calcula que unas nueve son suficientes. De igual forma que con el método *roll-tube*, se inoculan 0,5 mL en el medio, que contiene agar líquido, se inocula por triplicado, y los tubos se incuban a 39 °C con una inclinación de 30°. Finalizado el tiempo de incubación, se cuentan las colonias por réplica, y este valor es promediado entre el número de réplicas para obtener la unidad formadora de colonias (UFC/mL) (Bryant & Burkey, 1953; Hungate, 1957).

Para más practicidad, los laboratorios de anaerobiosis combinan las bondades de cuantificación del método NMP con las facultades de cultivar en medio sólido la dilución de preferencia, lo que permite el aislamiento de los microorganismos más abundantes en un momento determinado. Tres réplicas (tubos) por dilución podrían ser suficientes, pero cuatro o cinco aumentan la precisión de detección del método.

RT-PCR para cuantificación

Cada especie bacteriana que habita el ecosistema microbiano ruminal porta dentro de su estructura molecular marcadores génicos altamente conservados pero, a la vez, con la suficiente variabilidad para distinguirla entre otras con las que comparte este nicho. Entre los marcadores más conocidos están los genes ribosomales, el citocromo oxidasa y la subunidad beta del ARN polimerasa. Estos marcadores no solo son de alto valor filogenético y discriminatorio, sino que son la sonda molecular que, detectada y cuantificada, permitirá la medición precisa de la abundancia de una especie, un género, una clase, un filo o una población (celulolítica, xilanolítica, proteolítica, entre otras) (Xue et al., 2018).

En otras palabras, si un animal recibe una dieta determinada, el investigador podrá, gracias a esta herramienta molecular, cuantificar los diferentes cambios en los grupos microbianos más dominantes del rumen (bacterias, protozoarios y hongos). A la par, podrá discriminar, dentro de un grupo (verbigracia, bacterias metanogénicas), cuál o cuáles son las especies o géneros más abundantes. Dicha cuantificación puede hoy realizarse en tiempo real mediante el uso de una PCR cuantitativa conocida como PCR en tiempo real (qRT-PCR, por sus siglas en

← Protozoo del rumen, *Entodinium* sp., CMINA



inglés). La qRT-PCR, a diferencia de la PCR convencional, no cuantifica cuándo la reacción de amplificación del ADN *target* (marcador o gen) ha alcanzado la fase *plateau*; por el contrario, lo hace en la fase logarítmica de este, ligeramente por encima o por debajo de su propio *threshold*.

La qRT-PCR también está diseñada para amplificar y detectar varios ADN *target* a la vez, y para esto se vale de marcajes previos con fluorocromos de espectro de emisión diferencial (sondas TaqMan) o sencillamente basado en los picos T_M (temperatura *melting*), en los cuales cada amplicón tiene un sello propio de denaturación de sus cadenas de ADN. Un ejemplo de dicha diferenciación se puede apreciar en la figura 43, en la cual, de manera simultánea, se cuantifica, mediante qRT-PCR, la abundancia de dos de los microorganismos más celulolíticos del rumen, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*, las arqueas, las metanogénicas, las bacterias totales y los hongos anaerobios ruminales (Tajima et al., 2001).

La cuantificación de estos microorganismos ruminales con qRT-PCR puede ser tanto absoluta como relativa: en la primera, se utiliza una curva de calibración para cada amplicón específico, para hacer la comparación, la valoración de densidad y el ajuste; en la segunda, cada grupo o especie de microorganismos es comparada de manera relativa con el grupo más abundante de la muestra, que en la mayoría de los casos son las bacterias totales (Denman & McSweeney, 2006).

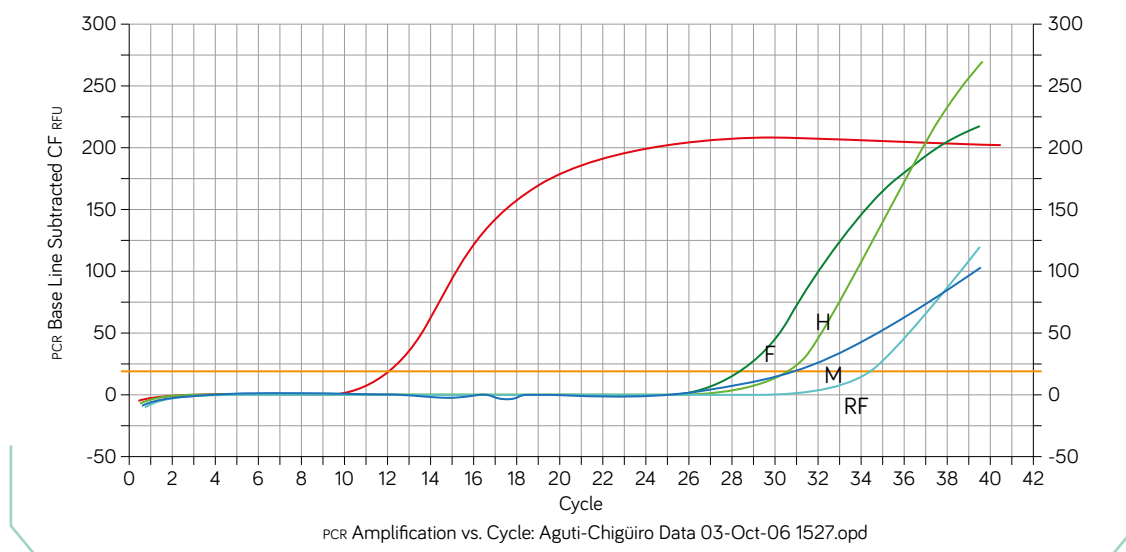


Figura 43. Cuantificación de microorganismos anaerobios en tiempo real.

Nota: H: hongos; F: *Fibrobacter*; RF: *Ruminococcus flavefaciens*; M: bacterias metanogénicas.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. Autor: Fernando Rodríguez Villamizar

Métodos de conservación empleados en la CMINA

La CMINA utiliza tres métodos de conservación: congelación, liofilización y siembra en intervalos, los cuales son descritos a continuación.

Congelación de accesiones bacterianas

Las bacterias anaerobias estrictas aisladas del rumen no resisten el contacto con el oxígeno (Scott et al., 1983), por lo cual la condición de conservación es compleja y requiere de procedimientos y equipamiento especiales. En el caso de las bacterias ácido-lácticas, el procedimiento es similar; no obstante, no se requiere garantizar condiciones de anaerobiosis estrictas, sino simplemente mantener una atmósfera de microaerofilia (Archibald & Fridovich, 1981). Es así como las cepas bacterianas son reactivadas en el caldo específico para bacterias ruminales o ácido-lácticas (medio anaerobio o MRS, respectivamente). Las cepas reactivadas son llevadas a incubación durante 24 horas a $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el caso de las anaerobias ruminales; por otro lado, las BAL son incubadas a la temperatura que más les favorezca (25, 28, 30, 37 o $41\text{ }^{\circ}\text{C}$). Terminado el tiempo de incubación, se realiza un repique de las cepas llevándolas nuevamente a incubación y deteniendo el crecimiento en el tiempo que corresponda, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria para cada cepa estudiada.

Posteriormente, las células son recogidas por centrifugación a 3.000 rpm. Para limitar la exposición al oxígeno, conviene elegir tubos de incubación que puedan usarse directamente en la centrifugadora. Una vez centrifugado el cultivo, el sobrenadante es eliminado de forma cuidadosa y, posteriormente, el *pellet* es resuspendido en una solución de conservación (solución de conservación para bacterias ruminales/L: sal I: 150 mL; sal II: 150 mL; glicerol: 150 mL; resazurina: 1 mL; bicarbonato de sodio [NaHCO_3]: 6 g; cisteína: 1 g; pH: 7,2; solución de conservación para BAL/L: NaCl: 8,5 g; glicerol: 150 mL), sin formar burbujas y buscando una concentración mínima de 1×10^8 células/mL; no obstante, como norma general, la concentración celular de las suspensiones deberá ser lo más alta posible. En el caso de las bacterias ruminales, cabe aclarar que cualquier manipulación inadecuada que suponga un exceso de aireación puede conllevar una pérdida absoluta de viabilidad (figura 44).

Una vez resuspendidas las células, son distribuidas en criotubos (1 mL/criotubo) y almacenadas en criocajas. La verificación de la conservación se realiza reactivando un tubo y evaluando la viabilidad de la cepa en periodos de tiempo establecidos.

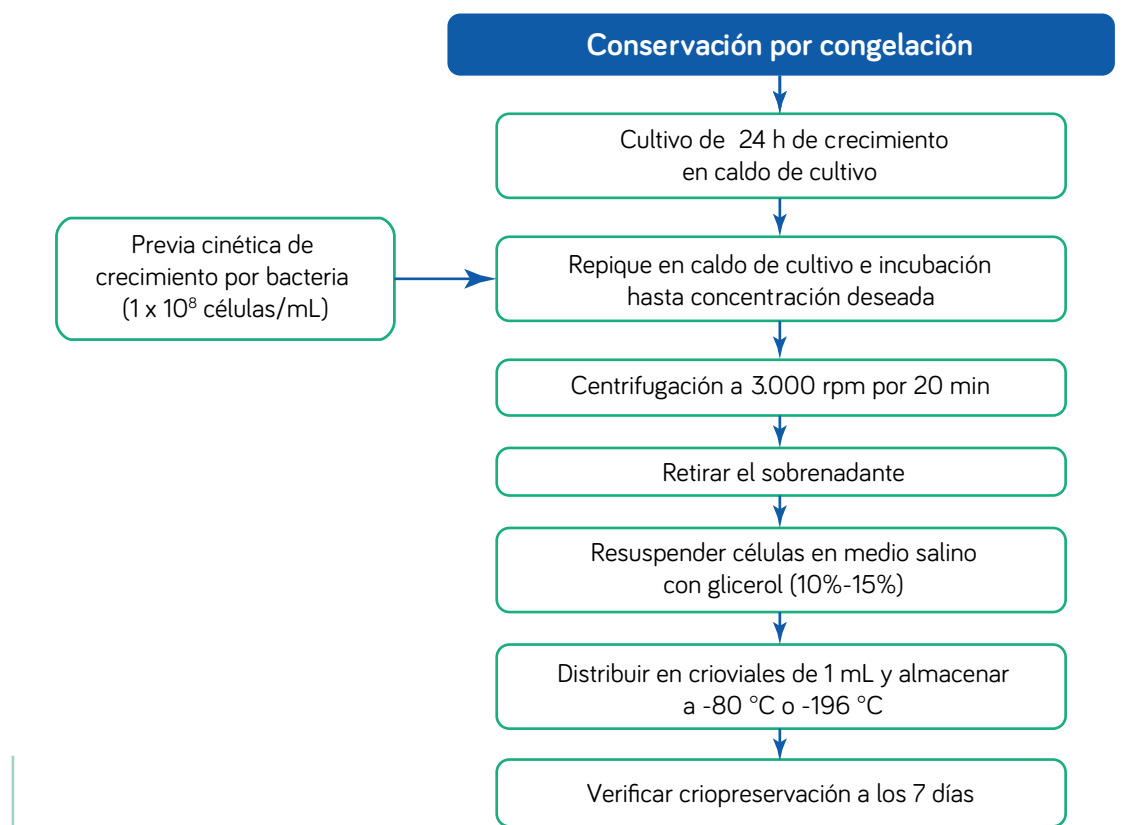


Figura 44. Procedimiento de conservación por congelación.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Liofilización de accesiones de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las BAL, ya que son catalogadas como GRAS (*generally recognized as safe*) y utilizadas como cultivos iniciadores de productos fermentados, como agentes bioconservadores o como probióticos, han despertado cada vez más interés en los investigadores y se ha incrementado la búsqueda de mecanismos más eficientes para la conservación y el manteniendo en el tiempo de sus características (Tamime & Robinson, 2007).

Por otro lado, si bien las BAL pueden ser conservadas en refrigeración por periodos cortos de tiempo y en congelación por periodos más largos, los

sistemas de entrega de estos métodos no favorecen sus condiciones de viabilidad, por lo que se decidió implementar la liofilización para este grupo de bacterias, con el fin de que su sistema de entrega permitiera reunir características fundamentales para la investigación y la industria. La primera característica está asociada con mantener el mayor número de células viables; la segunda se trata de contar con una accesión libre de contaminantes, y con la tercera, por último, se busca obtener una cepa que mantenga la actividad biológica por la que fue seleccionada y conservada (Zamora Rodríguez, 2003).

El proceso de liofilización de las BAL (figura 45), entonces, está determinado por tres fases: primero, el producto es precongelado para asegurar una estructura inicial sólidamente congelada; después, se procede con el secado primario, cuando el 90-95 % del agua es retirada, y, por último, el producto es sometido a un secado secundario para retirar el agua restante. No obstante, no toda el agua es retirada, y lo que resta representa la humedad residual. Para volver a su estado inicial, los cultivos liofilizados necesitan ser rehidratados y colocados en un medio de cultivo adecuado (Freire, 1999).

Antes de la liofilización de las BAL, se realiza la determinación de viabilidad de las cepas que pertenecen a la CMINA; estas cepas son reactivadas a partir de criovial a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el caldo MRS al 1 %, y luego son puestas en incubación por 24 horas a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se realiza una nueva inoculación en erlenmeyer, con el caldo MRS, a partir del cultivo con crecimiento, y se incuba bajo la misma temperatura durante el tiempo que tarde en alcanzar el punto final de la fase exponencial de cada cepa. Terminado el tiempo de incubación, se realiza dilución seriada del cultivo y se siembra masivamente con rastillo en cajas de agar MRS, para cuantificar la concentración de cada microorganismo mediante UFC. Las cajas inoculadas son incubadas a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas en condiciones de microaerofilia, y luego se realiza la lectura y cálculo de la concentración de cada cepa; este valor permitirá ajustar la concentración final para la liofilización.

Concluido lo anterior, y para iniciar la preparación de los inóculos para liofilización, cada cepa es sometida a un paso de preinoculación de 24 horas en caldo MRS, y a partir de este preinóculo se realiza la obtención del inóculo, ajustado en tiempo y concentración, partiendo de los datos anteriormente obtenidos y bajo las mismas condiciones de temperatura y cultivo. Posteriormente, las cepas con crecimiento son centrifugadas, el sobrenadante es retirado y las células son resuspendidas en solución lioprotectante. El contenido de cada accesión será distribuido en viales de vidrio, garantizando entre 5 y 10 liófilos por cepa. Una vez distribuida la suspensión, se sellan los viales con tapones de caucho y se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

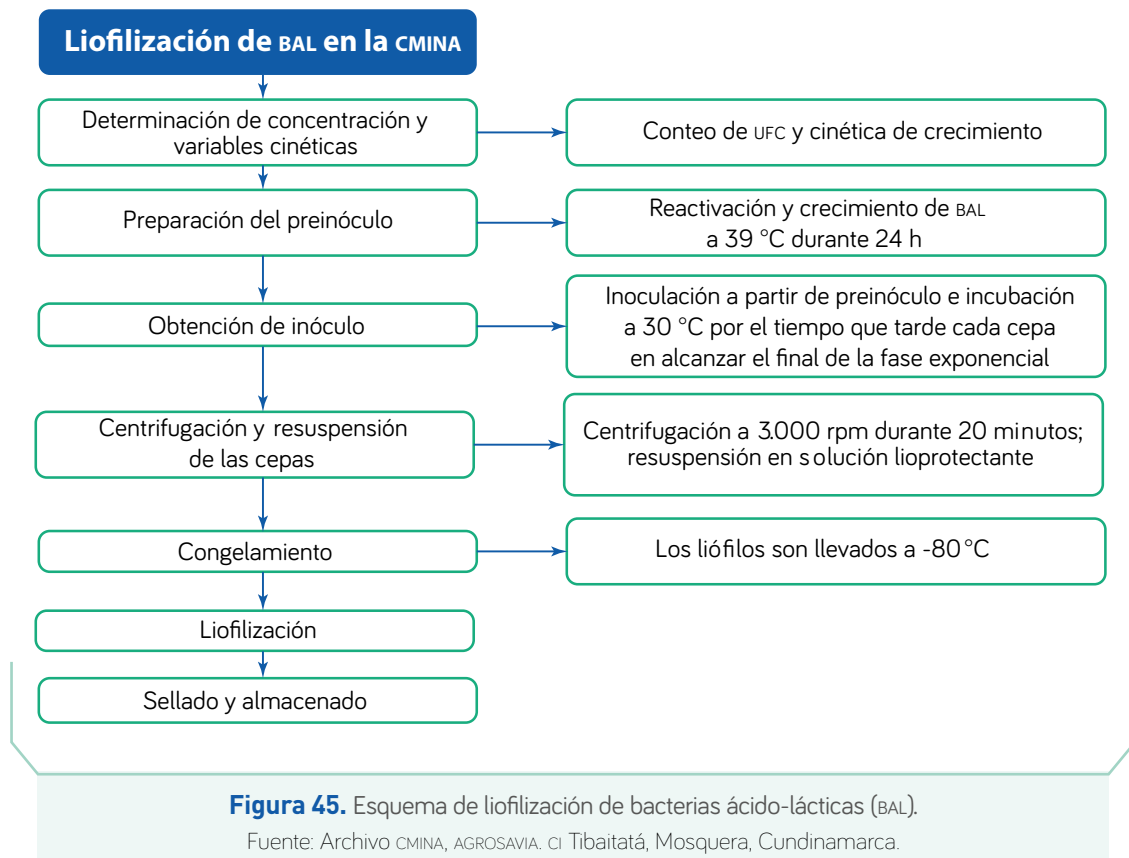
Luego, los viales congelados son sometidos al proceso de liofilización bajo las siguientes condiciones: 24 horas de secado, con una temperatura de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de vacío no superior a 1 hPa. Adicionalmente, cada una de las bandejas del liofilizador se programa con un aumento progresivo de temperatura, de la siguiente forma: 5 horas a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 horas a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 horas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 horas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, finalmente, 4 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$; finalizado el proceso de liofilización, se realiza el sellado de los liófilos, al vacío, empleando un compresor de 10 caballos de fuerza. Una vez sellados los viales, son retirados del liofilizador y agrafados con agrafes de aluminio para garantizar la integridad del material biológico liofilizado. Finalmente, los viales son rotulados con el código de la accesión y almacenados en condiciones de temperatura adecuadas.

Conservación por siembra en intervalos

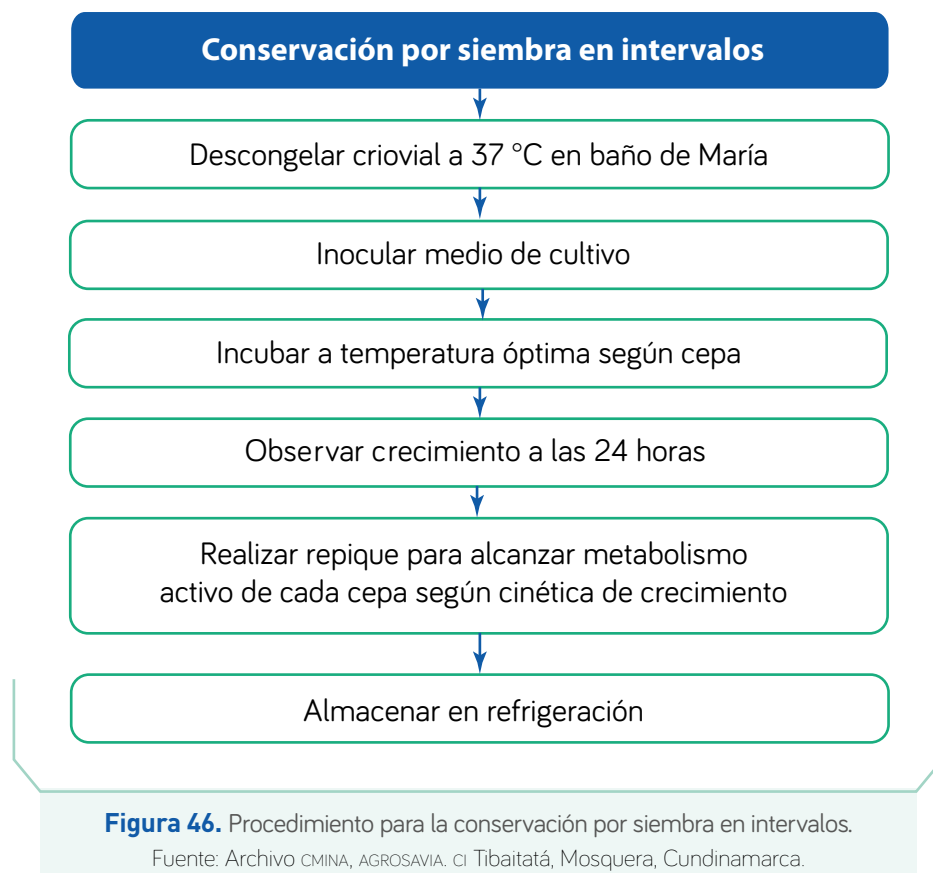
Entre los métodos que se utilizan para la conservación de BAL se encuentra la siembra por intervalos, considerada de corto plazo por los tiempos utilizados entre cada siembra. En las BAL se ha aplicado este método para facilitar el uso continuo de estos microorganismos sin necesidad de recurrir a su reactivación desde criovial; en la colección, las accesiones de BAL han sido caracterizadas por su cinética de crecimiento, lo cual resulta útil para retrasar el envejecimiento de las células y evitar tanto la generación de compuestos tóxicos como la pérdida de estabilidad celular; es así como, al conocer dicho parámetro, podemos realizar la conservación con volúmenes pequeños de inóculo.

Lactobacillus fermentum en agar MRS., CMINA →



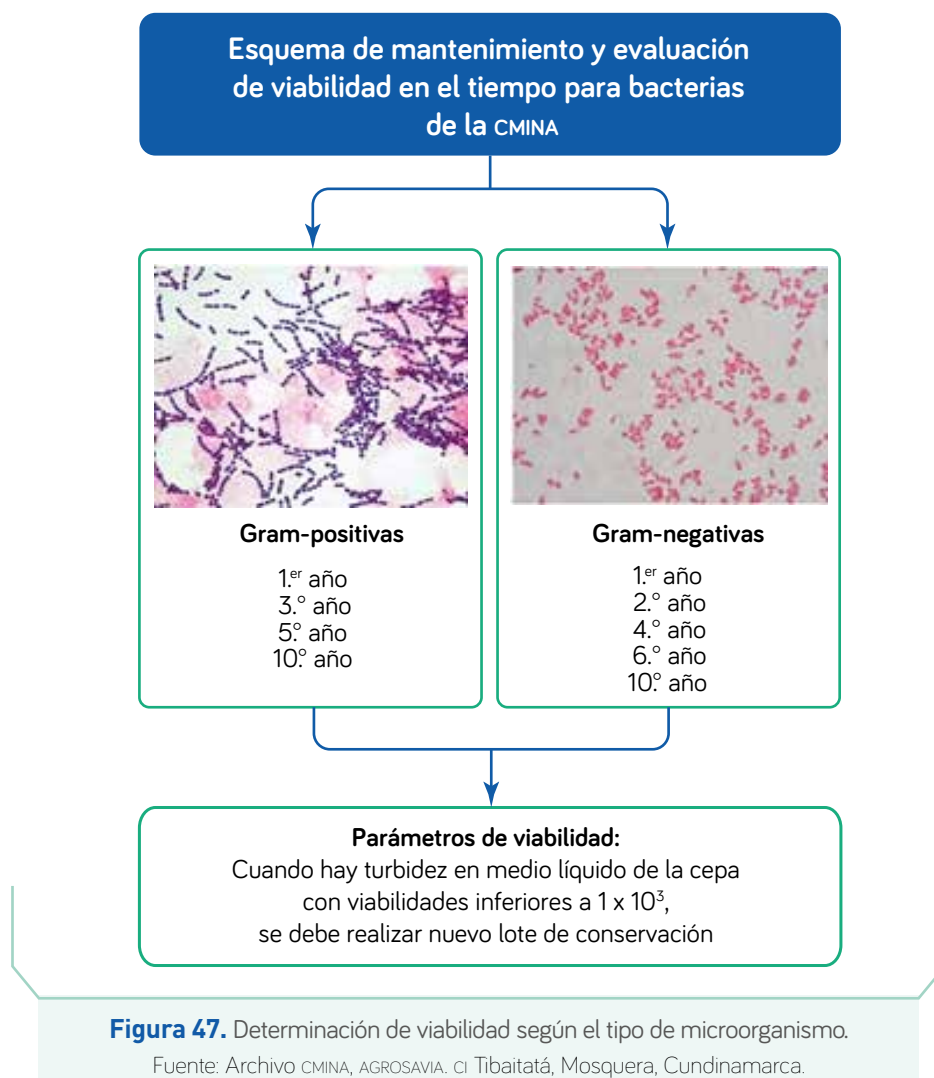


El proceso para esta conservación en BAL consiste en la toma de un volumen específico de un inóculo que surge de la reactivación de un criovial congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y depositado en un tubo con 10 mL de caldo MRS, el cual se deja incubar por 24 horas y sin agitación; después de este tiempo, se toma 1 mL del cultivo crecido y se deposita, nuevamente, en un tubo con 10 mL de caldo MRS (el periodo de incubación dependerá de la cinética de crecimiento del microorganismo); este tubo es considerado como inóculo, que será guardado en nevera, por un periodo corto de tiempo, inmediatamente después del periodo de incubación, para evitar que el crecimiento siga y la fase de muerte aparezca. Este tubo podrá ser guardado y utilizado para hacer “pases” o reactivaciones de forma rápida y sin necesidad de pasar por una fase de activación metabólica (figura 46).



Viabilidad de las cepas

La viabilidad de las accesiones de bacterias anaerobias ruminales y bacterias ácido-lácticas está determinada por el crecimiento de estos microorganismos en un medio específico bajo condiciones determinadas de temperatura (39 °C), anaerobiosis (CO₂) y microaerofilia, respectivamente. Las cepas evaluadas fueron previamente conservadas en congelación a -80 °C y son evaluadas, inicialmente, a los siete días del proceso de conservación; no obstante, la viabilidad de las accesiones depende no solo del método de conservación, sino del tipo de microorganismos y sus cualidades fisiológicas. Por tal razón, la CMINA ha establecido tiempos de evaluación de la viabilidad según el estrés por congelación producido por la conservación a largo plazo (figura 47). Sobre ese aspecto, estudios han reportado que las bacterias Gram-negativas son más susceptibles al estrés por congelación y tienden a disminuir o perder su viabilidad y actividad biológica en menor tiempo respecto de las bacterias Gram-positivas, debido a que la estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas es más resistente (Sánchez Leal & Corrales Ramírez, 2005).

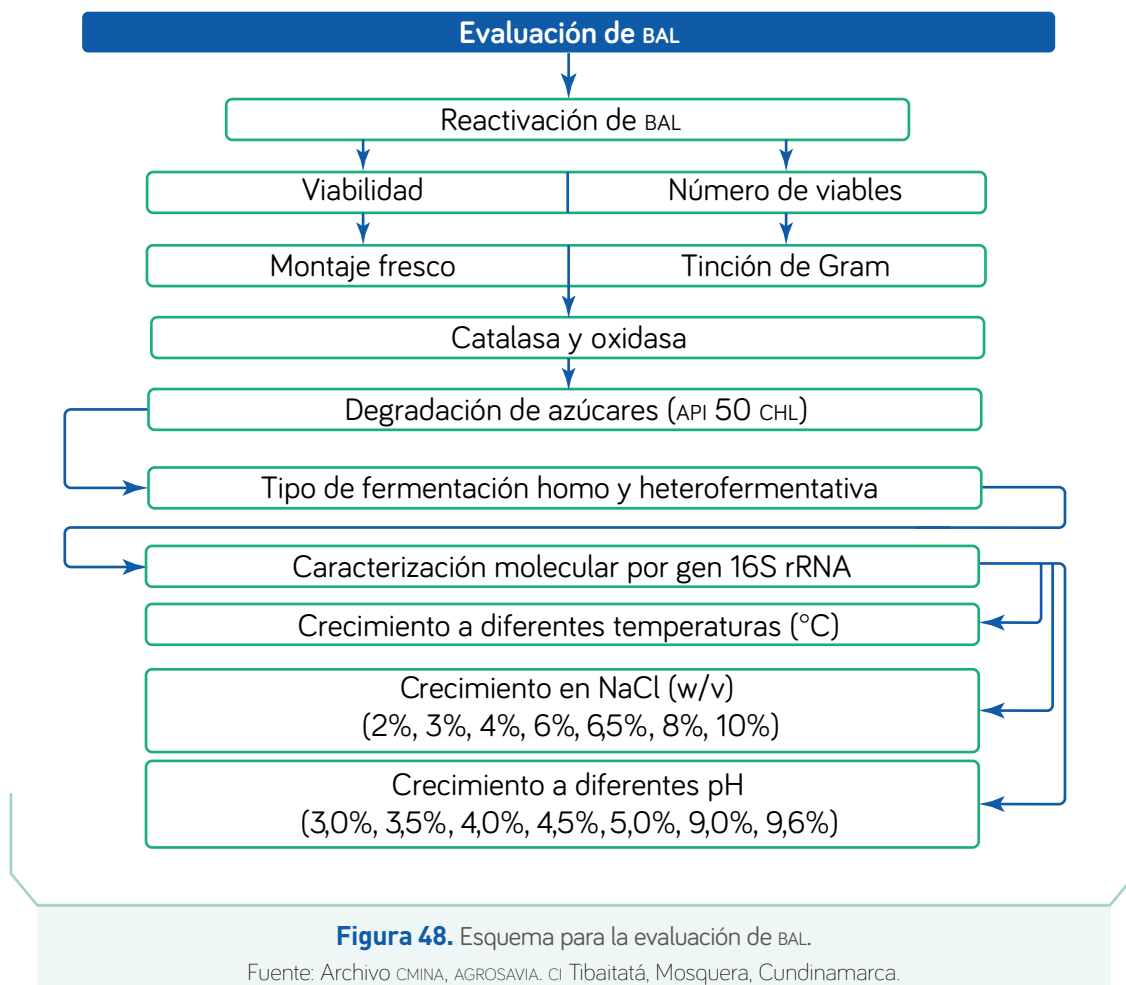


En la CMINA, la prueba de viabilidad se realiza reactivando un criovial en medio de cultivo para anaerobios ruminales con fuente de carbono glucosa (5 %) y celobiosa (5 %) e incubación por 24 horas. Por otro lado, las accesiones de BAL son reactivadas en el caldo MRS y puestas en incubación durante 24 horas. En ambos casos, los crioviales son descongelados por choque térmico en baño de María a 37 °C, con el fin de disminuir el daño celular por descongelación. La viabilidad de las cepas de la CMINA es, entonces, determinada por la turbidez de cada grupo de bacterias en el medio de cultivo.

Adicionalmente, se determina el número de viables de cada cepa, con el fin de identificar si alguna de las accesiones que se están evaluando ha perdido viabilidad y necesita realizarse un nuevo lote de conservación (figura 46).

Autenticación de cepas

Una actividad fundamental en el mantenimiento y conservación de cepas en una colección de microorganismos es la autenticación de las cepas que se ingresan, conservan y entregan a y por usuarios internos y externos. Al respecto, la CMINA usa diferentes métodos para autenticar sus accesiones; estos procedimientos han sido seleccionados teniendo en cuenta la importancia básica de la autenticación de las cepas de la colección. Así, en las figuras 48 y 49 se presenta todo el esquema de caracterización de una cepa en la CMINA. Dichos procedimientos permiten el estudio en profundidad de cada microorganismo y se realizan con el objeto de buscar el potencial de bioprospección de la diversidad microbiana contenida en la colección.



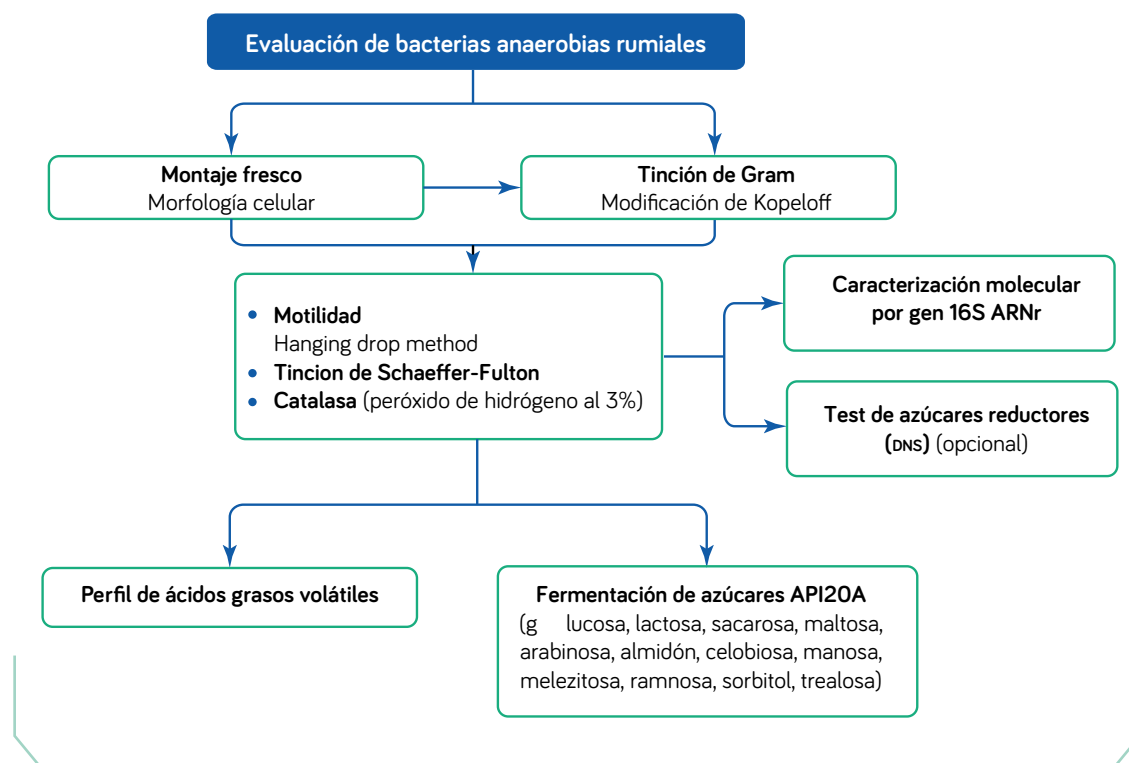


Figura 49. Esquema para la evaluación de bacterias anaerobias ruminales.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

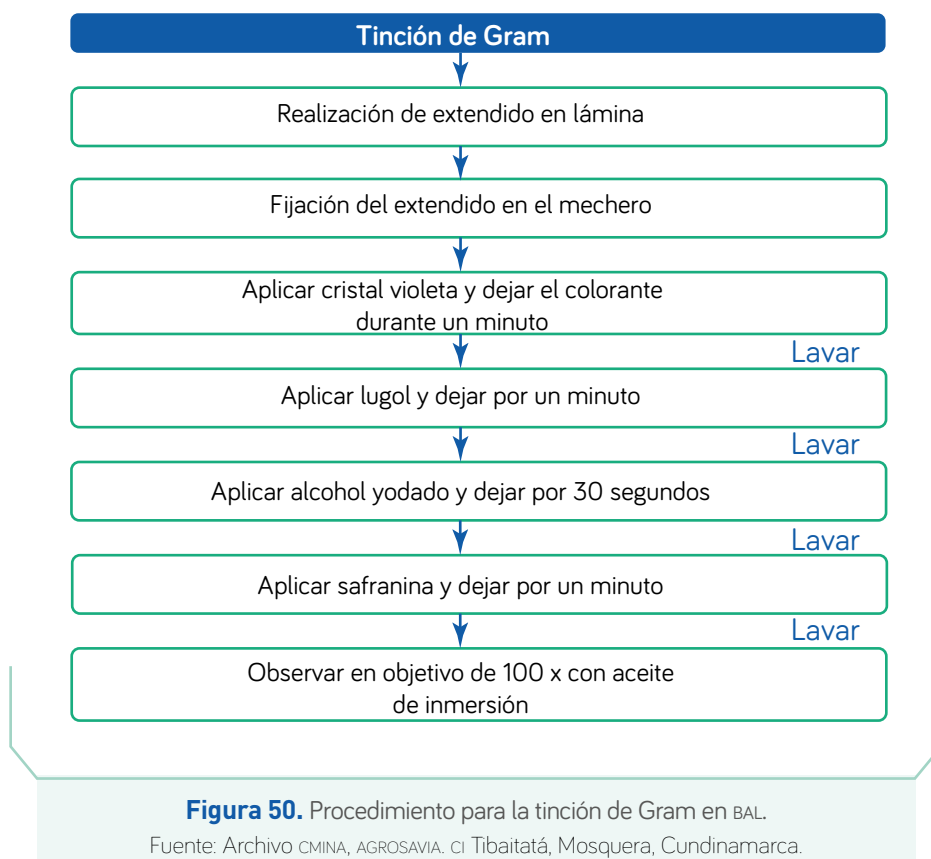
A continuación se describen los principales métodos para la autenticación de BAL y bacterias anaerobias ruminales de la CMINA. Cabe decir que estos son los métodos mínimos, pero estrictamente necesarios, para evaluar la autenticidad de las cepas de la colección.

Grupo de bacterias ácido-lácticas (BAL)

Dentro de la CMINA se encuentra una colección de BAL que han sido aisladas de ensilajes de maíz y de avena; este grupo ha sido ampliamente estudiado y caracterizado mediante la tinción de Gram, la prueba de catalasa y oxidasa, el perfil bioquímico y su actividad biológica.

Tinción de Gram

Para la autenticación de las accesiones de BAL, se ha establecido una tinción de Gram estándar (figura 50) como uno de los primeros pasos de verificación (Gerhardt et al., 1981), y el resultado de dicha tinción debe arrojar que la BAL es Gram-positiva; dentro del grupo de las BAL, se destacan los géneros



Streptococcus, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Aerococcus* (Narvhus & Axelsson, 2003), de los cuales los tres primeros se encuentran en la colección.

Catalasa y oxidasa

Para la autenticación de las BAL, es necesario realizar las pruebas de catalasa y oxidasa; las BAL son catalasa y oxidasa-negativas (Settanni & Moschetti, 2010). La prueba de catalasa es realizada con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3 % en una lámina portaobjetos para cultivos crecidos en agar. Para esto, se debe tomar, con un asa estéril, una muestra de una colonia de un cultivo fresco y depositarla en la lámina portaobjetos; acto seguido, se pone una gota de H_2O_2 sobre la biomasa y se deja actuar. La reacción debe ser negativa, por lo que no debe haber formación de burbujas (figura 51). Para la prueba de oxidasa, por su parte, se cuenta con colonias de un cultivo fresco; después, con la ayuda de un asa estéril, se toma una colonia y se ubica sobre la membrana de una tira comercial de oxidasa. La reacción positiva es evidenciada por el cambio de color de la tira a morado, debido a la reacción enzimática; sin embargo, en el caso de las BAL, el resultado es negativo y el viraje de color no se da (figura 52).

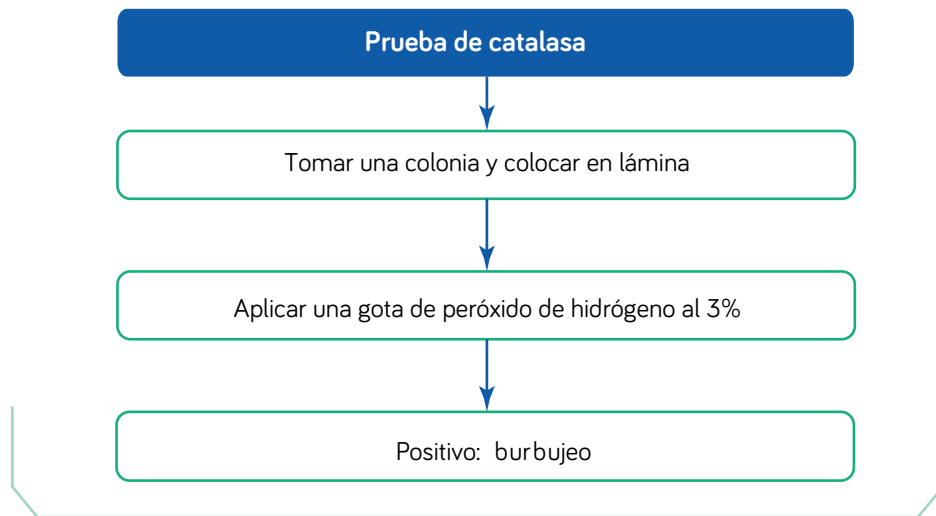


Figura 51. Procedimiento para la prueba de catalasa.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

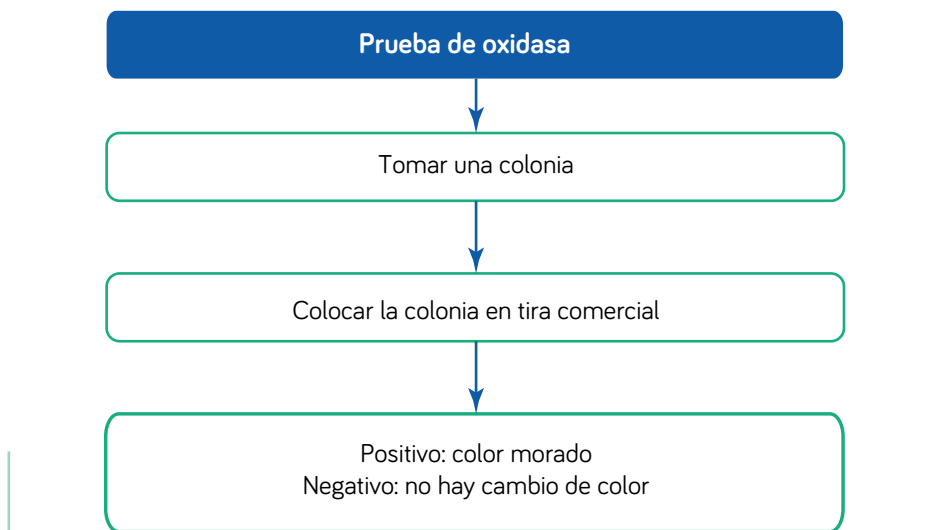


Figura 52. Procedimiento para la prueba de oxidasa.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Caracterización bioquímica

Son diversos los métodos comerciales de identificación bioquímica; sin embargo, el grupo de curadores de la colección realiza la caracterización bioquímica mediante el uso del kit API 50 CHL, que permite la identificación de *Lactobacillus* sp. y especies cercanas.

Actividad biológica

La bioprospección de las BAL es una constante en la CMINA, ya que permite determinar la actividad antimicrobiana que puedan tener estas cepas frente a patógenos a nivel pecuario y agrícola. Para la determinación de esta habilidad, se utiliza la técnica *spot-on-lawn* (Hilal Cadirci & Citak, 2005), la cual consiste en la inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana o fúngica patógena mediante la producción de metabolitos extracelulares por parte de otro microorganismo antagonista.

A partir de cultivos de BAL en caldo MRS con 24 horas de crecimiento a $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, se inocula una microgota de $10\text{ }\mu\text{L}$ en caja de Petri en agar selectivo y se deja secar durante media hora. Posteriormente, se incuba a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ en jarra de anaerobiosis con sobres de anaerobiosis durante 24 horas. Después de la formación de colonias visibles, se añade agar PDA semisólido (0,85 %), para evaluar hongos, o agar BHI (*brain heart infusion*), para bacterias. A continuación, el medio semisólido se inocula con 1×10^4 esporas/mL o con 1×10^8 bacterias/mL. El agar semisólido se deja solidificar durante cinco minutos y se incuba con las condiciones y el tiempo determinados para cada microorganismo (bacterias: $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en microaerofilia; hongos: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, y levaduras: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). La actividad antagónica positiva se verifica por la formación de halos alrededor de la colonia de BAL con un diámetro mayor a 1 mm (figura 53).

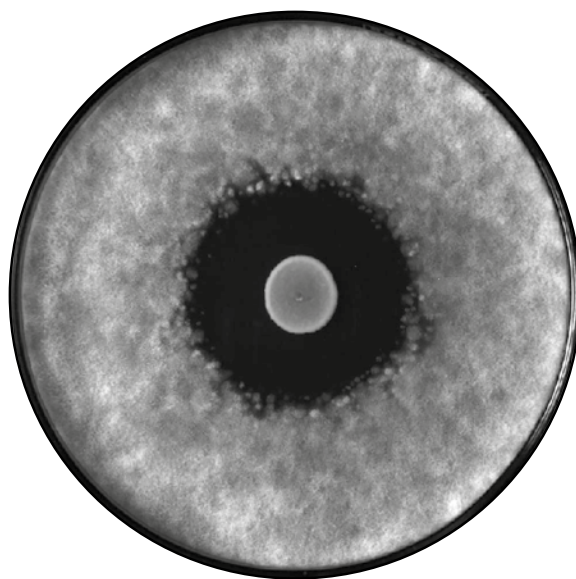


Figura 53. Determinación de la actividad antagónica de BAL contra *Fusarium oxysporum* MAP5.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Grupo de bacterias anaerobias

Dentro de la CMINA se encuentra una colección de bacterias anaerobias que han sido aisladas de ensilajes de maíz y de avena; este grupo ha sido ampliamente estudiado y caracterizado mediante la tinción de Gram, la prueba de catalasa y oxidasa, el perfil bioquímico y su actividad biológica.

Tinción de Gram

Las bacterias anaerobias ruminales de la CMINA son teñidas mediante coloración de Gram; sin embargo, en este caso se realiza una modificación propuesta por Spiegel (1991), denominada Kopeloff, que consiste, básicamente, en reemplazar la safranina por fucsina básica (figura 54).

Montaje en fresco

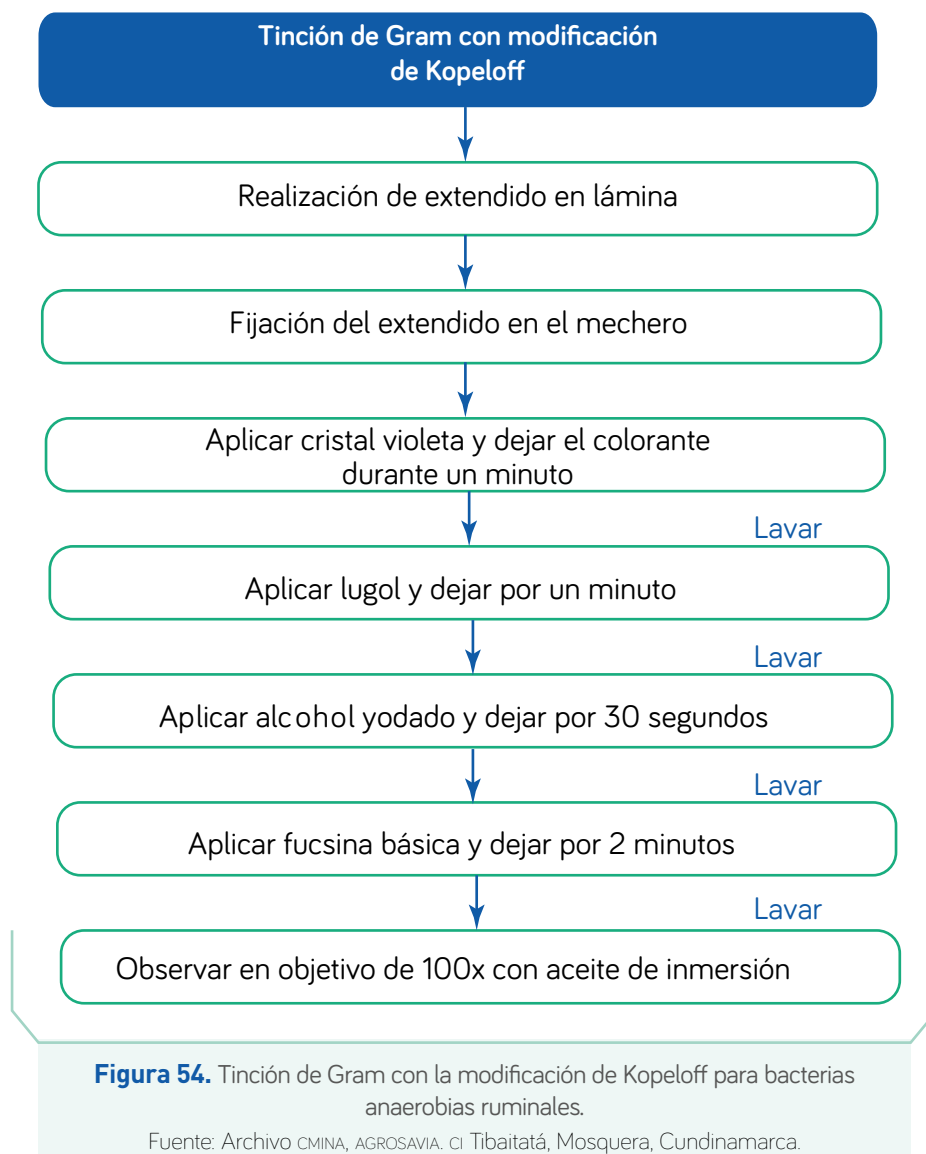
Una de las estrategias para la autenticación de microorganismos anaerobios ha sido la visualización de estos en un montaje en fresco; este montaje permite la diferenciación morfológica rápida en un microscopio de contraste de fases, además de la descripción de características únicas, como motilidad, presencia de flagelos y estructuras internas, u otras morfológicas que no son visibles al realizar montajes fijados, como las tinciones. Es importante que el montaje sea realizado en un microscopio de contraste de fases, ya que la luz refracta de diferente manera en cada una de las partes del microorganismo, lo que permite ver en detalle su composición (Montalvo Arenas, 2010).

Caracterización bioquímica

En contraste con las BAL, la identificación bioquímica de las bacterias anaerobias ruminales se realiza mediante el *kit* API® 20A, el cual permite la identificación de algunas especies de microorganismos del rumen de herbívoros silvestres. No obstante, esta metodología es limitada por el alcance de la base de datos para este grupo de microorganismos, pero sirve como fuente de información sobre la degradación de algunos sustratos.

Crecimiento microbiano

Un aspecto clave en la conservación de microorganismos en una colección está asociado con la descripción del crecimiento de las cepas. El conocimiento de los tiempos de crecimiento, así como de otras variables —biomasa, velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación, entre otras—, permite conocer el estado de las células que se conservan, lo que garantiza



que se pueda tener un cultivo joven, con posibilidad de almacenamiento en el tiempo, sin afectar radicalmente la viabilidad, además de que facilita el diseño de experimentos y la manipulación de los microorganismos.

Para la determinación del crecimiento de las bacterias anaerobias ruminales, el crecimiento se lleva a cabo en un medio anaerobio específico para el microorganismo (tabla 8). Inicialmente, las bacterias son reactivadas poniendo los criotubos en un baño serológico a $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, y posteriormente se inocula 1 mL del contenido del criotubo en 9 mL del medio de crecimiento para

bacterias anaerobias. Finalizado el tiempo de incubación, se realiza una nueva siembra a partir del tubo con crecimiento: se inoculan 0,3 mL en 30 mL del caldo anaerobio, y se cuantifica su crecimiento mediante absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, utilizando un espectrofotómetro, en intervalos de una hora hasta alcanzar la fase estacionaria.

Para el análisis de los datos obtenidos, se emplea un modelo de tipo no estructurado y no segregado (Garcia-Ochoa & Santos, 1994). Este modelo permite describir el incremento de la biomasa en el tiempo, además de que se ajusta de acuerdo con el comportamiento de cada bacteria respecto de los datos experimentales recolectados en el tiempo (figura 55). Para esto, se emplea la ecuación logística, que está ajustada a los parámetros necesarios.

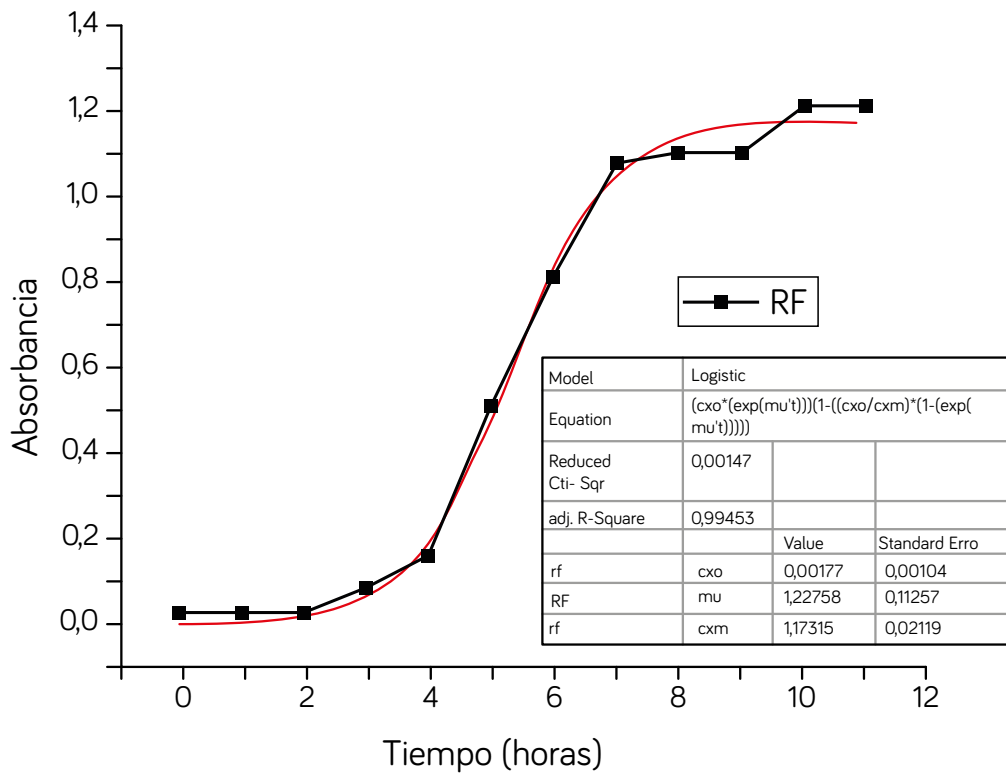


Figura 55. Evaluación de crecimiento de una cepa de la CMINA.

Fuente: Archivo CMINA, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Caracterización molecular

En la CMINA, la caracterización molecular es un paso fundamental para la caracterización y autenticación de las accesiones, y para realizarla se ha utilizado la identificación del gen 16S rARN, con los *primers universales* 27F (5'AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTACGACTT3') (Chen et al., 2015), como identificación general para todas las bacterias del banco; sin embargo, también se han utilizado *primers* específicos para identificación de microorganismos anaerobios ruminales (tabla 9).

Estos *primers* sirven para la detección específica y la cuantificación de dichos microorganismos mediante RT-PCR.

Tabla 9. Listado de *primers* utilizados para la identificación de bacterias anaerobias ruminales.

Microorganismo	Cepa de referencia	Primer	
		Forward	Reverse
<i>Prevotella ruminicola</i>	ATCC 19189 ^T	GGTTATCTTGAGTGAGTT	CTGATGGCAACTAAAGAA
<i>Prevotella bryantii</i>	B,4 ^T	ACTGCAGCGCGAACTGTCAGA	ACCTTACGGTGGCAGTGTCTC
<i>Prevotella albensis</i>	M384 ^T	CAGACGGCATCAGACGAGGAG	ATGCAGCACCTTCACAGGAGC
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	ATCC 19169 ^T	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	ATCC 29744 ^T	CAACCAGTCGCATTCAGA	CACTACTCATGGCAACAT
<i>Selenomonas ruminantium</i> o <i>Mitsuokella multiacida</i>	JCM 6582 ^T	TGCTAATACCGAATGTTG	TCCTGCACTCAAGAAAGA
<i>Streptococcus bovis</i>	JCM 5802 ^T	CTAATACCGCATAACAGCAT	AGAAACTTCCTATCTCTAGG
<i>Treponema bryantii</i>	ATCC 33254 ^T	AGTCGAGCGGTAAGATTG	CAAAGCGTTTCTCTCACT
<i>Eubacterium ruminantium</i>	ATCC 17233 ^T	GCTTCTGAAGAATCATTGAAG	TCGTGCCTCAGTGTCAAGTGT
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	ATCC 33276 ^T	TGGGTGTTAGAAATGGATTC	CTCTCCTGCACTCAAGAATT
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	ATCC 19716 ^T	TGGGAAGCTACCTGATAGAG	CCTTCAGAGAGGTTCTCACT
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	ATCC 19208 ^T	GGACGATAATGACGGTACTT	GCAATCYGAACTGGGACAAT

Fuente: Tajima et al. (2001)

Referencias

- Akin, D. E., & Borneman, W. S. (1990). Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3.023-3.032. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78989-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78989-8)
- Archibald, F. S., & Fridovich, I. (1981). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 146(3), 928-936. <https://doi.org/10.1128/jb.146.3.928-936.1981>
- Ariyapitipun, T., Mustapha, A., & Clarke, A. D. (1999). Microbial shelf life determination of vacuum-packaged fresh beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin solutions. *Journal of Food Protection*, 62(8), 913-920. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.8.913>
- Bryant, M. P., & Burkey, L. A. (1953). Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science*, 36(3), 205-217. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(53\)91482-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(53)91482-9)
- Cammack, K. M., Austin, K. J., Lamberson, W. R., Conant, G. C., & Cunningham, H. C. (2018). Ruminnat nutrition symposium: Tiny but mighty: the role of the rumen microbes in livestock production. *Journal of Animal Science*, 96(2), 752-770. <https://doi.org/10.1093/jas/skx053>
- Chen, Y.-L., Lee, C.-C., Lin, Y.-L., Yin, K.-M., Ho, C.-L., & Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(18), artículo S13. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S13>
- Cox, M. E., & Mangels, J. I. (1976). Improved chamber for the isolation of anaerobic microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(1), 40-45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274386/>
- Dehority, B. A. (2002). Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: Anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), 145-160. <https://doi.org/10.1080/09712119.2002.9706367>
- Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2006). Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *fems Microbiology Ecology*, 58(3), 572-582. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x>
- Domingues Millen, D., De Beni Arrigoni, M., & Dias Lauritano Pacheco, R. (eds.). (2016). *Rumenology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2>
- Drinan, D. F., Tobin, S., & Cogan, T. M. (1976). Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(4), 481-486. <https://doi.org/10.1128/aem.31.4.481-486.1976>
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J., & Wallace, R. J. (2004). 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(3), 263-281. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000047942.69033.24>

- Fouts, D. E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C., MacNeil, M. D., Alexander, L. J., & Nelson, K. E. (2012). Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS ONE*, 7(11), artículo e48289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048289>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of cheese science* (2.ª ed.). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
- Freire, J. R. (1999). Conservación de cultivos de rhizobios. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(1), 35-45.
- García-Ochoa, F., & Santos, V. E. (1994). Revisión cinética de transformaciones usando microorganismos: modelos cinéticos no estructurados. *Anales de Química*, 90, 7-17.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., & Phillips, G. B. (1981). *Manual of methods for general bacteriology*. ASM Press.
- Giassi, V., Kiritani, C., & Kupper, K. C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>
- Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., Fliegerova, K., Griffith, G. W., Forster, R., Tsang, A., McAllister, T., & Elshahed, M. S. (2014). Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): Advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12383>
- Hassan, A. N., & Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. En E. H. Marth, & J. Steele (eds.), *Applied dairy microbiology* (2.ª ed., pp. 151-206). CRC Press.
- Hilal Cadirci, B., & Citak, S. (2005). A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4), 237-241. <https://doi.org/10.3923/pjn.2005.237.241>
- Hofmann, R. R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: A comparative view of their digestive system. *Oecologia*, 78(4), 443-457. <https://doi.org/10.1007/BF00378733>
- Hungate, R. E. (1957). Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration. *Canadian Journal of Microbiology*, 3(2), 289-311. <https://doi.org/10.1139/m57-034>
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En J. R. Norris, & D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology* (vol. 3, parte B, pp. 117-132). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8)
- Jami, E., White, B. A., & Mizrahi, I. (2014). Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS ONE*, 9(1), artículo e85423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085423>
- Joshi, A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., & Dagar, S. S. (2018). *Liebertanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from the rumen of a goat. *MycKeys*, 40, 89-110. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.40.28337>

- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., & McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 663-693. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X)
- McSweeney, C. S., Blackall, L. L., Collins, E., Conlan, L. L., Webb, R. I., Denman, S. E., & Krause, D. O. (2005). Enrichment, isolation and characterisation of ruminal bacteria that degrade non-protein amino acids from the tropical legume *Acacia angustissima*. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1-2), 191-204. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.018>
- Montalvo Arenas, C. E. (2010). *Microscopía*. http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf
- Morales, F., Morales, J. I., Hernández, C. H., & Hernández-Sánchez, H. (2011). Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6), 889-905. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9182-6>
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. En L. Trugo, & P. M. Finglas (eds.), *Encyclopedia of food science and nutrition* (2.^a ed., pp. 3.465-3.472). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>
- Ni, K., Wang, Y., Li, D., Cai, Y., & Pang, H. (2015). Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *PLoS ONE*, 10(3), artículo e0121967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121967>
- Orpin, C. G. (1975). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 91(2), 249-262. <https://doi.org/10.1099/00221287-91-2-249>
- Parada, J. L., De Caire, G. Z., de Mulé, M. C. Z., & De Cano, M. M. S. (1998). Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 45(3), 225-228. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00151-2)
- Puniya, A. K., Singh, R., & Kamra, D. N. (2015). *Rumen microbiology: From evolution to revolution*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3>
- Rezaeian, M., Beakes, G. W., & Parker, D. S. (2004). Methods for the isolation, culture and assessment of the status of anaerobic rumen chytrids in both *in vitro* and *in vivo* systems. *Mycological Research*, 108(10), 1.215-1.226. <https://doi.org/10.1017/S0953756204000917>
- Rodríguez, F., Martín, E., Laverde, C., Mayorga, O. L., Carvajal, F., Rodríguez, T. A., & Rodríguez, J. A. (eds.). (2011). *Manual de laboratorio para el estudio de microorganismos anaerobios obligados*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13270/73338_58163.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Sánchez Leal, L. C., & Corrales Ramírez, L. C. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3), 109-113. <https://doi.org/10.22490/24629448.23>

- Scott, R. I., Yarlett, N., Hillman, K., Williams, A. G., Lloyd, D., & Williams, T. N. (1983). The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. *Journal of Applied Bacteriology*, 55(1), 143-149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02658.x>
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Spiegel, C. A. (1991). Bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(4), 485-502. <https://doi.org/10.1128/cmr.4.4.485>
- Stanley, G. (1998). Cheeses. En J. B. Wood (ed.), *Microbiology of fermented foods* (2.^a ed., vol. 1, pp. 263-307). Blackie Academic & Professional.
- Stiles, M. E., & Holzapel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Benno, Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2766-2774. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt: Science and technology*. Elsevier.
- Theodorou, M. K., & France, J. (2005). Rumen microorganisms and their interactions. En J. Dijkstra, J. M. Forbes, & J. France (eds.), *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism* (2.^a ed., pp. 207-228). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851998145.0207>
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (2.^a ed.). Cornell University Press. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.32-4505>
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Windham, W. R., & Akin, D. E. (1984). Rumen fungi and forage fiber degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3), 473-476. <https://doi.org/10.1128/AEM.48.3.473-476.1984>
- Wubah, D. A., & Kim, D. S. H. (1996). Chemoattraction of anaerobic ruminal fungi zoospores to selected phenolic acids. *Microbiological Research*, 151(3), 257-262. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80022-X](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80022-X)
- Xue, M., Sun, H., Wu, X., Guan, L. L., & Liu, J. (2018). Assessment of rumen microbiota from a large dairy cattle cohort reveals the pan and core bacteriomes contributing to varied phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, artículo e00970-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00970-18>
- Zamora Rodríguez, L. M. (2003). *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero* [tesis doctoral, Universidad de Girona]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7925/Tlzt.pdf;jsessionid=E753D716FF66DD25AA91BAOC211C598B?sequence=4>