

Aislamiento y caracterización de la cepa SB-69-1 del rumen de F-1

L. HERRERA, R. HERNÁNDEZ, E. MARTÍNEZ, R. CONTRERAS, J. KOURI Y
J. C. GARCÍA PIÑEIRO

Recibido en: Dic. 1969

ABSTRACT. The strain SB-69-I, isolated from the rumen of F-1 cattle was studied from the point of view of its morphologic and biochemical behaviour, in a selective RS medium for amylolytic bacteria. This is a paired coccus, Gram +, which occasionally develops, forming long and short chains; it is a facultative capsulated anaerobe, lacking motility, that reacts positively to the Voges-Proskauer and methyl red tests. It is a producer of SH_2 , which doesn't liquify gelatine. Its morphologic characteristics were studied by classic staining methods and by electron microscopy. Its capacity for fermentation was demonstrated as well as its total production of gas and VFA and their partial proportions through gas chromatography. Behaviour similar to that of our strain of the *S. Bovis* was observed, taking into account the limitations posed by Bryant for the classification of bacteria isolated from rumen.

RESUMEN. Se estudia desde el punto de vista morfológico y de comportamiento bioquímico la cepa SB-69-I aislada del rumen de ganado vacuno F-1, en medio selectivo RS para bacterias amilolíticas. Es un coco de $0.7-09\mu$, en pareja, que se desarrolla en ocasiones formando cadenas largas y cortas, Gram +, anaerobio facultativo, encapsulado, que no presenta motilidad, que da la reacción de Voges-Proskauer y del rojo metilo positiva, productora de SH_2 , que no produce liquefacción de la gelatina. Sus características morfológicas se estudiaron al través de los métodos tincionales clásicos y de la microscopía electrónica. Se constató su capacidad de fermentar almidón, glucosa, cellobiosa, galactosa, rafinosa, arabinosa, así como la producción total de gas y de AGV, y las proporciones parciales de éstos al través de la cromatografía gaseosa. Se plantea el comportamiento similar de nuestra cepa al del *S. bovis*, tomando en consideración las limitantes planteadas por Bryant (1959) para la clasificación de bacterias aisladas del rumen.

INTRODUCCION

El estudio de la actividad metabólica de los cultivos puros ha sido, y será, una vía fundamental para lograr conocer el conjunto de procesos que se suscitan habitualmente en el rumen como un todo, al través de las reacciones, productos finales de éstas y sustratos que utilizan los microorganismos aislados que tienen como habitat natural este abigarrado reservorio habitual de los rumiantes.

Partiendo de los criterios expuestos por Gall y Huhtanen (1950) acerca del carácter genuino de un microorganismo como parte integral de la microflora ruminal,

exponemos éste, como producto del estudio parcial de la cepa SB-69-I, sus características fisiológicas y su comportamiento bioquímico.

MATERIAL Y METODO

Cultivos

El método de siembra y cultivo anaeróbico utilizado para el aislamiento fue el propuesto por Hungate (1966) usando el medio de enriquecimiento RS utilizado por Hamlin (1956). Ver Tabla I.

TABLA I
COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO*

| | RS | MCL |
|-------------------------------------|-------|-------|
| Sol. Mineral No. 1 | 15 ml | 15 ml |
| Sol. Mineral No. 2 | 15 ml | 15 ml |
| Almidón Soluble 2% | 25 ml | — |
| Resazurina 0.01% | 1 ml | 1 ml |
| Licor de Rumen | 30 ml | 10 ml |
| Cisteína | 10 mg | 50 mg |
| CO ₃ HN ₄ 10% | 10 ml | 5 ml |
| Agar | 2 g | — |
| H ₂ O | 15 ml | 60 ml |
| Trypticasa | — | 1.5 g |
| Yeast extract | — | 0.5 g |
| Glucosa** | — | 0.5 g |

* Proporciones para 100 ml de medio.

** En el caso de fermentación se utiliza el azúcar específico a estudiar.

La atmósfera de CO₂ libre de O₂ se logró utilizando una columna de cobre calentada a 170°C.

Las siembras se hicieron en "roll tube", usando tapones negros tratados previamente para hacerlos libres de restos azufrados.

El cultivo puro se logró por sub-cultivación (6 pasos utilizando el método antes descrito. Los pasos se hicieron de colonias con menos de 48 hs. de sembradas, y de una dilución de 10^{-5} .

Los subcultivos de aislamiento, así como el medio de mantenimiento fueron hechos con RS. Se utilizó un medio de cultivo líquido. Ver Tabla I.

La liquefacción de la gelatina se comprobó utilizando el medio RS y gelatina a una concentración final de 5% (w/v). Se utilizó el medio de agar-sangre para el estudio de la producción de hemólisis.

Métodos Tincionales

Se utilizaron los métodos tincionales de clasificación general; Gram, Ziehl-Neelsen, y los específicos para buscar características morfológicas diferenciales, y en particular, por el método de Tyler; esporas; flagelos por el método de Leifson's (1930).

Motilidad

Se determinó motilidad utilizando el método de la gota colgante, y el medio basal más 0.5% agar, 0.1% glucosa, 0.05 citrato férrico amoniacal y 0.008% tiosulfato de sodio.

Colección de Células

Utilizamos una centrífuga refrigerada a 4°C durante 1½ horas a 3000 g, en tubos sellados bajo atmósfera de CO₂ con una eficiencia que oscila entre un 90 y un 96%. Se le realizaron dos lavados con buffer fosfato en pH 6.8 0.2 M.

Turbidometría

Se utilizó un colorímetro a 700 m μ , realizándose lecturas seriadas con intervalos de 60 minutos.

Fermentaciones

Se utilizó el método manométrico usando un respirómetro de Warburg para precisar la producción de gas total y la producción parcial por minuto, acorde con el método propuesto por Seaman, G. R. (1963). Se midió el pH inicial y final de esta determinación, así como la producción total de AGV.

Se determinó la capacidad de fermentación específica frente a cada sustrato utilizando el medio de cultivo líquido añadiendo los azúcares en una concentración final de 0.5%.

Se le hicieron lecturas turbidométricas, pH final y producción ACV totales y parciales.

Características del Crecimiento

Se incubaron Slant de medios sólidos RS a 4, 20, 39, 45 y 55°C, con CO₂ y en atmósfera de O₂ para determinar los requerimientos de crecimiento.

Se determinó el tiempo de supervivencia a 60°C incubando una dilución de 10⁻⁵ a esta temperatura, extrayendo los inóculos a los 10, 20, 30 y 40 minutos, sembrándolos en medio RS según el método antes descrito.

Reacción de Voges-Proskauer

Se utilizó el método propuesto por la APHA (1946).

Producción de SH₂

Se usó el método de Zobell y Feltham (1934).

AGV Totales

Se utilizó el método de arrastre por vapor, modificado del original expuesto por Barnett (1961).

Se expresaron los resultados en mEq/litro.

Cromatografía Gaseosa

Se le añadió a 5 ml de la muestra 1 ml de una solución de metafosfórico al 25% y ácido fórmico al 5%, en una relación 3 a 1 v/v. Se esperan 30 minutos y al término se centrifuga durante 20 minutos a 5600 g.

El sobrenadante se utiliza como muestra según Cotlyn (1968).

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Hitachi Modelo F-6.

Se usó una columna de celita como soporte; silicona al 20% (p:p) y 10% ácido estárico (p:p) como fase líquida.

Microscopía Electrónica

Se tomaron 10 Slant y se le introdujo glutaraldehido al 3% en buffer de fosfato (Millonig, 1961) a 4°C, se esperó unos segundos y con un asa de platino se desprendieron las colonias.

Una vez obtenida una suspensión celular se centrifugó a 1300 g durante 2 horas a 4°C, obteniéndose un botón celular. Se lavó 30 segundos en el mismo buffer y fue fijado en tetraóxido de osmio al 2% en buffer de fosfato de Millonig (1961) durante 1 hora a 4°C. El botón celular fue deshidratado en concentraciones crecientes de alcohol etílico, se infiltró en mezcla de acetona y Epon y se incluyó en cápsulas 00 con Epon (Luft, 1961), polimerizándose a 60°C durante 48 horas. Se hicieron cortes entre plateado y amarillo claro en el Ultramicrotomo LKB III, los que se montaron sobre rejillas de 400 mesh sin membrana soporte. Se le hizo postcontraste con Uranyl Acetato saturado en alcohol tílico y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

Las rejillas fueron observadas en el microscopio electrónico Hitachi HU11A.

RESULTADOS

Este microorganismo se aisló a partir de licor ruminal de ganado vacuno F-1, con una dieta impuesta de napier "ad libitum", utilizando medio selectivo para bacterias anitolíticas RS, sembrándose a partir de una dilución de 10^{-7} , con un número promedio de 15 a 50 colonias por tubo.

Se obtuvo la cepa mediante seis pasos sucesivos de subcultivación en medio RS, utilizando una dilución de 10^{-5} .

Características Morfológicas

Es un coco Gram +, de 0.7 a 0.96μ , encapsulado que aparecen habitualmente en parejas y formando cadenas largas y cortas al cultivarse en medio líquido, aunque es de señalar que predominaron estas últimas. No presenta esporas ni flagelos, constatado por los métodos tincionales clásicos ya descritos, así como por microscopía electrónica al través de la técnica de tinción negativa.

La cáptula varió entre 0.089 y 0.14μ ; la pared celular osciló entre 150 y 210 Å y la membrana citoplasmática presentó valores extremos de 50 a 90 Å.

Forma colonias circulares, convexas, de contornos definidos, de color blanco-anacarado y en ocasiones con un color amarillo pálido.

Características del Crecimiento

Es anaerobio facultativo de crecimiento rápido.

Sus características de crecimiento determinan que se obtengan los valores máximos de densidad óptica en las seis primeras horas de cultivo en medio líquido, constatado al través de la turbidometría (Fig. 1)

La temperatura óptima de crecimiento osciló entre 37 y 40°C, aunque resistió 60°C durante veinte minutos. El crecimiento a 45°C se desarrolló con características normales, no obstante, éste fue pobre en cuanto al número de colonias presentes. No existió crecimiento a temperaturas inferiores a los 20°C.

Características Generales

Es una cepa productora de SH₂, que no presenta liquefacción de la gelatina. Da las reacciones de Voges-Proskauer y del rojo metilo positivas.

Se caracteriza por presentar en el medio de agar-sangre unas colonias de color verde-parduzco, así como un halo que la rodea con un punteado negro, compatible todo ello con una hemolisí tipo α.

El criterio de fermentación estuvo basado en la turbidometría, índice de acidez y producción total de gas.

Así, considerando en primera instancia los datos referentes al pH expuestos en la Tabla II, encontramos que fermentó el almidón, glucosa, celobiosa, galactosa y rafinosa; determinando un cambio de pH no tan definido frente a la arabinosa, manosa, lactosa, manitol; en tanto no fermentó el salicin, xilosa, ni la celulosa.

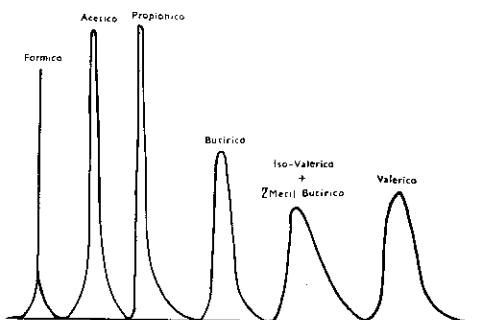


FIG. 1. Cromatograma de los patrones de ácidos grasos volátiles.

TABLA II

FERMENTACION

| Sustrato | <i>pH</i> | | <i>D_o</i> | | <i>AGV*</i> | | <i>Totales</i> | <i>(Meq/L)</i> |
|-----------|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|
| | <i>1ra. Exp.</i> | <i>2da. Exp.</i> | <i>1ra. Exp.</i> | <i>2da. Exp.</i> | <i>Acético**</i> | <i>Propiónico**</i> | <i>1ra. Exp.</i> | <i>2da. Exp.</i> |
| Almidón | 5.3 | 5.2 | 0.47 | 0.48 | 73.1 | 26.9 | 3.00 | 5.04 |
| Arabinosa | 5.5 | 6.1 | 0.2 | 0.174 | — | — | 13.03 | 13.94 |
| Galactosa | 5.3 | 5.1 | 0.48 | 0.47 | 65 | 35 | 37.02 | 41.06 |
| Manosa | 6.1 | 5.9 | — | — | 77.7 | 22.3 | 30.02 | — |
| Lactosa | 5.9 | 5.9 | — | — | 65 | 35 | 18.06 | — |
| Rafinosa | 5.3 | 5.3 | — | — | 65.1 | 38.4 | 34.04 | — |
| Manitol | 5.8 | 6.1 | — | — | 65.4 | 34.5 | 30.6 | 17.00 |
| Xilosa | 6.4 | 6.4 | — | — | 57.1 | 43.1 | 17.02 | — |
| Celobiosa | 5.5 | 5.4 | 0.56 | 0.44 | 67.5 | 32.5 | 12.76 | 8.00 |
| Celulosa | 6.4 | 6.4 | — | — | 43 | 57 | 17.58 | 12.62 |
| Glucosa | 5.4 | 4.0 | 0.73 | 0.75 | 73.1 | 26.9 | 3.00 | 5.04 |
| Salicin | 6.1 | 6.1 | — | — | — | — | 5.52 | 5.04 |

* Los valores expuestos son producto de la diferencia entre los medios líquidos inoculados y el control respectivo.

** Expresado en % de los totales.

Considerando los datos expuestos en la Tabla II referentes a la turbidometría, encontramos que existió un crecimiento máximo en el medio con glucosa, obteniendo valores de 0.7 Do, y en orden decreciente con el almidón, celobiosa, galactosa y arabinosa. No se constató crecimiento con celulosa ni con xilosa.

Teniendo en cuenta la producción de gas en $\mu\text{l}/\text{min}$ (Tabla III) observamos que la relación mayor fue la de la glucosa, siguiéndole en orden la arabinosa, almidón, galactosa, lactosa y por último la celulosa. Los valores de pH de las determinaciones de glucosa y almidón oscilaron entre 4 y 5.

TABLA III
PRODUCCION DE GAS

| Azúcar | Producción total (μL) | | $\mu\text{L}/\text{Min}$ | | AGV Totales* | mEq/L | |
|-----------|------------------------------------|-----------|--------------------------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| | 1ra. Exp. | 2da. Exp. | 1ra. Exp. | 2da. Exp. | | 1ra. Exp. | 2da. Exp. |
| Glucosa | 113.3 | 113.7 | 2.7 | 2.7 | 3.02 | 3.96 | |
| Almidón | 128.5 | 138.92 | 2.7 | 1.6 | 5.46 | 5.04 | |
| Celulosa | 114.81 | 110.98 | 1.75 | 1.6 | 3.48 | 3.88 | |
| Arabinosa | 129.6 | — | 2.6 | — | — | — | |
| Galactosa | 388.0 | 245.0 | 3.6 | 1.4 | 9.0 | — | |
| Lactosa | 96.7 | — | 1.6 | — | 8.04 | — | |

* Los valores expuestos son producto de la diferencia entre las experiencias y el control respectivo.

Analizando los resultados señalados en la Tabla II con relación a la presencia de AGV como productos de la fermentación encontramos que los valores máximos se obtuvieron con la arabinosa, galactosa, lactosa, oscilando entre 30.02 y 41.06 mEq/litro; en tanto la manosa, el manitol y la rafinosa presentan valores entre 17.00 y 18.06 mEq/litro.

Los AGV totales determinados como productos de la fermentación al través del método manométrico nos brindan valores mínimos de 3.02 a 3.96 mEq/litro para la glucosa y la celulosa; de 5.04 mEq/litro para el almidón y entre 8.04 y 9 mEq/litro para la galactosa y la lactosa.

Se encontró una producción acentuada de acético (Tabla II) con respecto al propiónico, aunque no guardó esta misma relación en el caso de la celobiosa que

se invirtió, existiendo una proporción mayor de propiónico; así como el manitol, en el que no resultó tan definida la desproporción acético-propiónico. La relación promedio osciló alrededor de un 60% de acético con respecto a un 30% de propiónico. No se constató la presencia de los restantes AGV.

DISCUSION

La cepa SB-69-I presenta características de fermentar con preferencia monosacáridos y polisacáridos con enlaces tipo α , aunque es necesario consignar que no es exclusivo su comportamiento frente a azúcares con este tipo de enlaces, pues determina un pH bajo así como una Do alta con la celobiosa. Es obvio señalar que la producción de AGV estuvo en razón inversa al índice de acidez y a los valores de la turbidometría, lo que nos mueve a inferir que esta cepa utiliza otras vías metabólicas para la producción de AGV, en el caso de aquellos sustratos que no son de carácter preferencial. Surge como excepción a esto el caso de la celulosa, y a su vez, como un imperativo para profundizar en su estudio. Pudiéramos pues plantearnos, que esta cepa utiliza la vía degradativa de péptidos y aminoácidos (Hungate, 1966 y Church, 1969) para satisfacer sus requerimientos energéticos cuando está en presencia de un sustrato que no está contemplado dentro de aquellos que puede degradar en razón directa de su composición enzimática.

Azúcares ————— Fermentación ————— AGV



Péptidos y
Amino-Acidos

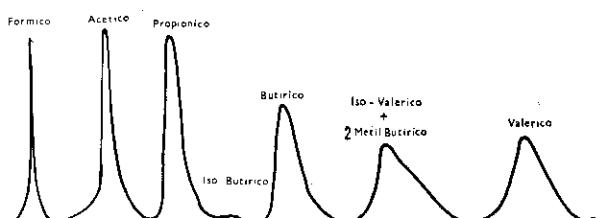


FIG. 2. Cromatograma de los patrones ácidos grasos volátiles.

Los péptidos y aminoácidos están presentes en grandes proporciones en el medio basal de cultivo, y por tanto, pueden al través de esta vía dar lugar a la formación de AGV. Queda puesta esta alternativa planteada para estudios metabólicos con esta cepa que esclarezcan estas consideraciones.

Se aprecia la correlación entre los datos obtenidos utilizando las técnicas habituales de fermentación y el manométrico aunque este último resulta engorroso para generalizar su utilización con un carácter sistemático en el estudio de las características fisiológicas de una cepa.

La cepa SB-69-1 presenta caracteres morfológicos que rememoran el de la familia Lactobacillaceae, y en particular el género Streptococceae (*Bergey's Manual*, 1957); su comportamiento según su capacidad de fermentación frente a cada sustrato está acorde en un 75% con los datos referentes al *S. bovis* en particular, no existiendo ningún carácter diferencial específico incomptable con esta clasificación. Teniendo en cuenta los datos anteriormente señalados, y muy en particular las consideraciones sobre la variabilidad de los microorganismos del rumen expuestas por Bryant (1959): "Las especies, probablemente tendrán que ser definidas para incluir muchas características variables, o el número de especies llegará a ser inmanejable", planteamos la similitud de nuestra cepa a las que se le asignan habitualmente al *S. bovis*.



FIG. 3. Coloración de Gram. Se observan cocos en parejas y en cadenas cortas. 2000 X

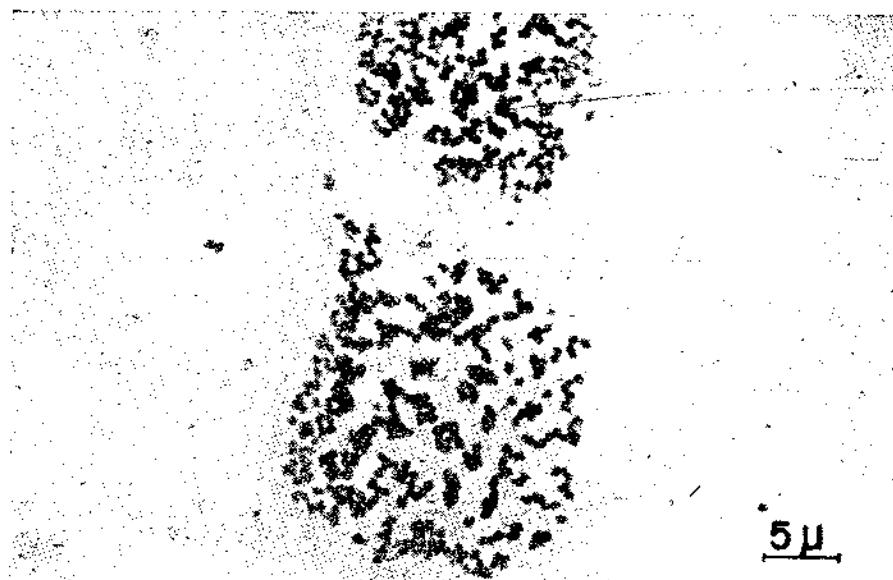


FIG. 4. Coloración de Gram. 2000 X

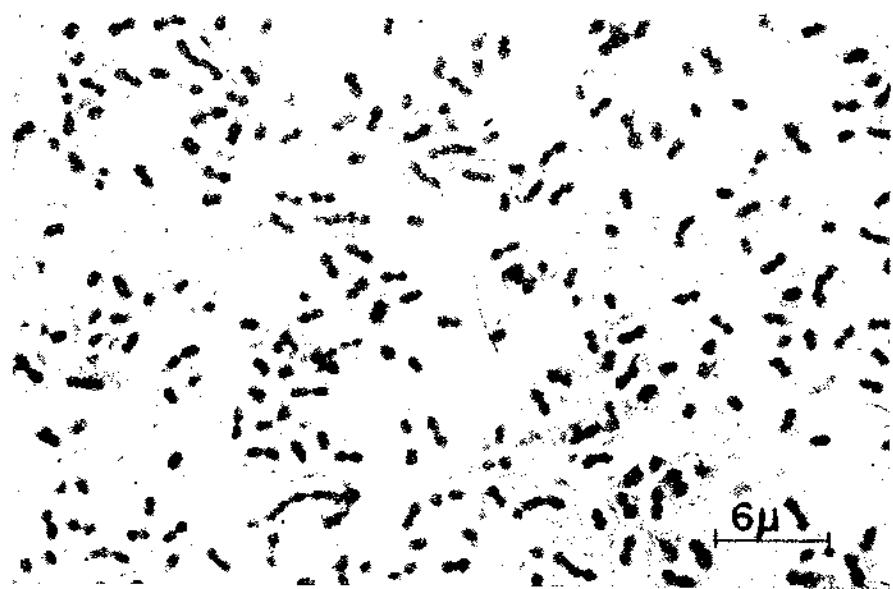


FIG. 5. Coloración de Tyler, donde se constata la presencia de la cápsula. 2560 X

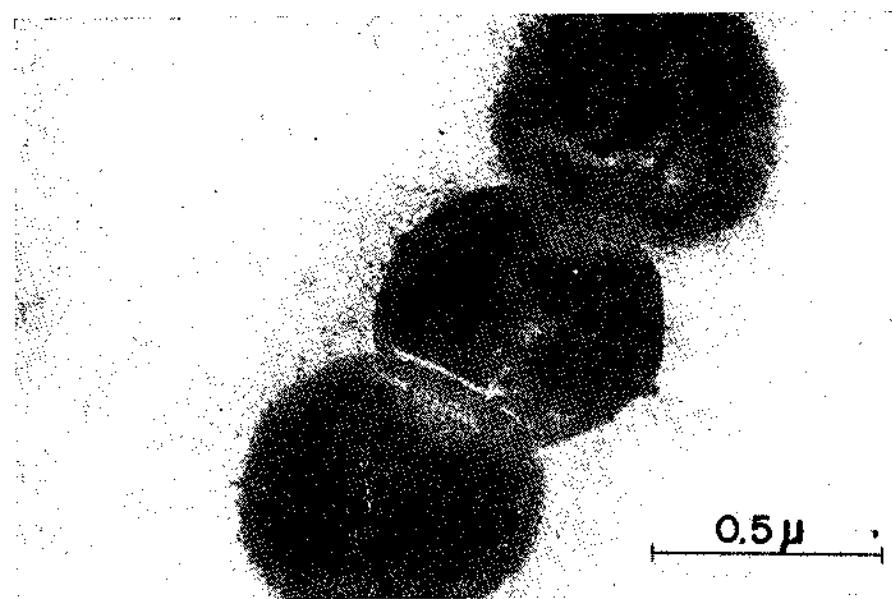


FIG. 6. Se observa un streptococcus cuya cápsula ha sido parcialmente disuelta. Se distinguen la pared celular, membrana plasmática y en su interior un material denso al haz electrónico compatible con material protoplasmático. Se observan también zonas claras, con granulaciones más densas que corresponden a material nuclear. 60 000 X

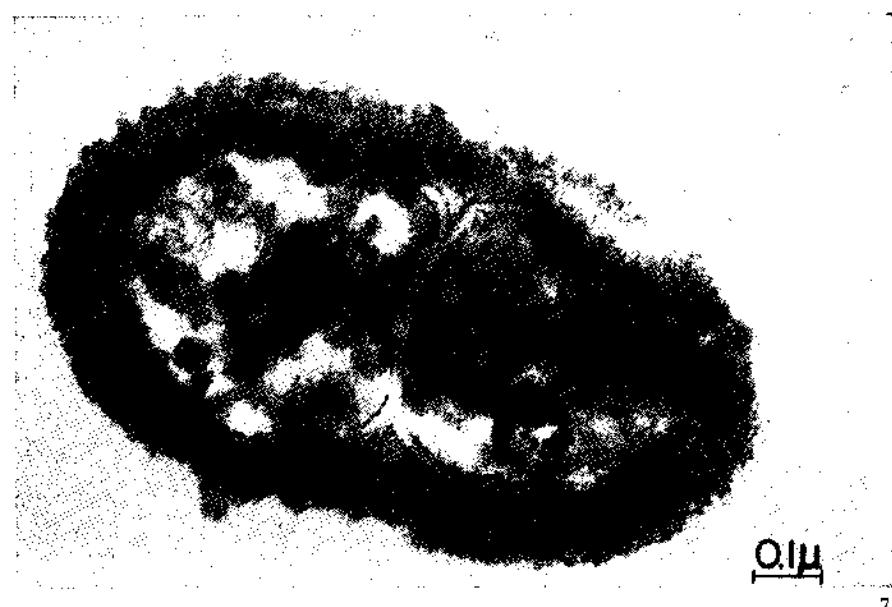




FIG. 8. Las mismas estructuras antes señaladas, 100 000 X

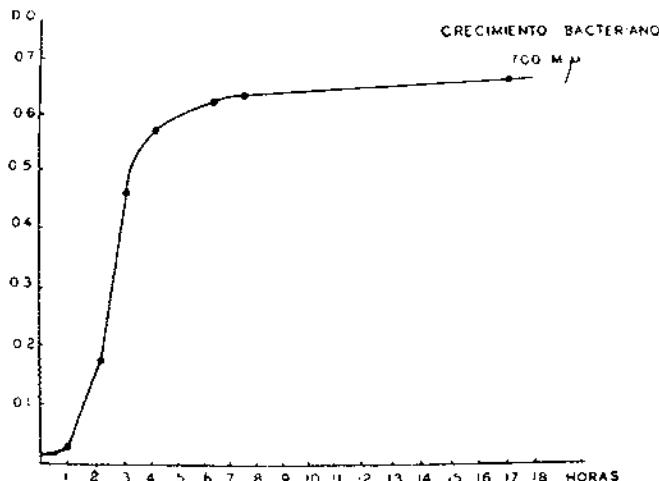


FIG. 9. Curva de crecimiento bacteriano al través de la turbidometría a 700 mμ. Se constata el crecimiento rápido de este microorganismo.

FIG. 7. Microfotografía de la forma en pareja, constatándose definitivamente la cápsula y las demás estructuras celulares. Se observan zonas claras compatibles con pérdida de material citoplasmático. 90 000 X

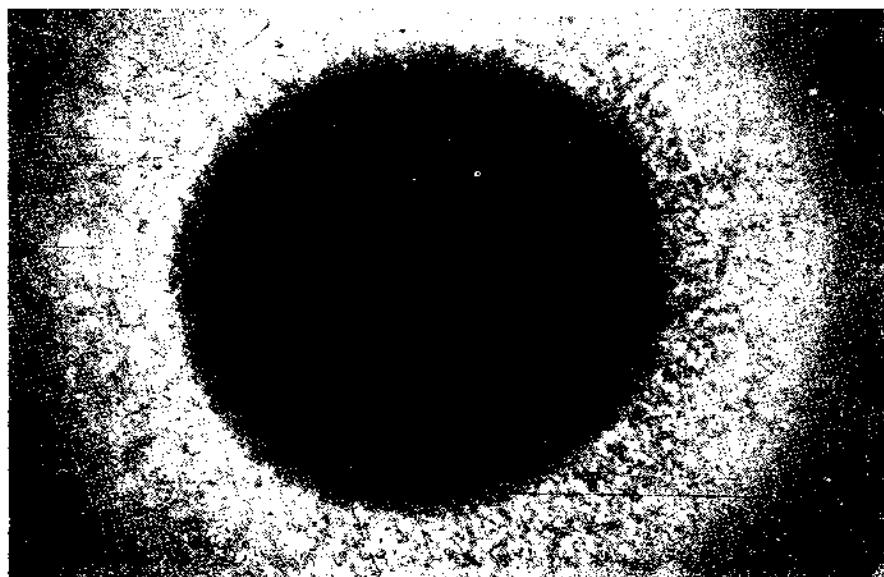
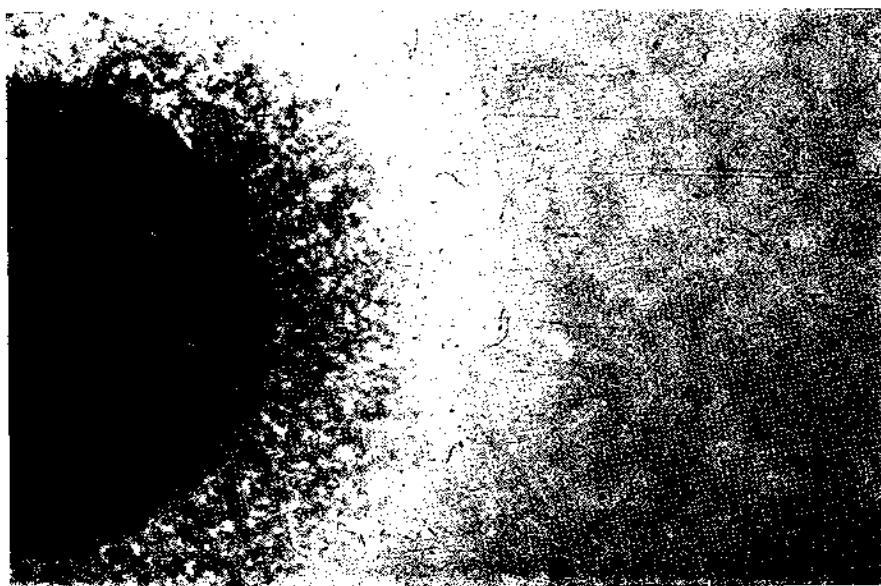


FIG. 10. Colonias crecidas en medio de agar sangre donde queda definida la hemólisis incompleta por la presencia de un punteado debido a los hemáties en el halo de hemólisis, compatible con una hemólisis tipo α 32 X



RECONOCIMIENTO

Agradecemos la valiosa cooperación brindada por el colectivo de compañeros de los laboratorios de Estructuras Ultrafinas, y muy en particular a los del laboratorio del Rumen, ya que sin su participación no hubiera podido realizarse éste.

REFERENCIAS

- APHA (American Public Health Association). Standard Methods for the Examination of water and sewage. 9th. Ed., New York, 1946.
- BARNETT A. J. G. y REID R. L. Reactions in the Rumen, pp. 54. Edwards Arnold, London, Great Britain, 1961.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th. ed., The Williams and Wilkins Co. U.S.A., 1957.
- BRYANT M. P. y BURKEY L. A. Cultural Methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.*, 36, 205, 1953.
- BRYANT M. P. *Bact Rev.*, 23, 125, 1959.
- CHURCH D. C. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants Vol. I, USA, 1969.
- FROBISHER M. Fundamentals of Microbiology. 7th. ed., W. B. Saunders Co., London, New York, U.S.A., 1962.
- FRUTTON J. S. General Biochemistry. John Wiley, New York, U.S.A., 1963.
- GALL L. S. y HUHTANEN C. N. Criteria for judging a true rumen organism and a description of five rumen bacteria. *J. Ani. Sci.*, 9, 353, 1950.
- GUNSAULUS I. C. y STANIER R. Y. The Bacteria, Academic Press, London, New York, U.S.A., 1964.
- HAMLIN L. J. y HUNGATE R. E. *J. Bact.*, 72, 548, 1956.
- HUNGATE R. E. The rumen and its Microbes. Academic Press, U.S.A., 1966.
- JONES G. A. Influence of acetohydroxamic acid on some activities "in vitro" of the rumen microbiota. *Canadian Journal of Mic.*, 14, 411, 1968.
- LANANNA Y. MALLETT. Basic Bacteriology and its Biological Background. Williams and Wilkins, U.S.A., 1965.
- LEIFSON E. J. Bacteriol 20, 203, 1930. Citado en: The Manual of Microbiological Methods, 1957.
- LUFT J. A. Improvement in epoxy-resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Citol.*, 10, 113, 1961.
- MILLONIG G. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation. *J. Appl. Phys.*, 32, 1637, 1961.

- REYNOLDS E. S. The use of lead-citrate at high pH, as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biology*, 17, 208, 1963.
- SEAMAN G. R. Experiments in Microbial Physiology and Biochemistry. Burgess Publishing Co. U.S.A., 1963.
- ZOBELL Y FELTHAM. *J. Bacteriol.*, 28, 1969, 1934. Citado en: The Manual of Microbiological Methods, 1957.