

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

Fernando Rodríguez V<sup>1</sup>,  
Tito Efraín Díaz M<sup>1</sup>,  
Giselle A. Mackenzie<sup>2</sup>,  
Luz Estella Guativa<sup>2</sup>  
y Germán Afanador T<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Title: Isolation, Carbohydrate Fermentation Pattern and Morphological Characterization of Rumen Cellulolytic Bacteria of Cattle Fed Raygrass Hay in Colombia**

A Characterization study of rumen cellulolytic bacteria of cattle was conducted at the National Research Center "Tibaitatá" of Corpoica, located in a highland (2550 m.a.s.l) tropical ecosystem of Colombia. Five anaerobic strains of cellulolytic bacteria (F31, F32, F33, R38 and R39) were isolated from the rumen contents of cattle fed on raygrass (*Lolium multiflorum*) hay. Classification of the isolated rumen bacteria strains was accomplished by biochemical tests, carbohydrate fermentation patterns and morphological characterization, including transmission electron microscopy (TEM) of cell membrane and glycocalix.

The isolated strains were: *Fibrobacter succinogenes succinogenes* (F31 y F32), *Fibrobacter succinogenes elongata* (F33), *Ruminococcus albus* (R38) and *Ruminococcus flavefaciens* (R39). *Ruminococcus albus* fermented more carbohydrate sources than *Ruminococcus flavefaciens*, however, both species fermented cellobiose, pectin and xilano. *Fibrobacter* isolates did not ferment pentose sugars. Six different types of morphology of the colony, some of them not reported previously, were observed in *Fibrobacter* isolates growing on agar-containing roll-tubes. *Ruminococcus* species were identified as *R. albus* and *R. flavefaciens* by differences in cell structure, size and distribution of the glycocalix. Ultrastructural studies confirmed the taxonomic status of isolated bacteria species. Isolated bacteria are the first entries to the reference rumen germplasm bank of cattle in Colombia. Enzymatic assays are being conducted to measure cellulolytic activity of the isolated strains.

**Key Words:** ruminal bacteria, cellulolytic bacteria, germplasm bank, ultrastructural studies, biochemical profiles

1. Programa Nacional de Nutrición Animal. Corpoica, Apartado Aéreo 240142, Santafé de Bogotá; 2. Bacteriólogos.

## Aislamiento, Patrón de Fermentación de Carbohidratos y Caracterización Morfológica de Bacterias Celulolíticas del Rumen de Bovinos Alimentados con Heno de Raigrás en Colombia

## RESUMEN

En el Centro Nacional de Investigaciones "Tibaitatá" de Corpoica, localizado en un ecosistema trópic a una altura de 2550 m.s.n.m, se adelantó un estudio para caracterizar la población de bacterias celulolíticas ruminales de bovinos. Cinco cepas de bacterias anaerobias celulolíticas fueron aisladas a partir del contenido ruminal de bovinos alimentados con heno de raigrás (*Lolium multiflorum*). Las pruebas bioquímicas, el patrón de fermentación de carbohidratos y la caracterización morfológica, incluyendo los estudios de microscopía electrónica de transmisión de la membrana celular y el glicocáliz, permitieron clasificar las cepas aisladas como: *Fibrobacter succinogenes succinogenes* (F31 y F32), *Fibrobacter succinogenes elongata* (F33), *Ruminococcus albus* (R38) y *Ruminococcus flavefaciens* (R39). La cepa de *R. albus* fermentó un mayor número de fuentes de carbono que la cepa de *R. flavefaciens*, pero ambas, fermentaron celobiosa, pectina y xilano. Ninguna de las dos subespecies de *Fibrobacter* aisladas fermentó pentosas. Las cepas de *Fibrobacter* presentaron morfologías de colonia en roll-tube de agar celobiosa, no reportadas en la literatura. La apariencia, tamaño y distribución del glicocáliz en las células de las cepas del género *Ruminococcus* hicieron posible la diferenciación de sus dos especies *R. albus* y *R. flavefaciens* y la confirmación del status taxonómico de las otras cepas celulolíticas. Las cepas aisladas constituyen las primeras entradas al banco de germoplasma microbioal de referencia para bovinos en Colombia. Actualmente se adelantan los estudios de actividad enzimática celulolítica de estas cepas.

**Palabras Claves:** bacterias ruminales, bacterias celulolíticas, banco de germoplasma, estudios ultraestructurales, patrones bioquímicos

## INTRODUCCIÓN

LOS PROCESOS de digestión y utilización de los recursos alimenticios por el rumiante, están estrechamente relacionados con la presencia y actividad de los microorganismos del rumen (Wallace, 1994). El papel de estos microorganismos, especialmente de bacterias y hongos celulolíticos, adquiere mayor relevancia en sistemas de producción de bovinos en condiciones tropicales, donde la principal fuente de alimentación la constituyen pastos y forrajes, cuya degradación y utilización dependen del tamaño y composición de la población de hongos y bacterias del rumen y de la capacidad de estos para degradar carbohidratos estructurales como la celulosa y la hemicelulosa.

El conocimiento del tamaño, composición y actividad enzimática de la población bacteriana del rumen, es esencial para la formulación de estrategias de manipulación de la fermentación ruminal, orientadas a mejorar la eficiencia de la producción

de carne y leche de bovinos en condiciones tropicales.

Los estudios de morfología celular, al igual que las pruebas bioquímicas y los patrones de fermentación de fuentes de carbono, han sido ampliamente utilizados en la caracterización de bacterias ruminales (Hungate, 1966; Moore y Holdeman, 1972; Stewart y Bryant, 1988) y hacen parte de las claves establecidas por laboratorios de referencia para identificación de microorganismos anaerobios (Holdeman et al., 1977). De otra parte, las técnicas de microscopía electrónica han permitido detallar la ultraestructura celular y precisar la caracterización morfológica de bacterias a nivel de género y especie (Cheng et al., 1984; Kudo et al., 1987).

El objetivo de este trabajo fué el de aislar e iniciar la caracterización de las principales bacterias celulolíticas del rumen de bovinos alimentados con heno de raigrás, en un ecosistema de trópico de altura.



### Materiales y Métodos

**Animales y dieta.** Se utilizaron dos vacas Holstein Friesian de 650 kilos de peso corporal promedio, fistuladas ruminalmente y alimentadas con 13 kilos diarios de heno de raigrás (*Lolium multiflorum*). El forraje se suministró una vez al día (8 a.m), y los animales fueron suplementados con 1100 g de melaza, 100 g de urea, 6 g de azufre, sal mineralizada y agua a voluntad.

**Recolección y aislamiento:** Las muestras de contenido ruminal se tomaron inmediatamente antes de suministrar el alimento, a través de la fistula y mediante una manguera plástica de 150 cm de longitud y 125 mm de diámetro, conectada a una pera de succión y acoplada a un montaje de homogenización en condiciones de estricta anaerobiosis. La muestra fue refrigerada a 4 °C, durante 4 horas, con el fin de lograr el desprendimiento de las bacterias adheridas a las partículas de fibra (Dehority y Grubb, 1980; Mojica, 1993).

Después de la refrigeración, la muestra fue homogenizada durante un minuto, bajo un flujo constante de CO<sub>2</sub>, filtrada, utilizando doble capa de gasa y diluida para su posterior siembra. La siembra de las bacterias a partir de las muestras diluidas (10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>), se realizó en completa anaerobiosis, utilizando el método del Roll-tube (Hungate, 1966), para su posterior cuantificación y aislamiento con medios selectivos de cultivo.

Las colonias presuntivas de cada uno de los géneros bacterianos fueron aisladas mediante pipetas de clonación y una red de gasificación anaeróbica y finalmente transferidas a caldo celobiosa. El aislamiento primario fue secuencialmente pasado a través de cultivos en agar-celobiosa con el fin de purificar cada cepa.

**Medios de cultivo:** El medio de aislamiento y mantenimiento de las cepas consistió en: Solución salina I (3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1 L de agua), 15 ml; solución salina II (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g; NaCl 6 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.23 g y CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.79 g en un volumen final de 1 L de agua), 15 ml;

fluido ruminal clarificado, 40 ml; extracto de levadura, 0.250 g; celobiosa, 0.1g; bicarbonato de sodio, 0.6g; resazurin, 0.1 mg; HCL- cisteína, 0.1 g y agua destilada hasta completar 100 ml. Para la formación de la película de agar en los tubos de cultivo se incluyeron 1.33 g de agar dentro del medio.

**Morfología celular y de colonia:** Las células de cada una de las cepas fueron estudiadas en su forma y tamaño a través de extendidos en una tinción de Gram, modificado por Kopeloff y en preparaciones en fresco en un microscopio de contraste de fases. Las colonias fueron observadas en un estereoscopio para determinar su tamaño, bordes, apariencia y color.

**Ultraestructura:** Los cultivos puros de las cepas bacterianas en caldo celulosa (papel Whatman No. 1) fueron centrifugados a 3500 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet colocado en glutaraldehído al 2.5%, posijado con tetraóxido de osmio al 1.33% y luego deshidratado en una serie de alcoholes al 30,50,70, 90 y 100% (Kudo et al., 1987). Las muestras se lavaron dos veces en óxido de propileno durante 20 minutos y finalmente fueron embebidas en resina Epon. Secciones ultrafinas de estas muestras fueron obtenidas con un ultramicrotomo Reichert OM U2, coloreadas en rejillas de 400 poros y teñidas con acetato de uranilo y citrato. Todas las preparaciones fueron examinadas en un microscopio electrónico bajo una aceleración de voltaje de 60 Kv.

**Fermentación de fuentes de carbono:** La capacidad para fermentar 27 carbohidratos diferentes fue detectada por métodos colorimétricos, en tubos anaeróbicos tipo Hungate (Moore y Moore, 1991).

En los cultivos anaeróbicos de las cepas bacterianas purificadas se realizaron también las pruebas de licuefacción de la gelatina, acetyl-metil carbinol, motilidad, producción de H<sub>2</sub>S, hidrólisis de la esculina, almidón, y finalmente la reducción de nitratos y rojo de metilo; siguiendo los procedimientos del laboratorio de

anaerobiosis del Instituto Politécnico de Virginia (VPI) (Holdeman et al, 1977).

### Resultados y Discusión

Todas las cepas bacterianas aisladas crecieron abundantemente cuando se incubaron en un medio líquido utilizando celobiosa como única fuente de carbono.

Pases secuenciales en este medio y en agar celobiosa permitieron la purificación y diferenciación de cinco cepas de bacterias anaerobias celulolíticas (F31, F32, F33, R38 y R39), las cuales presentaron una morfología específica tanto celular como de colonia.

La identificación de cada una de las cepas a nivel de género, especie y subespecie a partir de los análisis de morfología celular de colonia, de pruebas bioquímicas y los patrones de fermentación de carbohidratos se describe a continuación.

#### Pruebas Bioquímicas y Patrones de Fermentación de Carbohidratos

Las pruebas de motilidad y licuefacción de la gelatina negativas, asociadas a la estricta anaerobiosis y a la incapacidad para reducir nitratos (Tabla 1), aportaron las primeras señales bioquímicas a la identificación de las cepas aisladas como bacterias celulolíticas ruminales. Al comparar los patrones de fermentación de carbohidratos (Tabla 2), de las cepas aisladas en este estudio, con los patrones de clasificación establecidos por el Laboratorio de Referencia para Anaerobios (Holdeman et al, 1977), se encontró que las características bioquímicas de las cepas R38 y R39 correspondían a las reportadas para *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens*, respectivamente (Stewart and Bryant, 1988). Es reconocido que la mayoría de cepas del género *Ruminococcus* aisladas de rumiantes en diferentes nichos ecológicos, utilizan principalmente celulosa, xilano y celobiosa (Stewart and Bryant, 1988), aunque han sido aisladas cepas atípicas que fermentaron más de 20 sustratos diferentes (Van der Linden et al, 1984; Van der Toorn and Van Gylswyk, 1985). La cepa R38 (*R. albus*) aislada en este estudio, fermentó más carbohidratos que la cepa R39 (*R. flavefaciens*), sin embargo, ambas cepas fermentaron celobiosa, pectina y xilano (Tabla 2).

Mientras tanto, las mismas pruebas demostraron la presencia de *Fibrobacter succinogenes* en las cepas F31, F32 y F33. La principal diferencia en el perfil bioquímico de las cepas de *Fibrobacter* con relación a las cepas de *Ruminococcus*, está en la no utilización de pentosas para su crecimiento

**Tabla 1.** Motilidad y pruebas de reacción bioquímica de cepas bacterianas ruminales aisladas de bovinos alimentados con heno de raigrás en un ecosistema de trópico alto en Colombia

Prueba bioquímica	Cepa R38	Cepa R39	Cepa F31	Cepa F32	Cepa F33
Motilidad	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-	-
Rojo de Metilo	+	+	+	-	-
Aerotolerancia	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Hidrólisis esculina	+	+	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-



por el género *Fibrobacter* (Morris and Van Gylswyk, 1980), situación que se evidenció en los aislados colombianos (Tabla 2).

#### Características morfológicas

##### Morfología de colonia

La cepa R38 creció en colonias multilenticulares, conformadas por tres o cuatro lentes del mismo tamaño, agrupadas concéntricamente (Figura 1). No se encontró en este estudio la presencia de las colonias rizoidales reportadas por Van Gylswyk y Roche (1970), para la especie *R. albus*.

La cepa R39 también creció generalmente, en colonias multilenticulares, conformadas por tres o cuatro lentes del mismo tamaño, agrupadas concéntricamente (Figura 2). Colonias multilenticulares de asociación concéntrica también fueron reportadas por Hungate (1966) para las especies *R. flavefaciens* al igual que para *R. albus*. En esta cepa no se detectó la presencia de las colonias rizoidales reportadas por Van Gylswyk y Roche (1970), para las bacterias del género *Ruminococcus*.

Los aislados F31, F32 y F33 presentaron colonias con una apariencia lenticular similar a la reportada por Montgomery y

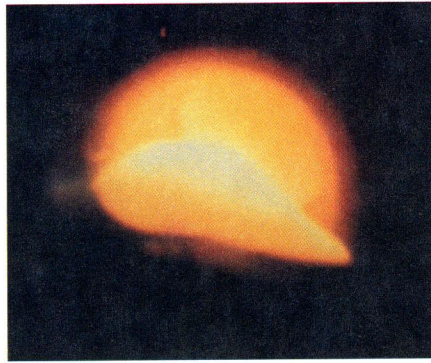


Figura 1. Microfotografía de una colonia bacteriana de *R. albus* en Roll Tube celobiosa (12X).

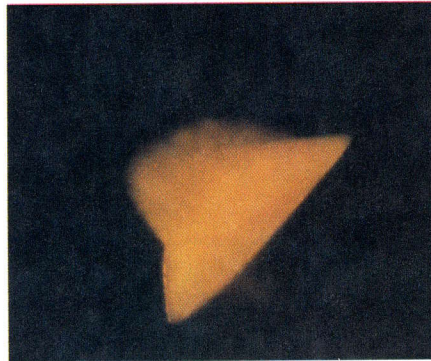


Figura 2. Microfotografía de una colonia bacteriana de *R. flavefaciens* en Roll Tube celobiosa (12X).

Tabla 2. Patrones de fermentación de carbohidratos para cepas bacterianas ruminales aisladas de bovinos alimentados con heno de raigrás en un ecosistema de trópico alto en Colombia

Carbohidratos	CEPAS RUMINALES				
	R38	R39	F31	F32	F33
Adonitol	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-
Erytritol	-	-	-	-	-
Fructosa	+	-	+	+	+
Galactosa	-	-	-	-	-
Glucosa	+	-	+	+	+
Hidrólisis almidón	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Lactosa	+	-	+	-	+
Maltosa	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Manosa	-	-	-	-	-
Melezitosa	-	-	-	-	-
Melibiosas	-	-	-	-	-
Pectina	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-
Ribosa	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-
Sorbosa	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Sucrosa	+	-	-	-	-
Trealosa	-	-	-	-	-
Xilano	+	+	-	-	-
Xilosa	+	-	-	-	-

colaboradores (1988) para las cepas del género *Fibrobacter*; no obstante, cuando se realizó un análisis más exhaustivo de las cepas aisladas en este estudio, se detectó una amplia diversidad de morfología de colonia. Dicha diversidad, puede ser explicada por las diferencias en la posición espacial en que se encuentre ubicada una colonia lenticular creciendo en cultivos con agar celobiosa. De este modo fueron registradas seis apariencias posibles para las colonias de cepas celulolíticas pertenecientes al género *F. succinogenes*:

**Lenticular**: se caracterizó por discos lenticulares (190 - 260  $\mu\text{m}$ ) de perfecta definición en sus bordes. Esta colonia siempre estuvo en posición horizontal y en la profundidad de la película de agar. (Figura 3 A)

**Lenticular de bordes sinuosos**: cuando la colonia de tipo lenticular conservó la posición horizontal, pero su ubicación fue superficial en la película de agar, los bordes se hicieron irregulares. Generalmente, su tamaño no excedió al de las lenticulares en profundidad. (Figura 3 B)

**Lenticular biconvexa**: cuando la colonia lenticular estuvo en profundidad de agar en

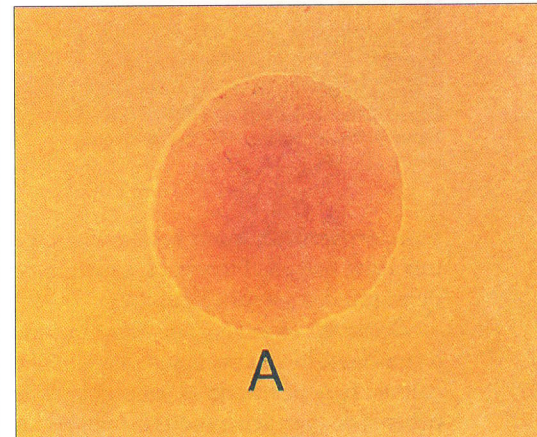


Figura 3. A) Microfotografía de una colonia de *F. succinogenes* en Roll Tube en la profundidad de la película de agar (10x)

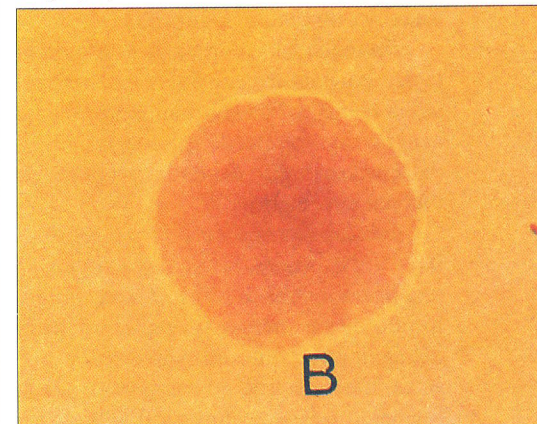


Figura 3. B) Microfotografía de una colonia de *F. succinogenes* en la superficie de la película de agar (10x)





Figura 4. Microfotografía de una colonia de *F. succinogenes* lenticular biconvexa vista lateral (12X)

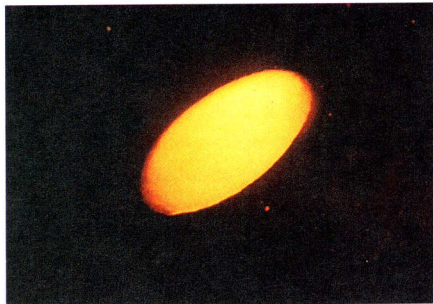


Figura 6. Microfotografía de una colonia en forma elipsoidal de *F. succinogenes* en Roll Tube

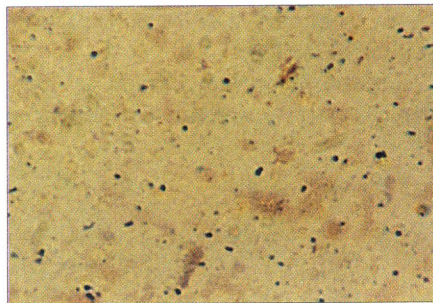


Figura 8. Microfotografía de *R. albus* cocos gram positivos (X1000)

posición vertical, tomó la apariencia de una lente delgada biconvexa, usualmente de 90  $\mu\text{m}$  de espesor (Figura 4)

*Lenticular biconvexa con halo*: se trata de una lente biconvexa cuyos márgenes de colonia han alcanzado la superficie de la película de agar, generando con ello el crecimiento de un halo bacteriano circular y superficial que dió la apariencia virtual de que la colonia estaba incluida dentro de una circunferencia (Figura 5)

*Elipsoidal*: las colonias de esta morfología, aparecieron cuando las lentes biconvexas se inclinaban sobre su eje axial para generar una colonia de apariencia elipsoidal, cuyo diámetro dependía del grado de inclinación (Figura 6)

*Abanico*: se trata de colonias lenticulares horizontales, las cuales a través de una ligera inclinación colocan en contacto uno de sus márgenes con la superficie del agar, generando un halo circular que se ve interrumpido en sus bordes por la formación de una muesca que encaja y bordea la porción de la colonia que ha al-

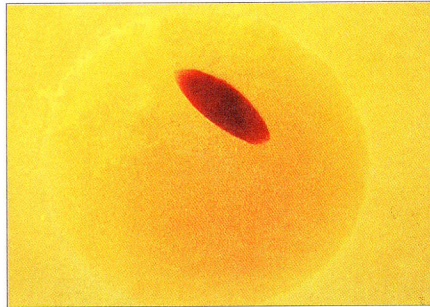


Figura 5. Microfotografía de una colonia de *F. succinogenes* biconvexa con halo (10X)

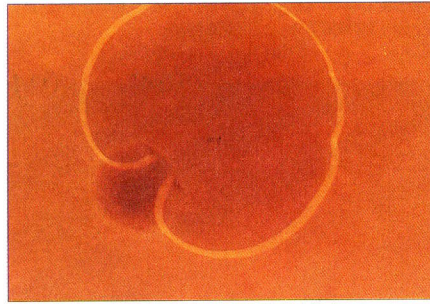


Figura 7. Microfotografía de una colonia de *F. succinogenes* en forma de abanico

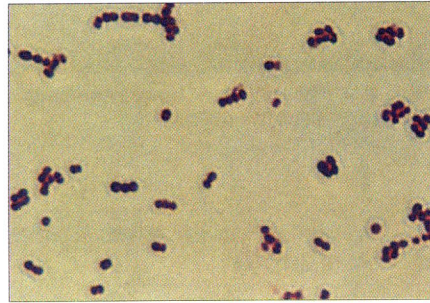


Figura 9. Microfotografía de *R. flavefaciens* cocos gram positivos (X1000)

canzado la superficie, dando la apariencia de un abanico (Figura 7)

Los análisis de morfología de colonia realizados sobre cultivos puros de *F31* y *F32* revelaron la presencia de una rica variabilidad dentro del género *Fibrobacter*, de la cual no se conocen reportes y, que fué fundamentada en los seguimientos de la distribución espacial de su colonia y del comportamiento cinético que generan sus células, cuando alcanzan la superficie del agar y generan halos de crecimiento bacteriano. Esta diversidad de colonia encontrada, podría permitir el seguimiento de éste género en estudios de ecología bacteriana en animales mantenidos bajo diferentes dietas, al igual que podría permitirle a los microbiólogos del rumen aislar rápidamente esta bacteria a partir de un cultivo primario de bacterias celulolíticas, basándose en los diferentes morfotipos de colonia. Es necesario, sin embargo, adelantar más estudios con muestras de contenido ruminal de bovinos en otros ecosistemas, para confirmar

la utilidad de estos hallazgos morfológicos como patrones en la identificación de bacterias ruminales del género *Fibrobacter*.

#### Morfología Celular y Reacción en Gram

La cepa R38 presentó una morfología cocoide de aspecto grueso de 1.7 - 2  $\mu\text{m}$ , de reacción Gram positiva. Las células se presentaban generalmente solas, pocas veces en forma de diplococo y excepcionalmente dispuestas a manera de cadenas cortas (de 4 - 10 células), sugiriendo la presencia de un *Ruminococcus* (Figura 8). La cepa R39, correspondiente al género *Ruminococcus*, mientras tanto se caracterizó por cocos grandes, Gram positivos (0.8 - 1.8  $\mu\text{m}$ ), solos, frecuentemente en pares y ocasionalmente en cadenas de 4 a 10 células, (Figura 9)

Las cepas F 31 , F32 y F33, correspondieron a células Gram negativas que mostraron marcado pleomorfismo a lo largo de 48 horas de cultivo. Entre 4 y 18 horas de incubación predominaron cocobacilos, cocobacilos y bacilos a las 24 horas, mientras que a las 48 horas se encontraron bacilos en degeneración, cocobacilos y bacilos Gram variables.

En general, utilizando microscopía de contraste de fases, se pudieron definir dos tipos de morfología celular predominantes en estas cepas: bacilos pleomórficos y células cocoides generalmente tomando la apariencia de un limón.

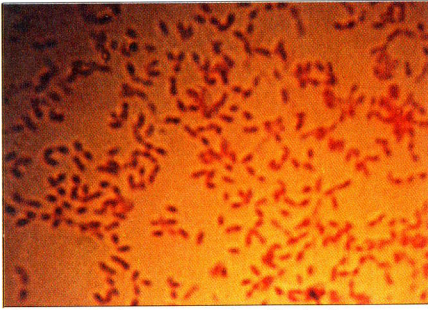
Las cepas F 31 y F32, presentaron células Gram negativas en forma de bacilos gruesos y cortos usualmente acompañadas por células en forma de limón, correspondiendo a la descripción de la subespecie *Fibrobacter succinogenes succinogenes* (Montgomery et al., 1988), (Figura 10).

Mientras tanto, la cepa F33 correspondió a la subespecie *F. s. elongata* y se caracterizó por células Gram negativas que se presentaron generalmente como bacilos pleomórficos, cuya principal diferencia morfológica con la cepa F-31 fué la de ser bacilos más delgados y alargados, en los cuales están ausentes las células cocoides en forma de limón (Montgomery et al., 1988), (Figura 11).

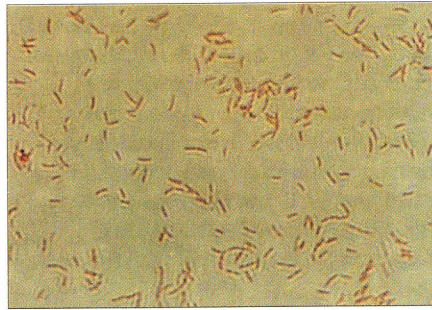
#### Estudios de Ultraestructura

Se verificó en la cepa R38, la presencia de un coco grande, caracterizado por tener una pared celular fina y una cubierta de material extracelular altamente electrodenso y sin proyecciones fibrilares sobre su superficie correspondiente al glicocáliz. Este presentaba una apariencia de cinta, producto de la agrupación compacta de varias fibras laminares adyacen-

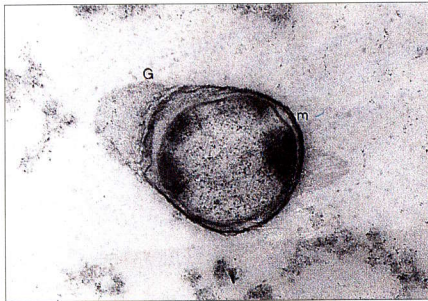




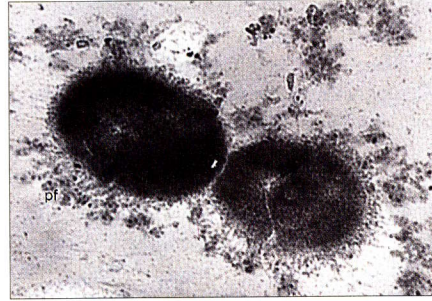
**Figura 10.** Bacilos gram negativos *Fibrobacter succinogenes succinogenes* (X1000)



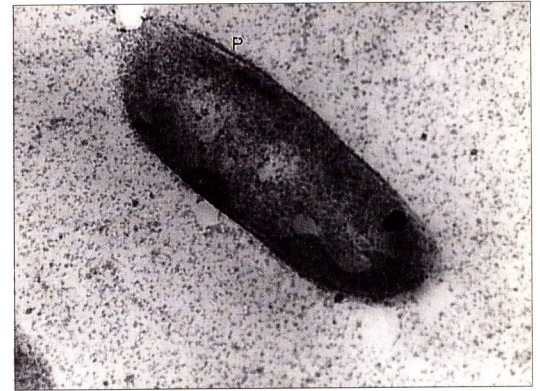
**Figura 11.** Bacilos gram negativos *F. succinogenes elongata* (X1000)



**Figura 12.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM), de *R. albus* (x163500) m, membrana celular. G, Glicocalix



**Figura 13.** Microfotografía electrónica de transmisión de *R. flavefaciens* (x163500) (pf, proyecciones fibrilares)



**Figura 14.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de *Fibrobacter succinogenes* (P, pared) (x163.500)

tes, con un espesor aproximado de 4 nm. (Figura 12). El espesor y la apariencia del glicocalix permitieron identificar la cepa como *R. albus*, y diferenciarla de la otra especie de *Ruminococcus* el *R. flavefaciens* (Latham et al., 1978).

Las ligeras variaciones encontradas en el espesor del glicocalix entre células de la misma muestra, sugieren que su producción esta relacionada con el estado fisiológico de cada célula.

En la cepa aislada en este estudio, se encontró una clara diferenciación de la membrana celular con respecto a la cubierta de polisacáridos o glicocalix (Figura 12), a diferencia de lo encontrado por el grupo de Patterson de la Universidad de Calgary (Patterson et al, 1975), quienes trabajaron con una cepa de *R. albus* del laboratorio de referencia de la Universidad de Illinois. El glicocalix de la cepa colombiana de *R. albus* a diferencia de *R. flavefaciens* no estableció contacto directo con el sustrato celulósico en el que fué cultivada (Papel Whatman No. 1) para los estudios de microscopía electrónica. Diferencias en la capacidad de las bacterias celulolíticas ruminales para adherirse al sustrato, han sido reportadas en estudios de microscopía electrónica (Akin and Barton, 1983). Estos autores encontraron que las bacterias del género *Fibrobacter* se adherían más firmemente a la pared celular de la partícula que está siendo degradada, que las bacterias del género *Ruminococcus*.

El análisis ultraestructural de la cepa

R39, reveló la presencia de células cocoides de pared muy gruesa, aisladas o dispuestas en pares (diplococos) o en forma de cadenas cortas (4 células). Cada célula estaba rodeada por una cubierta de aproximadamente 50 nm de material electrodensamente condensado, caracterizado por la existencia de una abundante cantidad de proyecciones fibrilares (Figura 13). Esta característica además de permitir la identificación de esta bacteria ruminal celulolítica como perteneciente a la especie *Ruminococcus flavefaciens*, en un cultivo puro ó en un cultivo mixto, establece la diferenciación ultraestructural entre los dos cocos celulolíticos predominantes en el rumen : *R. flavefaciens* y *R. albus* (Pettipher and Latham, 1979).

En los cortes ultrafinos de las cepas F31, F32 y F33, se detectó bajo el microscopio electrónico la presencia de un bacilo pleomórfico similar al descrito por Cheng y colaboradores (1984). Predominaron los bacilos cortos y gruesos (F 31, F32), aunque también se encontraron bacilos largos y con extremos delgados (F33), todos caracterizados por tener un contenido intracelular y una fina membrana celular menos electrodensa, la cual corresponde a la acumulación de pequeñas cantidades de material extracelular (Figura 14). La capa electrodensa detectada (aproximadamente 10-20 nm) no poseía material fibroso, tal como se encontró en las cepas de *Ruminococcus* y en los aislados ruminales identificados como *Ruminococcus*

*flavefaciens* por Patterson y colaboradores (1975).

A pesar de que las pruebas bioquímicas y los patrones de fermentación de carbohidratos de las cepas aisladas fueron importantes en el proceso de identificación de las mismas a nivel de género, los estudios de microscopía electrónica de transmisión permitieron confirmar la clasificación de las cepas a nivel de género, e identificar las cepas a nivel de especie en el caso de *Ruminococcus* y a nivel de subespecie en el caso de *Fibrobacter*.

Las cepas bacterianas aisladas del rumen de los bovinos en experimentación, *Fibrobacter succinogenes succinogenes* ( F31 y F32), *Fibrobacter succinogenes elongata* ( F 33 ), *Ruminococcus albus* ( R38 ) y *Ruminococcus flavefaciens* ( F39 ), son consideradas las principales especies celulolíticas del rumen de bovinos (Wallace, 1994) y este es el primer reporte de su aislamiento en el país.

Las características de morfología de colonia reportadas en este estudio y sustentadas por los hallazgos de ultraestructura, tanto para los aislados de *Fibrobacter*, como para los de *Ruminococcus*, podrían ser de gran utilidad en experimentos de ecología bacteriana ruminal, orientados al estudio de la diversidad microbiana (géneros) del ecosistema ruminal de bovinos en diferentes ambientes. La documentación del banco de germoplasma de microorganismos anaerobios del rumen de bovinos, iniciado por CORPOICA, a partir de este estudio incluye para cada género de bacterias celulolíticas del rumen, su apariencia morfológica celular Gram, microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica de transmisión y sus diferentes morfotipos de colonia en cultivos de agar celobiosa. Actualmente, se desarrollan los estudios para evaluar la capacidad de degradación de sustratos celulósicos de diferente grado de solubilidad, cristalinidad y polimerización.



## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Jorge Alberto Rodríguez y Elizabeth Martin del Laboratorio de Microbiología del Programa de Nutrición Animal de Corpoica, y de los doctores Rosalía Pérez y Fernando Velandia de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto Neurológico de Colombia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akin, D. E. and Barton, F. E. 1983. Rumen microbial attachment and degradation of plant cell walls. *Fed. Proc.* 42:114
- Cheng, K. J., Stewart, C. S., Dinsdale, D., and Conterston J. W. 1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 10: 93
- Dehority, B.A. and Grubb, J.A. 1980. Effect of short-term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:376
- Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. C. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, Fourth Edition, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 152 pp
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York and London 533p.
- Kudo, H., Cheng, K. J. and Costerton, J. W. 1987. Electron microscopy study of methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Canadian J. Microbiol.* 33: 267
- Latham, M.J., Brooker, B.E., Pettipher, G.L., and Harris, P.J. 1978. Adhesion of *Bacteroides succinogenes* in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell walls in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Appl. Environ. Microbiol.* 35:1166
- Mojica, J.R. 1993. Estandarización del método "Roll-Tube" para el conteo y aislamiento de bacterias anaerobias ruminales. Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá,
- Montgomery, L., Flesher, B and Stahl, D. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *International J. Syst. Bacteriol.* 38:430
- Moore, W. E. and Holdeman, L. V. 1972. Identification of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* 25: 1306
- Moore, L. V. and Moore, W.E. 1991. *Anaerobe Laboratory Manual* update. Department of Anaerobic Microbiology, Virginia Polytechnic Institute and State University. 25 pp
- Morris, E. J. and Van Gylswyk, N. P. 1980. Comparison of the action of rumen bacteria on cell walls of *Eragrostis tef*. *J. Agric. Sci.* 95:313
- Patterson, H., Irvin, R., Costerton, J. W. and Cheng, K. J. 1975. Ultrastructure and adhesion properties of *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* 122: 278
- Pettipher, G. L. and Latham, M. J. 1979. Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *J. Gen. Microbiol.* 110: 21
- Stewart, C.S. and Bryant, M. P. 1988. The rumen bacteria. En: *The Rumen Microbial Ecosystem* Ed. P.N. Hobson. Elsevier Appl. Sci., London and New York.
- Van Gylswyk, N. O. and Roche, C. E. 1975. Characteristics of *Ruminococcus* and cellulolytic *Butirivibrio* species from the rumens of sheep fed differently substituted teff (*Eragrostis tef*) hay diets. *J. Gen. Microbiol.* 64:11
- Van der Linden, Y., Van Gylswyk, N. O. and Schwartz, H. 1984. Influence of supplementation of corn stover with corn grain on the fibrolytic bacteria in the rumen of sheep and their relation to the intake and digestion of fiber. *J. Anim. Sci.* 59:772
- Van der Toorn, J. J. and Van Gylswyk, N. O. 1985. Xilan-digesting bacteria from the rumen of sheep fed maize straw diets. *J. Gen. Microbiol.*, 131:2601
- Wallace, R. J. 1994. *Ruminal Microbiology, Biotechnology, and Ruminant Nutrition: Progress and Problems*. *J. Anim. Sci.* 72:2992