

# ESTANDARIZACION DE METODO "ROLL TUBE" PARA EL CONTEO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS RUMINALES

Por: Héctor José Anzola Vásquez\*, Fernando Rodríguez Villamizar  
Ricardo Mojica - Instituto Colombiano Agropecuario ICA,  
A. A. 151123 El Dorado Santafé de Bogotá. Fax: 267 30 13

## INTRODUCCION

Dentro de la compleja manipulación de la microbiota ruminoreticular, se encuentran variadas herramientas de trabajo (cirugías, microscopia, métodos de detección y análisis de compuestos), las cuales ayudan a un mejor entendimiento de la ecología y metabolismo en esta parte del tracto digestivo. El método "roll tube" es una de estas herramientas, la cual por una parte cuantifica la población bacteriana ruminal, lo que es de utilidad en la valoración de los efectos de las dietas y/o materias primas (defaunadores, antibióticos e ionóforos), sobre la microbiota ruminal; por otra parte permite el aislamiento de cepas bacterianas, con base en las cuales se podrá implementar trabajos, por ejemplo, en identificación de enzimas fibrolíticas extra o intracelulares y la transferencia de los genes que codifican estas enzimas hacia hongos u otras especies bacterianas. Se podría también lograr el aislamiento de cepas bacterianas que solucionen problemas como las intoxicaciones por compuestos con contenido de oxalatos (Allison *et al.*, 1985), o que mejoren la asimilación de algunos minerales contenidos en alimentos de baja calidad (Mackie y Therion, 1964).

### Objetivos de la Investigación:

- Estandarización de método "roll tube" utilizado en el conteo y aislamiento de bacterias anaerobias ruminales.
- Aplicación del método "roll tube" a contenido ruminal de ovinos sometidos a dietas contrastantes.

## MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en el Programa de Nutrición Animal del ICA en el CNIA de Tibaitatá, para estandarizar el método del "roll tube" para el cultivo de bacterias anaeróbicas procedentes de contenido ruminal de ovinos pastoreando kikuyo (*Pennisetum clandestinum*).

La metodología del "roll tube" consiste en recolectar la muestra de fluido ruminal; preparar y envasar el medio de dilución; preparar y envasar el medio de crecimiento; homogenizado de la muestra de fluido ruminal; filtrado de la muestra; efectuar las diluciones de la muestra (esta se diluye en los tubos de crecimiento a  $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ ); en seguida se efectúa el proceso de siembra; el proceso de rolling, incubación

de los tubos de crecimiento; conteo de las colonias bajo un estereoscopio las cuales son marcadas con lápiz termoresistente; cuando las colonias están en pleno crecimiento entonces se pueden aislar para hacer la caracterización respectiva.

Se probó esta metodología frente a cinco dietas contrastantes que se le suministraron a un ovino estabulado y las cuales fueron: pastoreo en kikuyo y dietas con altos contenidos de tamo de trigo; sorgo; Acacia Japonesa (*Acacia melanoxylon*) y melaza de caña de azúcar.

La evaluación de las dietas contrastantes se ejecutó con ovinos canulados a nivel ruminal confinados en jaulas metabólicas. Las dietas utilizadas fueron:

- Dieta 1:** Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) a voluntad en pastoreo continuo.
- Dieta 2:** 1.300 g/día de tamo de trigo y avena (80 y 20% respectivamente) + 100 g de melaza + 20 g de sal mineralizada.
- Dieta 3:** 367 g/día de tamo de trigo y avena + 443 de grano quebrado de sorgo + 100 g de melaza + 3,5 g de úrea + 20 g de sal mineralizada.
- Dieta 4:** 645 g/día de tamo de trigo y avena + 100 g de melaza + 7,5 g de úrea + 20 g de sal + 160 g de Acacia Japonesa (*Acacia melanoxylon*).
- Dieta 5:** 367 g/día de tamo de trigo y avena + 590 g de melaza + 12 g de úrea + 20 g de sal

Se tomó una muestra para la cuantificación de bacterias la cual es fraccionada en tres submuestras a las que se le realizaron tres series de diluciones (una por submuestra). De cada submuestra las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  se sembraron por triplicado.

Alimentación de los animales y reposición del agua.

Se obtienen los datos de la variable conteo, los cuales son promediados a través de las submuestras diluciones y dietas.

Posteriormente la variable conteo se somete a un Análisis de varianza, con un diseño completamente al azar donde los factores a analizar fueron: submuestras, diluciones y dietas, luego estos mismos parámetros fueron sometidos a una prueba de comparación múltiple de promedios (prueba de Duncan), siguiendo los procedimientos de Steel y Torrie, (1985).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se definió que el método "roll tube" es la herramienta del rumen de ovinos sometidos a diferentes sustratos alimenticios, además de que permite manipular la población bacteriana sin alterar su viabilidad, a bajos costos y con relativa facilidad. Las variaciones dadas entre las poblaciones bacterianas cuantificadas fueron:  $0.88 \times 10^9$  bacterias/cm<sup>3</sup> para la dieta alta en tamo de trigo,  $2,565 \times 10^9$  bacterias/cm<sup>3</sup> para la dieta de kikuyo,  $6,24 \times 10^9$  bacterias/cm<sup>3</sup> en el caso de la dieta con alto contenido de sorgo,  $2,034$  bacterias/cm<sup>3</sup> para la dieta que tuvo Acacia y  $1.553 \times 10^9$  bacterias/cm<sup>3</sup> para la dieta con alto contenido de melaza, además estas dietas mostraron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ).

## BIBLIOGRAFIA

ALLISON, M.J., DAWSON, K.A., MAYBERRY, W.R., and FOSS, J.G. *Oxalobacter formigenes* Gen. nov., sp. nov.: Oxalate degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. Arch. Microbiol. 141:1 (1985). Citado por FAO. Biotechnology applicable to animal production and health in Latin America, Havana, Cuba, 7-10 september 1988.

BRYANT, M. P. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1324 (1972).

HUNGATE, R. E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, J. R., and RIBBONS, D. W. Methods in microbiology. New York, academic, 1969. Citado por ORSKOV, E.R. Nutrición proteica de los rumiantes, Academic press. 1988.

MACKIE, R.I., and THETION, J. J. Influence of mineral interaction of growth efficiency of rumen bacteria, In: GILCHRIST, F.M.C., and MACKIE, R.I. Herbivore nutrition in the subtropics and tropics, Craighall, S.A., The Science Press, 1984, p. 455.

STEEL, R. G. D. and TORRIE, J. H. Bioestadística principios y procedimientos. Colombia, McGraw-Hill Book Company, 1985. 663 p.