RECUENTOS DE BACTERIAS RUMINALES EN CULTIVOS *IN VITRO* A LOS QUE SE AÑADEN PLANTAS MEDICINALES QUE MODIFICAN LA FERMENTACIÓN[1]

R. García – González*, B. A. Dehority# y S. López*
* Dpto. Producción Animal I, Universidad de León, 24071 León
# Ohio Agricultural Research & Development Center, Wooster, OH, 43219 USA

INTRODUCCIÓN

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (García – González y col., 2004; Fernández y col., 2003), se ha observado que la adición de algunas plantas medicinales o aceites esenciales puede provocar cambios importantes en la fermentación ruminal *in vitro*.

En este trabajo se estudian los efectos de la adición de ajo (*Allium sativum*), frángula (*Rhamnus frangula*), ruibarbo (*Rheum officinale*) o aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la viabilidad de la población microbiana y los recuentos de bacterias en cultivos *in vitro* inoculados con líquido de rumen de ovejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos *in vitro*: El líquido ruminal empleado como inóculo de los cultivos se obtuvo mezclando muestras de contenido ruminal recogidas de dos ovejas fistuladas en el rumen. Estos contenidos se diluyeron 1:10 y se homogeneizaron durante tres minutos en una batidora. De este homogenizado se tomaron 2 ml para inocular los tubos de cultivo. Los cultivos se llevaron a cabo en tubos de 18 x 150 mm. Estos tubos fueron previamente dosificados con 8 ml del medio de cultivo descrito por Grubb y Dehority (1976) (40% de líquido ruminal centrifugado (1000xg, 10 minutos), 25% H_2O, 15% Solución Mineral I, 15% Solución Mineral II, 0,3% Na_2CO_3 y 0,05% Cys – HCl) y esterilizados. En el momento de la inoculación se añadieron los 2 ml de inóculo, y la mezcla de sustrato y planta medicinal correspondiente. Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones de estricta anaerobiosis.

El sustrato utilizado fue una mezcla de dactilo (60%) y maíz (40%); molido por malla de 1 mm. Se prepararon mezclas del sustrato con las diferentes plantas medicinales, de manera que la concentración final de la planta medicinal en el medio de cultivo fuese de 1 mg/ml. El aceite esencial se dosificó a razón de 500 ppm. Para cada planta medicinal se ensayaron dos niveles de sustrato en el medio (1 y 2%), y los cultivos fueron prolongados durante 24 o 48 h. Todos los cultivos se realizaron por duplicado. Las plantas se ensayaron en días diferentes, incubando cada día, un total de 8 cultivos control y 8 cultivos con la planta correspondiente.

Recuentos: Una vez finalizada la incubación (tras 24 o 48 h), se eligió al azar una de las repeticiones de cada tratamiento para realizar diluciones seriadas de su contenido, en tubos estériles con solución anaeróbica (65% H_2O, 15% Solución Mineral I, 15% Solución Mineral II, 0,3% Na_2CO_3 y 0,05% Cys – HCl). Finalmente, de las diluciones 10^{-6} a 10^{-11} se inocularon los tubos de recuento (3 tubos por dilución). Estos tubos habían sido preparados previamente con el medio de cultivo descrito para el recuento conjunto de bacterias totales y celulolíticas (Dehority y col. 1989) Tras 14 días de incubación, en cada uno de estos tubos se registró el pH y la desaparición de celulosa en el medio. A partir del número de tubos de cada dilución en los que se detectó un descenso del pH (de al menos 0,2 puntos respecto al valor

[1] **AGRADECIMIENTOS**: R. García – González contó con una ayuda complementaria del Programa de Becas Predoctorales del M.E.C., durante su estancia en Ohio Agric. Res. & Dev. Center. Asimismo se dispuso de de una ayuda del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de la Junta de Castilla y León (Proyecto 29/03).

de tubos control sin inocular) o se apreció visualmente la desaparición de celulosa, se estimó el número de bacterias viables totales y celulolíticas en el cultivo, respectivamente, empleando las tablas estadísticas del método del "Número Más Probable" (NMP).

Además, se determinó la degradación de la materia seca (MS) y fibra neutro detergente (FND) en los cultivos. Para ello, una vez tomada la muestra para los recuentos, se centrifugaron los tubos que contenían los cultivos para separar el residuo de incubación. Sobre este residuo se añadieron 5 ml de detergente neutro y los tubos se introdujeron en autoclave a 100º C durante 60 minutos. El residuo remanente fue lavado 3 veces con 10 ml de agua caliente, previa centrifugación y eliminación del sobrenadante. Finalmente, el residuo de FND fue secado en estufa a 100º durante 24 horas.

Las comparaciones de los datos obtenidos de los cultivos que contenían cada planta y sus respectivos cultivos control se han realizado aplicando una *t* de Student pareada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla I. Valores medios del número estimado de bacterias totales y celulolíticas en los cultivos [log (Nº de bacterias viables/ml)]

		Control	Planta	EED	P
A. sativum	Totales	9,06	9,38	0,381	0,46
	Celulolíticas	7,68	7,85	0,255	0,54
R. frangula	Totales	9,14	9,33	0,201	0,41
	Celulolíticas	7,69	8,02	0,471	0,54
R. officinale	Totales	9,24	9,09	0,293	0,65
	Celulolíticas	7,98	7,54	0,343	0,29
T. vulgaris	Totales	9,33	9,51	0,425	0,70
	Celulolíticas	7,77	< 6	-	-

Tabla II. Degradación de la Materia Seca (MS) y Fibra Neutro Detergente (FND) de los cultivos (%)

		Control	Planta	EED	P
A. sativum	MS	79,4	81,3	0,10	0,07
	FND	50,9	52,0	2,45	0,67
R. frangula	MS	77,7	75,1	1,42	0,06
	FND	47,0	39,2	3,42	0,03
R. officinale	MS	81,1	78,9	0,54	< 0,01
	FND	55,0	47,2	1,32	< 0,01
T. vulgaris	MS	82,1	62,8	1,23	< 0,01
	FND	57,5	12,3	2,63	< 0,01

EED: Error Estándar de la Diferencia

Los recuentos estimados de bacterias viables totales y celulolíticas no resultaron afectados por la presencia de las plantas medicinales. En cambio, en el caso del aceite esencial de *T. vulgaris*, no se constató crecimiento de bacterias celulolíticas en ninguno de los tubos inoculados (a partir de la dilución 10^{-6}). Ello hace pensar que este aceite esencial sí que afectó significativamente a esta población. Este dato se corrobora al considerar que la degradación de la FND disminuyó un 78% respecto al control.

Así mismo, si bien el número total de bacterias estimado en presencia de este aceite no disminuyó, el crecimiento en los tubos de recuento resultó en cierta

manera errático, con disminuciones del pH poco significativas, aunque suficientes para considerarlos positivos al crecimiento, según el criterio empleado.

La degradación de la MS y FND fue menor cuando se añadió *R. frangula* o *R. officinale* al sustrato de incubación. En cambio, en el caso de *A. sativum* se apreció una tendencia a estimular la degradación de la MS. Los datos de menor degradación de la FND con *R. frangula* y *R. officinale* no se correspondieron con menores recuentos de la población celulolítica. Cabe considerar que los errores propios del método de recuento empleado resultan algo mayores que los de los métodos de recuento directo de colonias en medios solidificados (Dehority y col., 1989) Por otra parte, el crecimiento neto de la población microbiana es consecuencia del diferencial entre la multiplicación y la autolisis de la población. Los recuentos de celulolíticos a las 0 h resultaron de 7,68, 7,68, 7,48 y 8,18 para *A. sativum, R. frangula, R. officinale* y *T. vulgaris*, respectivamente, indicando que, prácticamente, no se produjo crecimiento neto de la población en ningún cultivo, ni los controles ni los tratados con plantas.

Wells y Russell (1994) constataron que tras 30 h de inanición, la población de *F. succinogenes* S85 se mantenía en 10^6 bacterias viables/ml (de 10^8 iniciales) Así mismo, la viabilidad de este genotipo no se vio afectada hasta que su tasa metabólica disminuyó por debajo de 0,01 mg polisacárido x proteína^{-1} x hora^{-1} (partiendo de valores iniciales de 0,08).

La metanogénesis disminuye significativamente en presencia de estas plantas medicinales (García – González y col., 2004). Si la metanogénesis resultase directamente impedida, la acumulación de H_2 en el medio dificultaría la ruta acetogénica, la principal llevada a cabo por las bacterias celulolíticas. La actividad metabólica de este grupo se vería dificultada mientras que su viabilidad se mantendría, en las condiciones ensayadas, quizás debido a una menor autolisis. *F. succinogenes* cuenta con un mecanismo para inhibir sus autolisinas cuando la población entra en fase estacionaria, mientras que la autolisis es una característica propia de poblaciones de esta especie en crecimiento (Wells y Russell, 1996)

Si bien no se recogen los resultados en este trabajo, también se realizaron recuentos de la población de hongos y las poblaciones bacterianas amilolítica y proteolítica. En ninguno de los casos se observaron diferencias manifiestas en la viabilidad de estos grupos microbianos cuando se incluía la planta medicinal en el medio de cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dehority BA, Tirabasso PA y Grifo AP, 1989. Most-Probable-Number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolityc numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol*, 55: 2789–2792.

Fernández M, García – González R, Serrano E, Bodas R, González JS y López S, 2003. Efecto de los aceites esenciales de diferentes plantas medicinales sobre la fermentación ruminal *in vitro. ITEA* Vol. Extra 24: 738–740.

García – González R, López S, Fernández M, Rodríguez AB y González JS, 2004. Screening the activity of medicinal plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev*. 44, suppl. 1: 42–43.

Grubb JA y Dehority BA, 1976. Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl. Environ. Microbiol*. 31: 262–267.

Wells JE y Russell JB, 1994. The endogenous metabolism of *Fibrobacter succionogenes* and its relationship to cellobiose transport, viability and cellulose digestion. *App. Microbiol. Biotechnol*. 41: 471–476.

Wells JE y Russell JB, 1996. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly? *J Dairy Sci*. 79: 1487–1495.