

Aislamiento y caracterización convencional de bacterias anaerobias del compartimento 1 de la alpaca (*Vicugna pacos*)

Pedro Ubaldo Coila Añasco

pcoila@unpa.edu.pe

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional del Altiplano,
Puno, Perú

<https://orcid.org/0000-0002-5708-7464>

Rebeca Luisa Aparicio Armas

134828@unsaac.edu.pe

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional de San Antonio
Abad del Cusco, Perú

<https://orcid.org/0009-0009-8613-9938>

Oscar David Oros Butrón

odoros@unap.edu.pe

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional del Altiplano,
Puno, Perú

<https://orcid.org/0000-0002-0579-5995>

Diana Sánchez Herencia

diana.sanchez@unsaac.edu.pe

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional de San Antonio
Abad del Cusco, Perú

<https://orcid.org/0000-0001-6203-5354>

Celso Zapata Coacalla

czapata@unap.edu.pe

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

<https://orcid.org/0000-0001-6086-380X>

RESUMEN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un mamífero doméstico que habita las zonas altoandinas, en donde la calidad de pastos es de pobre calidad, son los microorganismos que aloja en su tracto digestivo, quienes hacen posible la utilización de estos pastos en productos de alto valor biológico como la carne y fibra. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar las bacterias anaerobias del compartimento C1 del tracto digestivo de la alpaca a través de pruebas convencionales. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de Altiplano Puno, para lo cual se utilizaron 34 muestras del licor y pared del compartimento C1, procedente de cuatro alpacas machos, raza Huacaya destinadas a camal. El aislamiento y purificación de las cepas anaeróbicas se realizaron mediante cultivos en jarras de anaerobiosis. La caracterización e identificación de las cepas anaeróbicas aisladas se realizaron mediante pruebas convencionales de aerotolerancia, fenotípicas (morfológicas) y bioquímicas (catalasa, oxidasa, prueba Kligler, prueba citrato de Simmons y prueba de medio SIM). Como resultado del estudio, se lograron aislar e identificar cinco cepas anaeróbicas: dos cepas a *Ruminococcus sp.*, dos cepas a *Fibrobacter sp.* y una cepa a *Butyrivibrio sp.* Las tres cepas, cumplen un rol fundamental en la degradación de carbohidratos complejos como la celulosa y otros polisacáridos fibrosos de difícil digestión.

Palabras clave: alpaca; compartimento 1; identificación; bacterias anaeróbicas.

Isolation and conventional characterization of anaerobic bacteria from compartment 1 of the alpaca (*Vicugna pacos*)

ABSTRACT

The alpaca (*Vicugna pacos*) is a domestic mammal that inhabits the high Andean areas, where the quality of pastures is of poor quality, it is the microorganisms that it houses in its digestive tract, which make it possible to use these pastures in products of high biological value such as meat, and fiber. The objective of the study was to isolate and characterize anaerobic bacteria from the compartment 1 of the alpaca digestive tract through conventional tests. The study was carried out in the Microbiology Laboratory of the La Raya Experimental Center of the National University of Altiplano Puno, for which 34 samples of the liquor and wall of compartment C1 were used, from four male alpacas, Huacaya breed destined for slaughter. The isolation and purification of the anaerobic strains were carried out by cultures in anaerobic jars. The characterization and identification of the isolated anaerobic strains were carried out using conventional aerotolerance, phenotypic (morphological) and biochemical tests (catalase, oxidase, Kligler test, Simmons citrate test and SIM medium test). As a result of the study, it was possible to isolate and identify five anaerobic strains: two strains to *Ruminococcus sp.*, two strains to *Fibrobacter sp.* and a strain to *Butyrivibrio sp.* The three strains play a fundamental role in the degradation of complex carbohydrates such as cellulose and other difficult-to-digest fibrous polysaccharides.

Keywords: alpaca; compartment 1; identification; anaerobic bacteria

Artículo recibido 15 febrero 2023

Aceptado para publicación: 15 marzo 2023

INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido sudamericano doméstico que se cría en las regiones altoandinas, incluso a altitudes superiores a los 5000 m donde la hipoxia, el frío y la baja calidad de los pastos naturales son sus características principales y las limitantes más importantes para el desarrollo pecuario de otras especies ganaderas y la agricultura (Cruz, 2018). Por esta razón, las alpacas constituyen un recurso genético de mucha importancia económica, social, cultural y científica para la población andina; pues, producen carne de alta calidad y fibra fina muy cotizada (Avilés et al, 2018).

Estos camélidos han desarrollado mecanismos bioquímicos, morfológicos, fisiológicos y de comportamiento, que les permite vivir en un ambiente de condiciones desfavorables. Uno de esos mecanismos, es el poseer un sistema digestivo conformado con tres compartimentos, en la que albergan todo un ecosistema microbiano, similar a los otros rumiantes, incluyendo bacterias, protozoos, arqueas y hongos, responsables de la fermentación del forraje consumido (alto contenido de fibra y bajo contenido de proteína), único sustento alimenticio de estos animales (Cerón, 2015). Es el compartimento 1 (C1) el mayor saco fermentativo, equivalente al rumen, gracias a los microorganismos que aloja, siendo en su gran mayoría anaerobios estrictos; y, en menor proporción, los anaerobios facultativos, que finalmente determinan el patrón fermentativo del animal (San Martín & Olazabal, 2005).

Entonces, es importante identificar a las bacterias presentes en el compartimento 1 de la alpaca ya que, sin duda alguna, son los responsables de la eficiencia digestiva de los forrajes fibrosos consumidos por la alpaca. Si bien existen varios estudios previos, la mayoría está orientado a la identificación de microorganismos degradadores de fibra y productores de metano, siendo pocos los estudios de identificación de las bacterias anaerobias de este compartimento, debido a las dificultades de anaerobiosis que requiere su aislamiento. En ese contexto, el objetivo del estudio fue aislar, caracterizar e identificar algunas bacterias anaerobias del compartimento 1 del tracto digestivo de la alpaca a través de métodos convencionales; esto es, pruebas de aerotolerancia, técnicas de tinción, características morfológicas o fenotípicas, pruebas bioquímicas y fermentación de sustratos.

METODOLOGÍA

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Centro Experimental “La Raya” de la Universidad Nacional de Altiplano, ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar, departamento de Puno, Perú, situado en la zona agroecológica de Puna Húmeda y a una altitud de 4200 m. La temperatura oscila entre -10°C a 17°C y la precipitación pluvial promedio es de 525.7 mm (SENAMHI, 2019).

Animales y muestras

Se utilizaron cuatro alpacas macho adultos de raza Huacaya destinados a camal, criados bajo un sistema tipo extensivo utilizando las praderas naturales de la zona como única fuente de alimentación.

Se colectaron un total de 14 muestras de contenido (licor del compartimiento 1) (LC1) y 20 muestras de raspado de pared del compartimiento 1 (PC1) de los animales recién beneficiados. Las muestras de licor fueron tamizadas con gasa estéril para diluirlas con solución de NaCl 0,09% en proporción de 1:10, luego se centrifugaron en tubos colectores de 15 mL a 3500 rpm por 30 minutos; y, el precipitado bacteriano obtenido, se colocó en tubos Eppendorf para su cultivo inmediato (Cerón, 2014). Las muestras de raspado de pared fueron utilizadas directamente para la siembra.

Siembra

Las muestras de LC1 y PC1 se cultivaron en placas Petri con medio de cultivo de Agar Sangre Columbia (OXOID) suplementado con L-cysteina (0.05%) prereducidos mediante la técnica de doble capa, la siembra se realizó por estría en agotamiento con el uso del asa de Kolle, para inmediatamente verter agar fundido y enfriado a 50°C (Thatcher & Clarck, 1973). Las placas fueron apiladas de forma invertida dentro de las jarras de anaerobiosis conteniendo sobres de BBL Gaspak como indicadores de anaerobiosis. Las jarras se colocaron en incubación por 48 horas a 37°C (Forbes, Sahn, Weissfeld, & Trivino, 2009).

Resiembra

Se seleccionaron colonias aisladas tomando en consideración sus características morfológicas (tamaño, forma, borde y color) para realizar el repique por picadura en la profundidad de los tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo Agar Sangre Columbia prereducido, suplementado con L-cysteina (AS-Cys), Agar Brewer Anaerobic (BA) y Agar Brewer anaerobic suplementado con L-cysteina (BA-Cys)

(Koneman et al., 2008) (MacFaddin, 2003). Se volvieron a incubar por 48 horas a 37°C.

Identificación de bacterias anaerobias

La identificación de las bacterias anaerobias aisladas se realizó mediante la caracterización fenotípica y pruebas bioquímicas convencionales, basándose en la morfología de las colonias, prueba de aerotolerancia, tinción de Gram y fermentación de sustratos.

La caracterización fenotípica se realizó mediante la observación de las características morfológicas de las colonias y tinción de Gram. La caracterización morfológica incluyó el tamaño, forma, borde y color.

La prueba de aerotolerancia, se realizó para considerar sólo a los anaerobios estrictos (Fernández et al., 2010)

La caracterización bioquímica se realizó mediante las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de catalasa y oxidasa, prueba de KIA (Kligler iron agar), citrato de Simmons y medio SIM (MacFaddin, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fenotípica y bioquímica

Se lograron sembrar 34 muestras, de las cuales sólo 22 cultivos crecieron tras 48 horas de incubación en condiciones de anaerobiosis, correspondiendo 4 a licor del C1 (LC1) y 8 a pared del C1 (PC1). Luego de realizar la prueba de aerotolerancia en placa, se determinó que las 4 colonias de LC1 y sólo uno de PC1 correspondía a bacterias anaeróbicas estrictas. La Tabla 1, describe las características fenotípicas y la Tabla 2 los resultados de las pruebas bioquímicas de estas bacterias anaeróbicas.

Tabla 1 . Características macro y microscópica de las bacterias anaerobias aisladas según su procedencia y medio de cultivo.

Identificación /Procedencia	Medio de cultivo	Características macroscópicas				Características microscópicas	
		Tamaño	Forma	Borde	Color	Tinción Gram	
						Forma	color
6-LC1	BA	Mediano	Redonda	Regular	Blanquecina	Bacilos Curvos	Gram (-)
1-LC1	AS-Cys	Pequeño	Redonda	Regular	Blanquecina	Bacilos	Gram (-)
14-PC1	AS-Cys	Mediano	Rizoide	Regular	Blanco	Bacilos	Gram (-)
4-LC1	BA	Mediano	Redonda	Regular	Blanquecina	Cocos	Gram (+)
11-LC1	BA-Cys	Pequeño	Redonda	Regular	Blanquecina	Coco - Bacilos	Gram (+)

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas de las bacterias anaerobias aisladas según procedencia y medio de cultivo

Identificación /Procedencia	Medio de cultivo	Pruebas Bioquímicas						
		Catalasa	Oxidasa	KIA	SIM			Citrato de Simmons
					Sulfuro	Indol	Movilidad	
6-LC1	BA	-	-	A/A	-	-	-	-
1-LC1	AS-Cys.	-	-	A/A G	-	-	-	-
14-PC1	AS-Cys.	-	-	A/A G	-	-	-	-
4-LC1	BA	-	-	A/A	-	-	-	-
11-LC1	BA-Cys.	-	-	A/A	-	-	-	-

Como se puede notar, las cinco cepas aisladas son negativas a las pruebas de catalasa y oxidasa, lo que demuestra que corresponden a bacterias anaerobias estrictas (MacFaddin, 2003). Por otro parte, todas las cepas aisladas tuvieron la capacidad de fermentar lactosa y glucosa a la vez. Además, dos cepas presentaron ruptura del medio de cultivo, indicando que son productoras de gas. Ninguna de las cepas produjo ennegrecimiento del medio, lo que indica que las bacterias no tienen la capacidad de producir ácido sulfhídrico. Finalmente, todas las cepas resultaron negativas a las pruebas de sulfuro indol movilidad (SIM) y citrato de Simons (CS), lo que se interpreta que no fueron capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Identificación de las cepas Aisladas

Las cepas identificadas como 4-LC1 y 11-LC1, según sus características fenotípicas, pruebas bioquímicas y patrones de fermentación de carbohidratos, coinciden con el patrón característico de *Ruminococcus sp.* (Rodríguez et al., 1996 y Cerón, 2014) mientras que, las cepas rotuladas como 1-LC1 y 14-PC1 a *Fibrobacter sp.*; en tanto que la cepa 6-LC1 corresponde a *Butyrivibrio sp.* (Cerón, 2014). Carhuapoma et al (2022), en su estudio realizado en la provincia de Huancavelica ubicado a 3820 m de altitud, reportaron la presencia de bacterias celulolíticas como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* con excelente capacidad para degradar celulosa a partir del consumo de forrajes fibrosos en los contenidos ruminales de vacuno, ovino y camélidos. Por su

parte, Ortiz (2012), estudiando el líquido ruminal de ovinos y llamas alimentadas con forrajes de baja calidad con alto contenido fibroso también encontraron bacterias celulolíticas como: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*. Asimismo, Xia et al (2020), evaluando la población de bacterias en alpacas macho y ovinos machos de un año, reportaron una mayor abundancia de bacterias fibrolíticas como *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*. Todos estos resultados concuerdan con el presente estudio. He et al (2018), señalan que las bacterias del género *Ruminococcus*, son las principales bacterias ruminales celulolíticas implicadas en la degradación de fibra en rumiantes y camellos bactriano, quienes tienen una capacidad única para digerir forrajes poco digeribles por otras especies. En el presente estudio, este género se caracterizó como bacterias anaerobias Gram positivas en forma de cocos y cocobacilos en alpacas machos de 3 a 4 años de edad alimentadas con pastos naturales de baja calidad, resultados que coinciden con lo reportado por estos autores. Además, estos microorganismos tuvieron la capacidad fermentadora de glucosa y lactosa, como fuente de carbono, pero que resultaron negativas a la prueba de catalasa, oxidasa y citrato de Simmons resultados que coinciden con lo reportado por Rodríguez et al (1996).

Con respecto el género *Fibrobacter sp.*, Rodríguez (2013) coincide en señalar que son bacterias anaerobias Gram negativas, móviles, en forma bacilar, aunque puede presentarse en forma de cocos y cocobacilos, no formadoras de esporas, son degradadoras de celulosa, además de degradar pectina, xilano, lactosa y son productores de succinato como producto final de fermentación. En el presente estudio se determinó además que este género no tiene la capacidad de metabolizar el citrato como única fuente de carbono, resultados que coinciden con lo reportado por Londoño et al (2011) y Rodríguez et al (1996).

Carroll et al (2019) reportaron que el género *Butyrivibrio sp.*, se encontraba en mayor abundancia en tres sitios del tracto gastrointestinal (C1, duodeno, yeyuno) de las alpacas alimentadas con heno de alfalfa en relación con las alpacas alimentadas con heno de hierbas (íleon, ciego, intestino grueso). Wang et al (2016), agregan que estos microorganismos están correlacionados con la alta concentración de ácido butírico como producto de la fermentación. Por su parte, Cerón (2014), indica que independientemente de la técnica empleada para su identificación, estos microorganismos requieren

condiciones de anaerobiosis para su crecimiento, son bacilos Gram positivas, ligeramente curvos, pudiendo encontrar en forma aislada, en pares o formando cadenas, con la capacidad de fermentar glucosa, celobiosa, maltosa, xilano, pectina y son productores de ácido butírico como principal producto de fermentación, resultados que coinciden a los hallados en el presente estudio.

Carhuapoma et al (2022), demostraron que los líquidos ruminales de alpacas, vacunos y ovinos son excelentes fuentes de bacterias celulíticas y con alta capacidad degradadora de celulosa; asimismo, el contenido ruminal y cepas de alpacas demostraron ser eficientes para aplicaciones biotecnológicas como biofermentadores, biodegradadores y catalizadores biológicos. La excelente capacidad degradativa de celulosa demostrada por las bacterias celulíticas provenientes de alpacas, probablemente se deba al tipo de pastos naturales consumidos en las regiones altoandinas como alimento exclusivo, razón por la cual el compartimiento 1 de la alpaca, alberga una flora microbiana distinta al de otros rumiantes.

CONCLUSIONES

Utilizando medios selectivos para el aislamiento de bacterias anaeróbicas a partir del compartimiento 1 de alpacas provenientes de un sistema crianza tipo extensiva, con uso de las praderas naturales de la puna húmeda del altiplano peruano como única fuente de alimentación, se lograron aislar cinco cepas de bacterias anaerobias estrictas, las que, por métodos convencionales, fueron identificadas como *Ruminococcus sp.*, *Fibrobacter sp.* y *Butirivibrio sp.*, todas con alta capacidad de degradabilidad de fibra. Se sugiere complementar el estudio con el uso de marcadores moleculares de DNA para una definitiva identificación de las bacterias anaeróbicas.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt-Perú), por haber financiado el presente estudio (Contrato 377-2019).

LISTA DE REFERENCIAS

Avilés, D., Montero, M., & Barros-Rodríguez, M. (2018). Los camélidos Sudamericanos: productos y subproductos usados en la región andina. *Actas iberoamericanas en conservación animal*, 11, 30-38.

- Carhuapoma, V., Auqui, G., Valencia, N., Gonzales, T., Guillen, H., & Esparza, M. (2022). Bacterias fribrolíticas aisladas del rumen de alpaca, ovino y vacuno con capacidad biodegradadora de celulosa. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, XXXII, 1-7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32094>.
- Carroll, C., Olsen, K. D., Ricks, N. J., Dill-McFarland, K. A., Suen, G., Robinson, T. F., & Chaston, J. M. (2019). Bacterial communities in the alpaca gastrointestinal tract vary with diet and body site. *Frontiers in Microbiology*, 10 (JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03334>.
- Cerón, M. (2014). *Estudio de la diversidad microbiana del compartimento C1 del sistema digestivo de la llama (Lama glama)*. Tesis doctoral de la facultad de Farmacia y Bioquímica [UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES].
- Cerón, M. (2015). Diversidad microbiana del estómago de los camélidos sudamericanos. *VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos*.
- Cruz, L. (2018). *Parámetros Genéticos de Caracteres Funcionales y Secundarios en Alpacas*. Tesis Doctoral de la Facultad de Veterinaria [UNIVERSIDAD COMPUTENSE].
- Fernández, A., García de la fuente, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., & Triveno, E. (2009). *Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico* (12th ed.). Editorial Médica Panamericana S.A.
- He, J., Yi, L., Hai, L., Ming, L., Gao, W., & Ji, R. (2018). Characterizing the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract segments of the Bactrian camel. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18298-7>.
- Londoño, A., Fernández, J., Molina, L., Polanco, D., & Gutiérrez, L. (2011). Cuantificación de bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del rumen de ganado bovino: comparación de tres técnicas. *Hechos microbiolog.*, 2(1), 51-59.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3rd ed.). Editorial Médica Panamericana S.A.

- Ortiz, A. (2012). *Capacidad digestiva del contenido ruminal de la oveja (Ovis aries) y Llama (Lama glama)*. Tesis de maestría [UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES].
- Rodríguez, F., Díaz, T., Mackenzie, G., Guativa, L., & Afanador, C. (1996). Aislamiento, patrón de fermentación de carbohidratos y caracterización morfológica de bacterias celulolíticas del rumen de bovinos alimentados con heno de raigrás en Colombia. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 1 (1), 23-28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449953017004>.
- San Martín, F., & Olazabal, J. (2005) Nutrición y alimentación en camélidos sudamericanos domésticos. Manual de técnico alpaquero (pp. 55-68).
- Senamhi (2019) Boletín climático Nacional. www.senamhi.gob.pe
- Thatcher, F., & Clarck, D. (1973). *Análisis microbiológico de los alimentos*. Editorial Acribia.
- Wang, W., Li, F., Wang, X., Liu, T., Nian, F., Yue, X., Li, F., Pan, X., La, Y., Mo, F., & Li, B. (2016). Effects of early feeding on the host rumen transcriptome and bacterial diversity in lambs. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep32479>.
- Xia, C. Q., pei, C.X., Huo, W. J., Zhang, C. X., & Ren, Y. S. (2020). Forestomach fermentation and microbial communities of alpacas (*Lama pacos*) and sheep (*Ovis aries*) fed maíz stalk-based diet. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 29(4), 323-329. <https://doi.org/10.22358/jafs/131230/2020>.