

Modulación *in vitro* de la fermentación ruminal con microorganismos nativos y potencial efecto en la emisión de metano

Sofía Fernández

Tutor: Dr. Pablo Zunino

Cotutor: Mag. Martín Fraga

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tesina de Grado, Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Setiembre 2012, Montevideo

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Rumiantes	5
2.2 Microbiota ruminal y procesos microbianos del rumen	6
2.3 Microbiota fibrolítica	10
2.4 Metano	12
2.5 Probióticos	13
2.6 Aproximaciones <i>in vitro</i> para el estudio de la dinámica de la fermentación	14
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Medios de cultivo, manipulaciones y condiciones de trabajo	17
5.2 Identificación bacteriana	18
5.3 Ensayos <i>in vitro</i>	19
5.4 Perfil de ácidos grasos volátiles y pH en los fermentadores	21
5.5 Formación de metano	21
5.6 Análisis estadístico	22
6. RESULTADOS	23
6.1 Identificación de los aislamientos	23
6.2 Evaluación de los parámetros de producción de gas	23
6.3 Cuantificación de ácidos grasos volátiles	25
Tiempo 4	25
Tiempo 8	26
Tiempo 96	26
Concentración de AGV en el tiempo	27
6.4 Análisis de pH	28
Tiempo 4	28
Tiempo 8	28
Tiempo 96	29

6.5 Cuantificación de metano	30
7. DISCUSIÓN.....	32
7.1 Identificación de los aislamientos.....	32
7.2 Modulación de la fermentación ruminal	33
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	37
9. AGRADECIMIENTOS	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40

1. RESUMEN

El rumen es una gran cámara de fermentación en la cual habita una diversa trama de microorganismos que incluyen bacterias, hongos, protozoarios y arqueas. El proceso de simbiosis existente entre el animal y los microorganismos permite un sistema cooperativo en el que ambos obtienen un beneficio. La mayor parte de los animales no pueden digerir los polímeros de carbohidratos vegetales, pero los microorganismos del rumen puede colonizar y digerir rápidamente las partículas del alimento. Los productos de la fermentación son ácidos grasos volátiles, una muy importante fuente de energía para el rumiante, y gases de desecho como CO₂ y CH₄. El proceso de fermentación también lleva al crecimiento microbiano dentro del ambiente ruminal, y las células microbianas representan una fuente de proteínas muy importante.

En este trabajo, se identificaron cepas aisladas de contenido ruminal por medio de la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. Luego, con el fin de evaluar el potencial modulador de la fermentación de los aislamientos, se realizó una aproximación *in vitro* en fermentadores que simulan el ambiente ruminal. Se obtuvieron medidas de concentración de ácidos grasos volátiles, concentración de metano, pH y presión de gas dentro de los fermentadores. Para el estudio de la cinética de fermentación los datos de presión fueron convertidos a volumen y ajustados a un modelo matemático.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Rumiantes

Los rumiantes constituyen un grupo de mamíferos herbívoros cuyo estómago altamente especializado se divide en cuatro cámaras. Las primeras tres denominadas rumen, retículo y omaso, surgen a partir del esófago y la cuarta, el abomaso, es el denominado “estómago verdadero”. En este último encontramos los tres tipos de mucosa diferenciadas en el estómago de los mamíferos (cardíaca, fúndica y pilórica) y es donde comienza el proceso digestivo químico que continúa en el intestino delgado y grueso (Brock et al. 2004, Kardong 1999).

La celulosa es el principal polisacárido encontrado en los vegetales. Los mamíferos, así como otros grupos de animales, no son capaces de degradar la celulosa ya que no sintetizan celulasas, por lo que deben establecer relaciones simbióticas con microorganismos para permitir su asimilación. El rumen, la primera de las cámaras, alberga un ecosistema microbiano complejo que participa en la fermentación de la celulosa y otros polisacáridos vegetales (Brock et al. 2004). Cuando el rumiante se alimenta, el rumen es el primer compartimiento hacia donde se dirige el alimento, funcionando como reservorio temporal y cámara de fermentación. Este tipo de degradación de la celulosa que tienen los rumiantes se denomina fermentación pre-gástrica, ya que se da en la parte anterior del tracto digestivo a diferencia de los fermentadores intestinales (Kardong 1999).

El correcto funcionamiento de este “gran fermentador” requiere el constante mantenimiento de un medio apropiado para el crecimiento de los microorganismos y para una continua fermentación. El pH de la ingesta y del líquido ruminal, es mantenido a un nivel relativamente constante (entre 6 y 7) por el ingreso de alimento, agua y saliva con propiedades tamponadoras, compuesta principalmente por bicarbonato. La temperatura también se mantiene relativamente constante a 39°C, así como el suministro de alimento y la remoción de productos de la fermentación (Bryant 1959, Mackie et al. 2001, Hoar 1978). El proceso de la rumia es necesario para una eficiente degradación mecánica del alimento, e implica complejas ondas de contracción que se expanden por todo el rumen y son coordinadas con la remasticación y el paso del alimento a lo largo del tubo digestivo. Los ciclos de contracción se dan entre el rumen y el retículo para mezclar el alimento ingerido y los microorganismos. El proceso de mezcla causa una separación del alimento y productos de fermentación dentro del rumen: las partículas más grandes quedan flotando en la superficie mientras que las más pequeñas se depositan ventralmente y el gas formado como producto de la fermentación se acumula sobre el fluido. Se requieren tres pasos para el proceso de regurgitación y remasticación de las partículas más grandes. En el primer paso el rumiante contrae el diafragma como para realizar una inspiración pero al mantenerse cerrada la glotis se produce una

diferencia de presión negativa en el tórax. En el paso siguiente el esfínter gastroesofágico se relaja para dejar pasar la masa de alimento en dirección a la boca y como último paso, las contracciones peristálticas del esófago llevan la masa parcialmente degradada (o quimo) hacia la boca para la remasticación. Este proceso se realiza de forma continua y repetitiva hasta que se hayan desmenuzado las partículas grandes, lo cual puede llevar hasta un tercio del día dependiendo de la cantidad de fibra que contiene el alimento. El avance del alimento degradado hacia el abomaso para la hidrólisis ácida y enzimática se da gracias al omaso, que funciona como una bomba, movilizándolo desde el retículo hacia el abomaso (Kardong 1999).

En el retículo, omaso y sobre todo en el rumen, se mantienen las condiciones adecuadas de temperatura, pH y anaerobiosis para que se lleven a cabo los numerosos procesos microbianos, de los que son directamente responsables bacterias, arqueas, hongos y protozoos que viven en simbiosis con el rumiante.

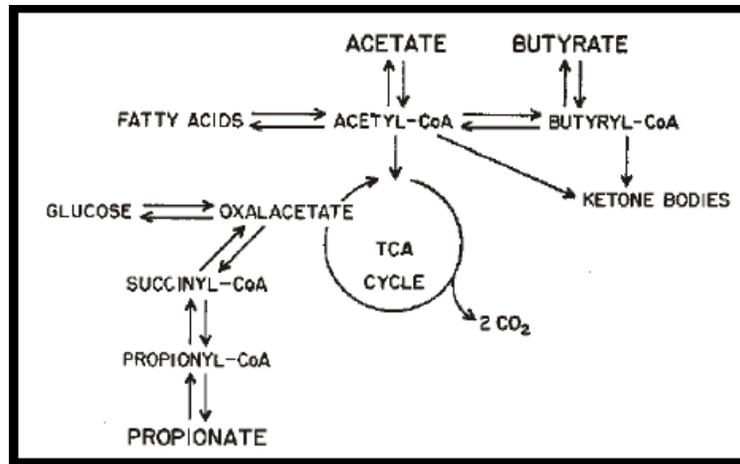
2.2 Microbiota ruminal y procesos microbianos del rumen

La compleja comunidad microbiana existente en el rumen está compuesta por bacterias, arqueas, hongos y protozoarios (van Soest 1994). Forman una unidad ecológica altamente integrada entre ellos y el rumiante, y juegan un papel vital en la nutrición y bienestar del animal. El mutualismo entre la comunidad microbiana ruminal y su hospedero se basa en la digestión anaerobia de componentes de la pared celular vegetal, así como la síntesis de proteína de buena calidad y vitaminas. A su vez el animal provee un medio altamente adaptado para el mantenimiento de esta compleja comunidad.

La celulosa es el polisacárido más abundante en la biósfera y representa una importante fuente de energía. La degradación microbiana ruminal de este polisacárido, y otros polisacáridos estructurales vegetales, tiene como principales productos los ácidos grasos volátiles (AGV) y gases como metano y dióxido de carbono. La mayor parte de los AGV formados contienen de dos a cuatro átomos de carbono, y constituyen por sí solos el 70% de las necesidades energéticas del rumiante (Hill et al. 2006, Kardong 1999). Este grupo de AGV se compone en un 95% de ácido acético, propiónico y butírico, en una relación aproximada de 70:20:10 (Lana et al. 1998). Los ácidos grasos volátiles son absorbidos en su gran mayoría a nivel del epitelio ruminal y luego pasan al hígado para ser metabolizados en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Una gran parte del ácido propiónico y butírico es transformada por las células epiteliales ruminales en ácido láctico y cuerpos cetónicos, respectivamente. En cambio, el ácido acético en su mayor parte pasa sin modificaciones al hígado (Castejón et al. 1979).

El ácido propiónico es el único que puede ser utilizado para gluconeogénesis, mientras que el ácido butírico es importante en la producción de la leche ya que provee los primeros cuatros

carbonos para la síntesis de aproximadamente la mitad de los ácidos grasos de cadena corta y mediana que la componen. El ácido acético, convertido en acetyl-CoA, también es utilizado en la síntesis de ácidos grasos (Chiba 2007).



Vías metabólicas más importantes de los AGV. El propiónico es gluconeogénico, mientras el acético y el butírico son cetogénicos (Chiba 2007)

Las proteínas vegetales constituyen las tres cuartas partes del nitrógeno ingerido. Entre el 60 y el 90% de la proteína de la dieta es degradada por los microorganismos ruminales, mientras que el resto pasa al abomaso donde es digerida y los péptidos y aminoácidos resultantes se absorben a nivel del intestino. Las proteínas en su mayor parte son hidrolizadas por proteasas microbianas en el rumen, resultando en aminoácidos y péptidos. Los péptidos pueden llegar intactos al abomaso o ser hidrolizados en el rumen para obtener aminoácidos, y éstos pueden ser transformados en AGV, dióxido de carbono y amoníaco, o ser utilizados por la microbiota ruminal para la síntesis de sus propias proteínas (Castejón et al. 1979, Mackie y White 1990). La biomasa microbiana generada, principalmente bacterias, acompañan el pasaje del quimo y son digeridas en el abomaso, representando una importante fuente de proteínas para el rumiante. La proteína de origen microbiano aporta los 10 aminoácidos considerados esenciales para los tejidos de mamíferos, con un 70 a 75% de digestibilidad (Relling y Mattioli 2003). El amoníaco formado en el rumen es utilizado para la síntesis de aminoácidos por parte de los microorganismos y es un intermediario en el sistema de reciclado de los desechos nitrogenados del metabolismo animal. La urea es excretada en los humanos y muchos otros animales, pero en rumiantes y otros fermentadores del intestino anterior, ésta puede difundir desde la sangre hacia la cavidad fermentadora, donde la ureasa microbiana la convierte en amoníaco. De esta forma el amoníaco es convertido en aminoácidos (Hill et al. 2006).

La biota microbiana tiene la capacidad de sintetizar las vitaminas que requiere el animal y que no puede sintetizar. De esta manera no es necesaria la ingestión de fuentes ricas de vitaminas

exógenas (Hill et al. 2006). Las vitaminas del grupo B, especialmente la B12, y la vitamina K se obtienen enteramente de los microorganismos (Chiba 2007).

El rumen se caracteriza por una alta densidad poblacional, alta diversidad y complejidad de interacciones. Las bacterias son los microorganismos predominantes dentro de la microbiota ruminal llegando a una concentración de 10^{11} células viables/gramo (cv/g) de contenido ruminal, comprendiendo cientos de especies (Mackie et al. 2001). Se calcula que aproximadamente 30 especies son dominantes (10^7 cv/gramo) e importantes en actividades bioquímicas, y se pueden encontrar en rumiantes provenientes de diferentes zonas geográficas (Hespell 1987).

Los hongos anaerobios se encuentran en cantidades de 10^2 - 10^4 cv/g distribuidos en 5 géneros. Han atraído considerable atención desde su descubrimiento en la década del 70, y solo han sido encontrados en el sistema digestivo de herbívoros. Estos perdieron su mitocondria pero poseen organelos denominados hidrogenosomas (sintetizan ATP e hidrógeno molecular) (Flint 1987, Mackie et al. 2001). Los protozoarios ruminales se presentan en una concentración de 10^4 a 10^6 cv/g, distribuidos en más de 25 géneros. Son proteolíticos y se alimentan de bacterias para obtener proteínas, y su contribución en la degradación de componentes vegetales todavía no es clara. Por último el Dominio *Archaea* está representado en el rumen por un grupo muy diverso que lleva a cabo la síntesis de metano y por lo tanto se les denomina de forma general metanógenas (Mackie et al. 2001). Para llevar a cabo la síntesis de metano, estos microorganismos consumen el hidrógeno molecular, producto de la fermentación.

La microbiota ruminal se encuentra distribuida en tres ambientes dentro del sistema ruminal. Existen microorganismos que se encuentran libres en el líquido ruminal, otra porción se encuentra unida a sustratos insolubles y la tercera se adhiere al epitelio ruminal. Estos ambientes ruminales son muy diferentes entre sí y por lo tanto cargan con comunidades microbianas diferentes (Cheng et al. 1979, Larue et al. 2005, Olubobokun y Craig 1990). Más específicamente, las bacterias han sido clasificadas en cinco grupos dependiendo del ambiente donde se encuentran: 1) bacterias libres en el fluido ruminal, 2) asociadas débilmente a partículas de alimento, 3) asociadas fuertemente a partículas del alimento, 4) adheridas al epitelio ruminal y 5) asociadas a la superficie de protozoarios y hongos (Miron et al. 2001).

La microbiota adherida al epitelio ruminal representa sólo el 1% de toda la población microbiana (Cheng et al. 1979). No tienen un papel esencial en la digestión del alimento, y varios estudios indican que la dieta no influye tan fuertemente sobre su composición y número como lo hace con el contenido ruminal (Dehority y Grubb 1981, Sadet-Bourgeteau et al. 2010). Aún así, cumplen funciones importantes para el rumiante. Se han encontrado bacterias anaerobias facultativas que ayudan a mantener la anaerobiosis propia del sistema, mediante el consumo del oxígeno que pudiera difundir por el tejido epitelial del rumen. Se ha visto que

pueden digerir las células más distales y altamente queratinizadas del epitelio. Esto beneficia al rumiante en por lo menos dos aspectos, permite el reciclaje de las células muertas del tejido y mantiene su capacidad de absorción por la constante remoción de las células muertas. Muchas especies pueden hidrolizar la urea que difunde por el epitelio, aportando al reciclaje de nitrógeno (Cheng et al. 1979, Dehority y Grubb 1981). La colonización del epitelio significa una barrera para el pasaje de ciertos metabolitos y para evitar la adherencia de bacterias patógenas. La adhesión, a su vez, protege a las bacterias de ser digeridas por protozoarios y de ser removidas del rumen por los movimientos peristálticos que llevan a la digestión por el abomaso (McCowan et al. 1978). En esta comunidad encontramos principalmente Gram-positivos, y los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* representan más del 80% de la población (Sadet-Bourgeteau et al. 2010).

La fase líquida y las partículas más pequeñas son las primeras en abandonar el rumen, por lo tanto, para poder establecer una población estable, las bacterias que se encuentran libres en el fluido ruminal deben tener un tiempo de generación lo suficientemente corto como para no ser “lavados” del rumen (Frioni 2006). Entre las bacterias que se encuentran en el fluido ruminal, algunas se presentan como células individuales mientras que otras se presentan formando microcolonias asociadas a una matriz viscosa, formada esencialmente por glucoproteínas (Patterson et al. 1975). Se nutren de proteínas y carbohidratos solubles, y tienen poca participación en la digestión de sustratos insolubles (Miron et al. 2001). Este grupo constituye entre un 20 y un 30% de la masa microbiana total (Miron et al. 2001), y se ha determinado que se encuentran principalmente representados por el grupo Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) (67,5%), bacterias Gram positiva con bajo contenido G + C (LGCGPB) (30%), y *Proteobacteria* (2,5%) según Cho et al. 2006. Los resultados sobre la composición del fluido ruminal han sido muy variados, y se encontró que en diferentes condiciones alimenticias el grupo LGCGPB podría llegar a representar más del 90% de las bibliotecas de clones (Tajima et al. 2000), demostrando la gran variabilidad de la estructura de la comunidad microbiana en el rumen.

Las bacterias asociadas a partículas representan entre el 70 y el 80% de la masa microbiana. La adhesión es clave para la digestión de la fibra, y la primera etapa de colonización del alimento recientemente ingerido sucede dentro de los 15 minutos (Edwards et al. 2007). Su actividad es esencial para la digestión en el rumen ya que se ha estimado que son responsables del 88 al 91% de la actividad endoglucanasa y xilanasas ruminal, del 70% de la actividad amilasa y 75% de la actividad proteasa (Miron et al. 2001). Koike y col. (2003) realizaron estudios filogenéticos y encontraron que el filo LGCGPB representaba el 44% y el filo CFB el 43% de las bacterias asociadas a fibras. Los microorganismos adheridos a los sustratos insolubles lo hacen de forma fuerte o débil, constituyendo dos grupos de composición diferente (Olubobokun y Craig 1990).

Si bien la población microbiana del líquido ruminal y la adherida a los sustratos son diferentes, es bien sabido que ambas varían ampliamente con la dieta y otros factores externos (Tajima et al. 2001). En cambio, la microbiota adherida al epitelio no varía ampliamente con factores externos. Esto probablemente se deba a que las bacterias adheridas al epitelio tienen actividades metabólicas y sustratos diferentes a los microorganismos del contenido ruminal, siendo estos últimos fermentadores primarios y secundarios (Dehority y Grubb 1981).

Los cambios de la población microbiana frente a diferentes dietas han sido ampliamente estudiados. Particularmente, se ha estudiado en rumiantes la transición de una dieta rica en forraje a una con una mayor concentración de granos, los cuales contienen un alto porcentaje de azúcares solubles fácilmente fermentables, como el almidón. La presencia de altas concentraciones de estos azúcares lleva a la producción de lactato, que se puede acumular haciendo que el pH ruminal descienda bruscamente, llevando a una posible acidosis que podría conducir a la muerte del animal (Tajima et al. 2000, Fernando et al. 2010). La optimización de la utilización de granos como parte de la dieta mientras se mantiene una función normal del rumen y la salud del animal, sigue siendo uno de los desafíos más importantes en los procesos de intensificación de la ganadería (Cheng et al. 1998).

Muchos estudios sobre la variación de la microbiota frente a diferentes factores, como la dieta, utilizan metodologías moleculares basadas en la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S (Pitta et al. 2010, Sadet-Bourgeteau et al. 2010, Tajima et al. 2000, Tajima et al. 2001, Fernando et al. 2010). La complejidad de la población microbiana ruminal, su alto número y su dificultad para cultivar han llevado a que dichas técnicas sustituyan a las clásicas para el estudio de la composición y estructura de la población microbiana (Deng et al. 2007). De hecho, se estima que la población ruminal cultivable no sobrepasa el 11% (Pitta et al. 2010).

2.3 Microbiota fibrolítica

La microbiota del rumen cumple un rol central en la utilización del forraje de la dieta por parte de los rumiantes. Celulosa y hemicelulosa son los principales componentes de la pared vegetal, comprendiendo del 40 al 50% y del 20 al 30% respectivamente, de la masa seca de plantas vasculares (Mackie y White 1990). El proceso de degradación microbiana del material vegetal es llevado a cabo por una serie de microorganismos, de los cuales las bacterias son las más abundantes y diversas (Edwards et al. 2007). Al mejorarse las metodologías de cultivo para anaerobios en la década de 1950, Hungate fue capaz de aislar bacterias fibrolíticas que clasificó como *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*. *B. succinogenes* fue reclasificado a *Fibrobacter succinogenes* ya que la secuencia del gen 16S indicaba que debía ser ubicada en un nuevo género (Montgomery et al. 1988). La suma relativa

de estas tres especies celulolíticas utilizando sondas específicas se encuentra en el rango del 1 al 4% (Russell et al. 2009, Weimer et al. 1999, Fraga 2010).

El primer paso en la degradación de un sustrato insoluble es la adhesión. Este proceso permite que la población adherida tenga un tiempo de residencia mayor y que las enzimas unidas a las células bacterianas establezcan contacto con el sustrato y aseguren que los productos de degradación se encuentren preferencialmente disponibles (Mackie y White 1990). El proceso de adhesión que ocurre en el rumen puede ser mejor descrito si se divide en 4 pasos: a) transporte de la bacteria al sustrato insoluble, b) adhesión inicial no específica, c) adhesión específica, y d) proliferación de las bacterias adheridas en sitios específicos del tejido vegetal. Los pasos de este modelo son similares a la modalidad general de la adhesión microbiana a un sustrato insoluble, que eventualmente resulta en la formación de un biofilm (Miron et al. 2001). Las bacterias celulolíticas principales no tienen flagelos o cilias y por lo tanto su transporte hacia el sustrato particulado se da de forma independiente. A pesar de que la mezcla en el rumen es relativamente pobre, este proceso se da con suficiente rapidez debido a la alta concentración de estos microorganismos tanto en la fase fibrosa como la líquida (debido al desprendimiento de la fase fibrosa, Miron et al. 2001). La adhesión no específica se da por medio de fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, iónicas y electrostráticas; además se cree que los componentes constitutivos del glicocalix podrían estar involucrados (Miron et al. 2001, Cheng et al. 1981). En la adhesión específica está involucrada una estructura multienzimática denominada celulosoma, que se especializa en la adhesión y degradación de la celulosa. Esta estructura se encuentra en la superficie de la célula bacteriana, y le provee al microorganismo una ventaja directa para la utilización de los productos de degradación de la fibra (Krause et al. 2003). También se ha visto que las bacterias fibrolíticas ruminales no secretan activamente celulasas al medio líquido (Russell et al. 2009). La colonización de la fibra se da gracias a la proliferación de las bacterias adherentes sobre el sustrato, lo que les permite penetrar e invadir los tejidos vegetales formando microcolonias (Cheng et al. 1980). El ambiente generado por la digestión de la fibra de estas microcolonias atrae a colonizadores secundarios no celulolíticos, que podrían favorecer la degradación de la fibra por el consumo o retiro de los productos de la digestión celulolítica (Shinkai et al. 2010, McAllister et al. 1994). El establecimiento de este consorcio microbiano da lugar a la formación de un biofilm de población muy diversa, con microorganismos que se complementan fisiológicamente para llevar a cabo la completa digestión de la fibra (McAllister et al. 1994).

El pH ruminal es uno de los factores ambientales más importantes que afectan la degradación de la celulosa en el animal (Russell et al. 2009). Los cereales poseen un alto porcentaje de carbohidratos solubles, y su agregado a la dieta tiene como consecuencia un aumento en la tasa de fermentación y una consecuente disminución del pH. Se ha establecido que el crecimiento de bacterias fibrolíticas y el proceso de fibrólisis se ve inhibido en valores de pH

inferiores a 6 (Russell et al. 2009), afectando la digestibilidad y la ingesta de materia seca (Russell y Wilson 1996).

2.4 Metano

El metano es uno de los productos finales de la fermentación ruminal, producido por arqueas denominadas de forma general metanógenas. Los principales sustratos para la formación de metano son H_2 y CO_2 , liberados en el rumen a partir de la fermentación del alimento por parte de otros microorganismos. La formación de hidrógeno molecular en la fermentación es un proceso energéticamente desfavorable a menos que éste se mantenga en muy bajas concentraciones, (Carrillo 2003) por lo tanto su consumo por parte de las metanógenas es vital para evitar la inhibición de la vía de fermentación que lo produce. Sin embargo, la formación de metano significa una pérdida del 6% de la energía ingerida (Johnson y Johnson 1995) y constituye uno de los principales gases causantes del efecto invernadero (Gworgwor et al. 2006). Se calcula que los rumiantes domesticados producen aproximadamente 80 millones de toneladas de metano por año, representando un 15% de las emisiones antropogénicas (Moss et al. 2000). Estrategias para la reducción de las emisiones de metano no solo podrían aumentar la eficiencia en la obtención de energía del alimento, sino también disminuir el aporte al metano atmosférico, y por lo tanto mitigar el efecto invernadero.

Varios factores afectan la emisión de metano en los rumiantes, incluyendo el nivel de consumo, tipo de dieta, procesamiento del alimento, alteraciones de la microbiota, entre otros (Johnson y Johnson 1995). La proporción acético/propiónico (A/P) formado en el rumen tiene un gran impacto en la síntesis de metano. La síntesis de acético y butírico promueve la metanogénesis, mientras que la síntesis de propiónico es considerada una vía competitiva para el uso de H_2 . Si A/P fuera de 0.5, la pérdida de energía en forma de metano sería del 0%, y si el sustrato fuera todo fermentado a acético y nada a propiónico, la pérdida sería del 33%. Los valores de A/P en general varían de 0.9 a 4, por lo tanto las pérdidas en forma de metano también varían ampliamente (Johnson y Johnson 1995).

Una de las estrategias más conocidas y estudiadas para reducir la formación de metano es el suministro de antibióticos ionóforos, particularmente monensina. Su efecto en la reducción de la metanogénesis no se debe a un efecto directo sobre las metanógenas, sino que afecta las bacterias Gram positivas en general, produciendo varios efectos en el metabolismo ruminal. Sin embargo, los residuos de antibióticos en los productos vacunos y la posibilidad de generar microorganismos resistentes, ha llevado a que se busquen estrategias alternativas al uso de antibióticos (Moss et al. 2000).

2.5 Probióticos

El rol esencial que cumple la microbiota en la nutrición del rumiante proporciona un gran potencial para la mejora de la producción animal (Weimer 1998). Una de las principales metas de microbiólogos ruminales y nutricionistas es poder manipular el ecosistema ruminal para mejorar la eficiencia de conversión del alimento en productos de interés humano (Martin 1998).

En las últimas décadas la investigación se enfocó en los efectos de compuestos antimicrobianos en la fermentación ruminal. Específicamente, antibióticos ionóforos como la monensina son usados en sistemas intensivos para reducir pérdidas energéticas en forma de metano (Martin 1998). El uso de antibióticos como promotores del crecimiento puede producir una ganancia de peso estimada del 5%. El mecanismo de acción de estos antimicrobianos no se conoce con exactitud, pero básicamente producen cambios cualitativos y cuantitativos en la biota microbiana. Por ejemplo, pueden actuar disminuyendo la cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, o produciendo un cambio en la estructura poblacional que lleve a una disminución de producción de metano (Torres y Zaragoza 2002). Últimamente la comunidad científica ha manifestado una gran preocupación sobre el uso de estos antibióticos en la producción ganadera. Se ha demostrado que estos animales pueden funcionar como un gran reservorio de bacterias resistentes o de genes de resistencia contra antibióticos o clases de antibióticos relevantes para tratamientos clínicos en humanos (Aarestrup et al. 2001). La comunidad europea ha evaluado y prohibido el uso de la mayoría de los antibióticos como promotores del crecimiento, y otros están siendo evaluados (Aarestrup et al. 2001).

La búsqueda de estrategias alternativas al uso de antimicrobianos ha ganado fuerza en los últimos años, una de ellas se basa en el estudio de probióticos o direct-fed-microbials (DFM), definidos como un monocultivo o un cultivo mixto vivo de microorganismos que tienen algún efecto beneficioso sobre animales o humanos al ser consumido en cantidades suficientes (FAO/WHO 2001). El concepto original de la administración de DFM para humanos y ganado se basaba en el establecimiento de una biota saludable y la prevención del establecimiento de patógenos, pero se observó que algunas bacterias utilizadas como DFM tenían otros efectos beneficiosos como la prevención de la acidosis ruminal (Krehbiel et al. 2003). Algunos trabajos enfocados en los DFM se basan en el estudio de bacterias ruminales utilizadoras de lactato como *Megasphaera elsdenii* y *Prevotella bryantii*, para prevenir la acumulación de dicho ácido en el rumen durante el proceso de acidosis ruminal (Kung y Hession 1995, Chiquette et al. 2008, Klieve et al. 2003). También existe un gran interés en la optimización de la velocidad y el grado de digestión de la fibra (Weimer 1998). La presencia de fibra fermentable en las heces apoya la idea que el proceso de fibrólisis no es óptimo en el rumen, y una mejora en la capacidad de la microbiota ruminal para degradar la pared celular ha sido objeto de estudio por décadas (Krause et al. 2003). Uno de los posibles beneficios de la manipulación de la población

celulolítica nativa puede estar en modular las proporciones de AGV en el rumen. Es bien conocido que las tres especies celulolíticas más estudiadas producen una mezcla de productos finales de fermentación que es bastante típica para cada especie (Weimer 1998). La calidad y cantidad de los productos de fermentación depende de los tipos y actividades de los microorganismos del rumen, y esto a su vez tiene un enorme impacto en la producción de nutrientes y el rendimiento de los rumiantes (Mackie y White 1990).

Para manipular y maximizar la digestión de la fibra es necesario entender la estructura de la comunidad ruminal, especialmente la bacteriana, y los factores que influyen su composición (Kobayashi 2006). Grupos específicos de bacterias no cultivadas están siendo consideradas como miembros muy importantes de los consorcios fibrolíticos, y se deben tener en cuenta para comprender y modular esta compleja comunidad (Kobayashi 2006). Preguntas clave para la mejora del proceso de digestión de la fibra quedan por ser respondidas. Una de ellas es si el factor limitante de este proceso son las bacterias celulolíticas o la naturaleza de las paredes celulares vegetales. Una segunda pregunta es si los organismos introducidos pueden multiplicarse y persistir en el rumen a un nivel como para generar cambios significativos (Krause et al. 2001). La utilización de cepas nativas como posibles probióticos tiene la ventaja de que presentan una buena capacidad de adaptación y permanencia en el órgano blanco a diferencia de cepas exógenas (Vinderola et al. 2004). El establecimiento de un organismo exógeno se dificulta por el hecho de que el rumen no es un ecosistema cerrado y existe el pasaje continuo de microorganismos, por lo que es un sistema dinámico que impacta significativamente sobre la persistencia de los inoculantes (Krause et al. 2001).

2.6 Aproximaciones *in vitro* para el estudio de la dinámica de la fermentación

Las técnicas de medida de producción de gas (PG) *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal han sido muy utilizadas en las últimas décadas. Una de las ventajas de las técnicas de PG es que puede ser automatizadas para obtener un gran número de datos, permitiendo la estimación de parámetros más precisos que técnicas gravimétricas, por ejemplo (Huhtanen et al. 2008). Un sustrato puede ser incubado bajo condiciones que simulen el ambiente ruminal (fluido ruminal y un buffer) y la producción de gas es medida como un indicador indirecto de cinética de fermentación, ya que se produce de forma simultánea y en conjunto con la digestión de la fibra (Schofield et al. 1994, Rymer et al. 2005). Cuando se combina con medidas de degradación, las técnicas de producción de gas proporcionan una medida de la proporción de alimento que se fermentó en contraposición a lo que se utilizó para el crecimiento microbiano (Rymer et al. 2005).

Las curvas típicas de producción de gas tiene una forma sigmoidal y presentan por lo menos tres fases. La primera de ellas es una fase de baja o ausente producción de gas, en la que se da

la adhesión y la colonización de la fibra. Luego cuando el sustrato está saturado con microorganismos o enzimas, se alcanza la fase de producción de gas exponencial. En esta etapa se degradan primero los sustratos solubles que son fácilmente fermentables, dejando atrás sustratos de más difícil degradación. Cuando el sustrato se agota, la velocidad de producción de gas es cero (Beuvink y Kogut 1993).

Con estas aproximaciones se han podido estudiar diferentes parámetros de la fermentación ruminal en diferentes condiciones, que de realizarlas en un sistema *in vivo* sería muy costoso o complicado. Por otro lado, se debe tener en cuenta que los resultados encontrados en sistemas *in vitro* pueden diferir de aquellos que se obtienen en sistemas *in vivo*, debido a características del sistema ruminal, como absorción de productos de fermentación y el constante pasaje de microorganismos, entre otros factores (Meissner et al. 2010). Además, cuando se estudian probióticos, muchas veces las cepas inoculadas a animales son seleccionadas utilizando criterios observados *in vitro*, y los resultados obtenidos no siempre se correlacionan. También es bien sabido que las cepas fibrolíticas, por ejemplo, pueden sufrir cambios sutiles en su fenotipo debido a las condiciones de cultivo en el laboratorio, y estos cambios pueden ser claves para su habilidad de colonizar el sustrato o persistir *in vivo* (Krause et al. 2001). De cualquier manera, los estudios *in vitro* siguen representando la mejor opción para una primera evaluación de un potencial probiótico u otro modulador de la microbiota.

En este trabajo, siete cepas nativas relacionadas filogenéticamente con bacterias fibrolíticas fueron utilizadas en un ensayo en fermentadores *in vitro* con el fin de analizar su potencial modulador de la fermentación ruminal. Para ello se analizó la dinámica de producción de gas en los fermentadores, la concentración de AGV, el pH y la concentración de metano.

3. HIPÓTESIS

La fermentación ruminal puede ser modulada por medio de bacterias nativas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar bacterias ruminales nativas para su potencial utilización como probióticos moduladores de la fermentación ruminal en un modelo *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar microorganismos aislados de contenido ruminal.

2. Evaluar la capacidad de los aislamientos de modular la fermentación *in vitro* mediante el análisis de la concentración de AGV, pH, formación de metano y cinética de producción de gas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Medios de cultivo, manipulaciones y condiciones de trabajo

Los frascos contenedores de medio de cultivo, soluciones buffer, y demás soluciones utilizadas en los ensayos, fueron gaseados con CO₂ por al menos 3 minutos y cerrados herméticamente con tapones de goma y precinto de aluminio. Para la transferencia de suspensiones bacterianas y soluciones se utilizaron jeringas estériles descartables, previamente lavadas con una solución reductora estéril de Na₂S-Cys (0,25 g/L). La solución reductora y soluciones buffer se prepararon con agua destilada previamente hervida por 10 minutos.

Para el crecimiento y mantenimiento de las cepas ruminales se utilizó un medio cuya composición se basa en el propuesto por Stahl (1988) y modificado por Fraga (2010), cuya composición se especifica en la Tabla 5.1. Para el mantenimiento prolongado de las cepas (-80°C) se utilizó el mismo medio adicionado con glicerol al 10%.

El medio de cultivo incluyó fluido ruminal clarificado (Tabla 5.1). Para ello se utilizó el fluido ruminal de una vaca Holstein a pastoreo con una cánula permanente en rumen que se encontraba alojada en el Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° latitud sur, 35° longitud oeste). El animal no estaba en lactación en el momento de la extracción. Antes de incluirlo en el medio del cultivo, el fluido ruminal obtenido del animal se centrifugó por 10 minutos a 1000 x g y luego el sobrenadante resultante se centrifugó por 20 minutos a 25000 x g (Grubb y Dehority, 1976).

Tabla 5.1 Composición del medio utilizado para el crecimiento de las bacterias ruminales

Ingrediente	Cantidad en 500 mL de medio de cultivo ⁺
Solución A ^a	83 mL
Solución B ^a	83 mL
Fluido ruminal clarificado ^b	100 mL
Extracto de levadura	250 mg
Triptona	250 mg
Glucosa	500 mg
Almidón	500 mg
Celobiosa	500 mg
Xilosa	500 mg
Maltosa	500 mg
Mezcla de ácidos grasos ^c	0,31 mL
Solución A de vitaminas ^d	0,01 mL
Solución B de vitaminas ^d	0,01 mL
Solución C de vitaminas ^{d*}	*
Resazurina	0,5 mg
Solución reductora ^e	*

^a Macy et al. 1982 La composiciones de las soluciones A y B fueron (concentraciones en g/L): NaCl 5,4, KH₂PO₄, 2,7, CaCl₂.2H₂O 0,159, MgCl₂.6H₂O 0,12, MnCl₂.4H₂O 0,06, CoCl₂.6H₂O 0,06, (NH₄)₂SO₄ 5,4 en la solución A y K₂HPO₄ 2,7 en la solución B

^b Grubb y Dehority, 1976.

^c Modificado de Macy et. al. 1982: acético 5,80 mM, propiónico 1,60 mM, butírico 0,86 mM, n-valérico 0,18 mM e isovalérico 0,18 mM, no contiene ác. isobutírico ni ác. DL-a-metilbutírico.

^d Modificado de Scott y Dehority, 1964. Stock Sol A: piridoxina clorhidrato 0,1 mg/mL, riboflavina 0,1 mg/mL, tiamina clorhidrato 0,1 mg/mL, nicotinamina 0,1 mg/mL, Ca-D- pantotenato 0,1 mg/mL y ác. p-aminobenzoico 5x10³ mg/mL. Stock Sol B: vitamina B12 0,25 mg/mL. Stock Sol C: ác. fólico 0,5 mg/mL, biotina 0,5 mg/mL. Stock de Sol C esterilizada por filtración.

^e Para 1L de solución stock se hirvió 1 L de H₂O durante 10 min, se enfrió bajo corriente de CO₂ y se añadieron a disolución 12,5 g de cisteína, se ajustó el pH a 9 con NaOH 12 M. Luego se agregaron 12,5 g de Na₂S y se sometió a saturación con CO₂ antes de autoclavar. Sulfuro-cisteína 0,5 g/L de medio Modificado de Alonso, 2001.

*Se añadieron 100 µL de la solución stock correspondiente a cada vial luego de autoclavado el medio.

+ pH ajustado a 6,5 con NaHCO₃

5.2 Identificación bacteriana

Se identificaron aislamientos pertenecientes al cepario del Departamento de Microbiología, IIBCE. Estos fueron obtenidos a partir del contenido ruminal de una vaca a pastoreo y se seleccionaron aquellos que crecieron en medio con celulosa como única fuente de carbono y energía. Para su identificación se amplificó y secuenció del gen que codifica para el ARNr 16S.

Se extrajo ADN genómico usando el *Gene Elute bacterial genomic DNA extraction kit* según las indicaciones del fabricante (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

Para la amplificación se utilizaron los cebadores universales para el Dominio *Bacteria* 27F (5'-AGATTGATCMTGGCTAGGGA-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Las mezclas de PCR consistieron en 2,5 μ L de buffer de ADN polimerasa (10X), 0,5 μ L de una mezcla de dATP, dCTP, dTTP y dGTP (10 mM de cada uno), 0,3 μ L de cada cebador (15 mM), 2 μ L de ADN, 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM) y 0,2 μ L de *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brasil, 5U/ μ L) en un volumen final de 25 μ L. El programa de PCR consistió de un ciclo inicial de 94°C durante 3 minutos.; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y 30 segundos y un ciclo final a 72°C por 10 minutos (Fraga et al. 2008) Las reacciones se realizaron en un termociclador (T1, Biometra, Alemania) y los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8 %) teñido con bromuro de etidio (concentración final 1 μ g/mL). Los productos de PCR fueron secuenciados por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur.

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias publicadas en dos bases de datos. Se utilizó la herramienta *Classifier* del *Ribosomal Database Project* (RDP) para comparar las secuencias con aquellas incluidas en esa base de datos (Wang et al. 2007) y también se utilizó la base de datos del *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando la herramienta BLASTn con el fin de determinar la afiliación de los aislamientos (Altschul et al. 1997).

5.3 Ensayos *in vitro*

Para evaluar la capacidad de modular la fermentación de los aislamientos seleccionados se realizaron ensayos *in vitro* según la metodología de Theodorou et al. (1994), modificada por Mauricio et al. (1999). Los criterios de selección de las cepas a utilizar se basaron en características observadas en ensayos anteriores, tales como crecimiento abundante a 24 y 48 h e identidad relacionada con microorganismos potencialmente fibrolíticos (celulolíticos y hemicelulolíticos). Tres de las siete cepas utilizadas en este ensayo fueron evaluadas en ensayos *in vitro* anteriores y se eligieron para este trabajo por inducir un gran aumento en la concentración de ácido butírico a las 96 horas de incubación (Fraga 2010).

Se utilizaron frascos de 125 mL de capacidad que contenían 500 mg de sustrato molido y seco. El sustrato consistió de fardo de alfalfa:maíz en una relación de 70:30. A los frascos, que ya contenían el sustrato, se les agregaron 38 mL de una solución salina basal, 2 mL de bicarbonato de sodio (0.77 M) que cumplía la función de saliva artificial (Oeztuerk et al. 2005) y 0.5 mL de solución reductora (0.085 M). La solución salina basal se componía de KCl (0.21 M), NaCl (0.27 M), CaCl₂·2H₂O (0.036 M), MgSO₄·7H₂O (0.053 M), MnCl₂·4H₂O (0.033 mM), FeSO₄·7H₂O (0.019

mM), ZnCl₂ (0.048 mM), CuCl₂·2H₂O (0.039 mM), CoCl₂·6H₂O (0.055 mM), SeO₂ (0.12 mM), NiCl₂·6H₂O (0.28 mM), Na₂MoO₄·2H₂O (0.3 mM), NaVO₃ (0.068 mM), H₃BO₃ (1.06 mM) y hemina (0.04 mM). Previo a la inoculación con los probióticos y agregado de fluido ruminal se dejó que los sustratos se hidrataran por 18 hs a 4 °C.

Una vez hidratados los sustratos, se extrajo contenido ruminal fresco de una vaca con cánula ruminal (mencionada en la sección 5.1) que fue filtrado por paño de quesería, e inmediatamente sometido al gaseado con CO₂ para el mantenimiento de las condiciones anaerobias. Se colocaron 10 mL de fluido ruminal bajo corriente continua de CO₂ en cada frasco que luego fue gaseado con CO₂ y cerrado herméticamente con tapón de goma y precinto de aluminio. Luego los frascos fueron inoculados con una suspensión de las cepas de forma que se alcanzara una concentración de 10⁶ células/mL en los fermentadores. Se realizaron controles que contenían todos los componentes pero no se inocularon con probióticos, y blancos que contenían solo el sustrato y las soluciones buffer. En todos los casos las incubaciones fueron realizadas por triplicado. Las cepas utilizadas se detallan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Identidad de las cepas utilizadas en el ensayo *in vitro*.

Cepa	Identidad	% Identidad	Número de acceso	Fuente
4C63C	<i>Butyrivibrio hungatei</i> *	99%	AY178635	Fraga, 2010
3F21C	<i>Lachnospiraceae</i> , no descrito +	-	-	Fraga, 2010
4C50C	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> *	99%	AF202262	Fraga, 2010
4C56CA	<i>Lachnospiraceae</i> , no descrito +	-	-	Este trabajo
4C79CA	<i>Butyrivibrio hungatei</i> *	99%	AY178635.1	Este trabajo
4C58CA	<i>Butyrivibrio sp+</i>	-	-	Este trabajo
4C55C	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> *	99%	AF202262	Fraga, 2010

*Se presentan los números de acceso del pariente más cercano en la base de datos del GenBank del NCBI. +Según la base de datos del RDP

Los fermentadores se incubaron en baño de agua a 39°C y a los tiempos 2, 4.5, 7.5, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h se midió la presión interior con un manómetro D1005PS (Ashcroft[®], Stratford, USA) y aguja hipodérmica 0.6 mm. Luego de la realizada la medición se liberó la presión de gas hasta igualar con la presión atmosférica y se agitaron para continuar la incubación hasta la siguiente medición. La presión de gas (P) expresada en psi se convirtió a volumen (V) en mL a partir de la relación $V = 4,40.P + 0,09.P^2$ deducida en un experimento realizado en las mismas condiciones que este ensayo (Britos et al. 2008). Los volúmenes de gas generados en los fermentadores blanco se restaron a todos los frascos en las horas correspondientes. Con el objetivo de estudiar la cinética de formación de gas, los datos de volumen de gas calculado se ajustaron al modelo logístico bicompartimental propuesto por Schofield et al. (1994):

$$Vol = \frac{V_{fr}}{1 + e^{2+4k_{dr}(L-T)}} + \frac{V_{fl}}{1 + e^{2+4k_{dl}(L-T)}}$$

dónde Vfr representa el volumen de gas formado por la degradación rápida expresada en mL/g sustrato incubado, Kdr es la tasa de formación de gas en la fase de degradación rápida expresado en h⁻¹, Vfl representa el volumen de gas formado en la fase lenta de degradación expresada en mL/g sustrato incubado, Kdl es la tasa de formación de gas en la fase de degradación lenta expresado en h⁻¹ y L representa el tiempo de latencia de producción de gas expresado en h. También se calculó el volumen total de gas formado (Vt) como la suma entre Vfr y Vfl.

5.4 Perfil de ácidos grasos volátiles y pH en los fermentadores

Con el fin de evaluar el efecto modulador de las cepas sobre la fermentación se midió el pH del contenido de los fermentadores y se tomaron muestras para determinar la concentración de AGV a distintos tiempos. A las 4, 8 y 96 horas se abrió una serie de fermentadores, se midió el pH y se obtuvo una muestra de 500 µl del contenido para determinar la concentración de ácido acético, propiónico, butírico y láctico. Cada muestra se conservó con 500 µl de ácido perclórico 0.1M y se congeló inmediatamente (-20 °C) hasta su utilización. Se determinó la presencia y concentración de estos ácidos por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Las muestras se centrifugaron (15000 rpm, 15 minutos, 5°C) y se inyectaron 100 µL de cada sobrenadante en un equipo HPLC modular Waters, compuesto por una bomba binaria, detector de arreglo de diodos (rango 210 a 500 nm) e inyector automático. Se utilizó una columna C18 (modelo LUNA, Phenomenex, USA) de 250 x 46 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de poro de 150 Å. La fase móvil fue inyectada con un flujo de 1 mL/min y consistió de un gradiente de acetonitrilo (2% a 90%) y H₃PO₄ 0,5%, pH 2. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Se determinaron los tiempos de retención de los ácidos láctico, acético, butírico y propiónico, por medio de la inyección de estándares (0,5 µg/mL) que también se usaron como referencia para calcular las concentraciones de estos ácidos en las muestras. Los picos de interés en los cromatogramas se integraron a 210 nm (Parrott et al. 2001). Estos procedimientos fueron realizados en el Departamento de Neuroquímica, IIBCE.

5.5 Formación de metano

A las horas 4, 8 y 96 se extrajeron muestras de gas de los fermentadores para la cuantificación de metano. Las extracciones de gas se realizaron luego de la medida de presión que correspondía a esa hora y antes de la liberación del gas acumulado. La muestra se obtuvo con un dispositivo que contaba de una válvula de dos salidas y que contenía una aguja que se

insertaba en el fermentador. En una de las salidas se conectaba una jeringa para medir volumen extraído, y en la otra un tubo Vacutainer[®] donde se inyectaba el gas de la jeringa. Para la medida de concentración de metano se contrataron los servicios de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química. Se utilizó un cromatógrafo de gases SRI 8610, de SRI Instruments[®] con detector de conductividad térmica y Argón como gas carrier.

5.6 Análisis estadístico

Para ajustar los datos de volumen de gas al modelo propuesto por Schofield et al. (1994) se utilizó el paquete estadístico del SAS (SAS Institute, Cary, USA, 2000).

Para las variables de producción de gas *in vitro* Vfr, Kdr, Vfl, L y Vt se aplicó un procedimiento GLM utilizando el SAS y aplicando del siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + e_{ijk},$$

dónde μ es la media general, C_i es el efecto fijo de la incorporación de la cepa y e_{ijk} es el error residual.

Para estos datos se utilizó el test de Dunnet para comparar con los datos del control. En todos los casos se aceptaron como diferencias significativas valores de $p \leq 0.05$.

Los datos de concentración de AGV, A/P y pH fueron analizados en el programa PAST (Hammer et al. 2001), en el cual se realizó un ANOVA y el test de Tuckey como test *a posteriori* para conocer entre qué tratamiento existían diferencias. En todos los casos se aceptaron como diferencias significativas valores de $p \leq 0.05$.

Dado que los datos de concentración de metano y los de Kdl no presentaron una distribución normal, se utilizó el test estadístico de Kruskal-Wallis para comparar los datos, y el test de Mann-Whitney como test *a posteriori* utilizando el programa PAST (Hammer et al. 2001). En ambos casos se aceptaron como diferencias significativas valores de $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de los aislamientos

Algunas de las cepas aisladas en trabajos anteriores fueron identificadas en esta instancia, mediante la amplificación y posterior secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. A partir de la comparación con las bases de datos del NCBI y del RDP se identificaron las cepas 4C56CA, 4C58CA y 4C79CA (Tabla 5.2). La cepa 4C79CA presentó una homología del 99% con la especie *Butyrivibrio hungatei*, según la base de datos del NCBI. Con las secuencias disponibles en la base de datos del RDP se logró determinar que la cepa 4C58CA pertenecía también al género *Butyrivibrio*, pero no se encontraron secuencias de especies conocidas que tuvieran alta homología con su secuencia. En cuanto a la cepa 4C56CA, se encontró que pertenecía al filo *Lachnospiraceae*, pero el género no ha sido descrito hasta el momento. Esta cepa presentó un porcentaje de homología con la cepa 3F21C del 99%.

6.2 Evaluación de los parámetros de producción de gas

En la Figura 6.1 se muestra la variación del volumen de gas acumulado a lo largo del tiempo para los siete tratamientos y el control. Todos los frascos se ajustaron al modelo bicompartimental con $p \leq 0.05$, y se obtuvieron los valores de los parámetros de formación de gas, que fueron comparados mediante el procedimiento GLM. Se utilizó el test de Dunnet como test *a posteriori* para comparar los resultados con el tratamiento control ($p \leq 0.05$). Para los datos de Kdl se utilizó el test de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$), ya que los mismos no presentaron una distribución normal. En la Tabla 6.1 se muestran los resultados de este análisis.

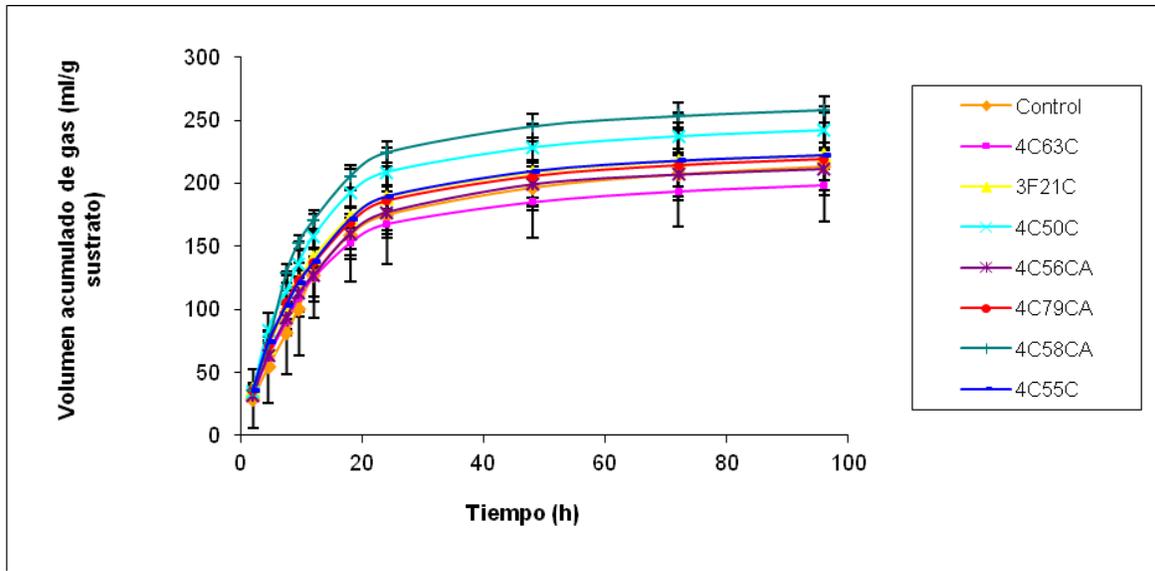


Fig 6.1 Curvas de Volumen/g de sustrato incubado en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados y su desvío estándar

Tabla 6.1. Valores de los parámetros de formación de gas según el modelo bicompartimental.

Cepa	Vfr (mL/g)	Kdr (h ⁻¹)	L (h)	Vfl (mL/g)	Kdl (h ⁻¹)x 10 ⁻² (b)	Vt (mL/g)
Control	77,37	0,071	0,75	29,47	1,55	106,83
4C63C	51,66	0,093	0,13	45,56	3,00	97,23
3F21C	74,8	0,074	-0,39	35,18	2,15	109,98
4C50C	55,9	0,18*	0,87	62,46*	3,55	118,37
4C56CA	39,55	0,140	0,81	63,57*	3,56	103,11
4C79CA	43,26	0,150	0,74	63,54*	3,63	106,80
4C58CA	63,8	0,130	1,43	62,71*	3,64	126,51
4C55C	37,29*	0,150	0,64	71,13*	3,85	108,42
ESM ^(a)	4,06	0,01	0,21	3,71		2,54
p ^(c)	0,0416	0,029	0,6382	0,0077	0,0232 ^(d)	0,097

Los resultados se expresan como las medias de cada parámetro y para cada tratamiento. ^(a)ESM, Error estándar de las medias (24 observaciones). Medias con asterisco son significativamente diferentes al control de acuerdo al Test de Dunnett, $p \leq 0,05$. ^(b) Los resultados se expresan como medianas. En todos los casos los $p > 0,05$ de acuerdo al Test de Mann-Whitney. ^(c) Valor de p del GLM para cada parámetro. ^(d) Valor de p del Test Kruskal-Wallis.

Con respecto a la fase lenta de formación de gas, las cepas 4C50C, 4C56CA, 4C79CA, 4C58CA y 4C55C indujeron un aumento significativo en Vfl, pero en ninguno de los tratamientos se observaron cambios significativos en Kdl. En cuanto a la fase rápida de formación de gas, la cepa 4C50C presentó un aumento en Kdr y la cepa 4C55C presentó una disminución de Vfr. En

ninguna de las cepas se observan diferencias significativas en la fase de latencia (L) y en el volumen total de gas formado (Vt).

6.3 Cuantificación de ácidos grasos volátiles

Los ácidos acético, propiónico y butírico, relevantes para la evaluación del efecto modulador de cada cepa, se cuantificaron mediante HPLC. Se analizó la concentración inicial de los AGV por duplicado en fermentadores que no fueron inoculados con ninguna de las cepas. En esa condición no se detectó ácido butírico y las concentraciones de los ácidos acético y propiónico fueron de 16.15 mM y 4.11 mM, respectivamente. La concentración de AGV totales fue de 20.26 mM y la relación A/P fue de 3.92. En ningún caso se detectaron niveles apreciables de ácido láctico.

Tiempo 4

A tiempo 4 h el perfil de los AGV analizados fue variable y hubo diferencias significativas en todos ellos y en la relación A/P (Tabla 6.2). Con respecto al ácido acético y AGV totales, en todas las cepas menos la 4C58CA se observó una disminución significativa de su concentración en relación al control. Lo mismo sucedió con el butírico para las cepas 4C63C, 3F21C, 4C56CA y 4C55C. En cuanto al ácido propiónico solo el tratamiento con la cepa 4C55C presentó una disminución significativa. La relación A/P disminuyó en todos los tratamientos.

Tabla 6.2. Medias de concentración de AGV (mM) y relación A/P a las 4 horas de fermentación.

Cepa	Acético	Propiónico	Butirico	Total	A/P
Control	41,18	14,28	3,98	59,44	2,89
4C63C	24,41*	11,03	0,74*	36,18*	2,22*
3F21C	27,90*	10,90	1,09*	39,89*	2,57*
4C50C	28,82*	11,55	3,61	43,98*	2,49*
4C56CA	31,48*	12,27	1,82*	45,57*	2,57*
4C79CA	27,58*	11,16	2,71	41,44*	2,47*
4C58CA	38,14	16,14	3,41	57,69	2,36*
4C55C	24,46*	9,76*	1,13*	35,35*	2,53*
ESM ¹⁾	1,36	0,49	0,28	2,00	0,04

Se muestran las medias de cada cepa para cada parámetro.¹⁾ ESM, Error estándar de las medias (24 observaciones). * En una misma columna medias son significativamente diferentes al control, $p \leq 0,05$.

Tiempo 8

La concentración de AGV al tiempo 8 fue más homogénea al compararla con el control y se observó que el agregado de la cepa 4C50C indujo un aumento significativo en la concentración del ácido butírico (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Medias de concentración de AGV (mM) y relación A/P a las 8 horas de fermentación

Cepa	Acético	Propiónico	Butírico	Total	A/P
Control	37,10	15,55	3,34	55,99	2,38
4C63C	29,18	12,51	2,21	43,90	2,33
3F21C	37,16	13,56	2,51	50,81	2,55
4C50C	43,81	15,68	6,69*	66,18	2,82
4C56CA	37,32	13,69	3,86	54,86	2,71
4C79CA	31,97	12,91	3,28	48,16	2,46
4C58CA	41,56	17,71	3,78	63,05	2,35
4C55C	30,59	12,35	1,83	44,77	2,49
ESM ¹⁾	1,50	0,55	0,33	2,26	0,05

Se muestran las medias de cada cepa para cada parámetro. ¹⁾ ESM, Error estándar de las medias (24 observaciones). Medias con asterisco son significativamente diferentes al control, $p \leq 0,05$.

Tiempo 96

Al analizar las concentraciones de AGV a las 96 h se pudo observar que en general no hubo diferencias salvo por el agregado de la cepa 4C79CA que indujo una disminución significativa en la relación A/P (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Medias de concentración de AGV (mM) y relación A/P a las 96 horas de fermentación

Cepa	Acético	Propiónico	Butirico	Total	A/P
Control	52,10	19,38	2,54	74,01	2,67
4C63C	40,97	15,84	7,25	64,05	2,59
3F21C	49,41	18,78	7,94	76,12	2,63
4C50C	52,69	19,97	6,32	78,99	2,63
4C56CA	59,84	23,54	10,28	93,65	2,54
4C79CA	60,94	25,92	7,99	94,85	2,34*
4C58CA	54,02	21,87	8,89	84,77	2,49
4C55C	60,15	24,07	6,34	90,57	2,52
ESM ¹⁾	2,19	0,96	0,66	3,49	0,03

Se muestran las medias de cada cepa para cada parámetro. ¹⁾ ESM, Error estándar de las medias (24 observaciones). Medias con asterisco son significativamente diferentes al control, $p \leq 0,05$.

Concentración de AGV en el tiempo

Al comparar la evolución temporal de las concentraciones de AGV de cada tratamiento a lo largo del experimento, se pudo observar que en el control no hubo diferencias significativas en las concentraciones de los ácidos acético, propiónico y AGV totales entre los tres tiempos estudiados. Sin embargo se registró una disminución significativa en la concentración de ácido butírico a las 96 horas y de la relación A/P a las 8 horas. Los tratamientos se comportaron de manera diferente entre sí, pero en todos se observó un aumento en la concentración de ácido acético en alguno de los tiempos estudiados, y esto se vio reflejado en un aumento del total de AGV a ese mismo tiempo. Los tratamientos con las cepas 3F21C, 4C56CA y 4C55C presentaron aumentos para todos los ácidos en alguno de los tiempos estudiados, y los restantes tratamientos (4C63C, 4C50C, 4C79CA y 4C58CA) presentaron algún AGV que no varió con el tiempo. Estos fueron el butírico y/o el propiónico. Ninguna de los tratamientos presentó cambios significativos en la relación A/P a lo largo la evolución del período experimental. Los resultados se presentan en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Concentración de AGV (mM) y relación A/P en los diferentes tiempos.

		Control	4C63C	3F21C	4C50C	4C56CA	4C79CA	4C58CA	4C55C
ACÉTICO	T4	41,18 a	24,41 a	27,90 a	29,28 a	31,48 a	27,58 a	38,14 a	24,46 a
	T8	37,10 a	29,18 ab	37,16 b	42,84 b	37,32 a	31,97 a	41,55 a	30,59 a
	T96	52,10 a	40,97 b	49,41 c	48,54 b	59,84 b	60,94 b	54,02 b	60,15 b
PROPIÓNICO	T4	14,40 a *	11,43 a *	10,90 a	11,55 a	12,27 a	11,16 a	16,14 a	9,76 a
	T8	14,88 a *	12,66 a *	14,31 b	15,68 ab	13,67 a	12,91 a	17,71 a	12,35 a
	T96	21,17 a *	14,38 a *	18,78 c	19,97 b	23,54 b	25,92 b	21,87 a	24,07 b
BUTIRICO	T4	3,87 a	0,74 a *	1,09 a	3,61 a	1,82 a	2,75 a *	3,40 a *	1,13 a
	T8	3,62 a	2,31 a *	2,71 a	6,69 a	3,86 a	3,68 a *	3,73 a *	1,83 a
	T96	2,50 b	7,49 a *	7,94 b	6,32 a	10,27 b	8,01 a *	8,85 a *	6,34 b
TOTAL APB	T4	59,44 a	36,68 a	39,89 a	44,17 a	45,57 a	41,44 a	57,69 a	35,35 a
	T8	55,99 a	43,37 ab	54,18 b	65,05 b	54,86 a	48,16 a	63,05 a	44,77 a
	T96	74,01 a	59,54 b	76,12 c	70,99 b	93,65 b	94,85 b	84,77 b	90,57 b
A/P	T4	2,89 a	2,26 a	2,57 a	2,52 a *	2,57 a	2,47 a	2,38 a	2,53 a
	T8	2,38 b	2,22 a	2,59 a	2,65 a *	2,71 a	2,46 a	2,31 a	2,49 a
	T96	2,67 ab	2,62 a	2,63 a	2,63 a *	2,54 a	2,34 a	2,61 a	2,52 a

Se presentan las medias de los valores concentración de AGV en los tiempos 4, 8 y 96 para cada cepa. Por cepa y por ácido, hay diferencias significativas entre los valores con diferentes letras. Las diferencias significativas son para un valor de $p \leq 0.05$ en el test de Tuckey. *Se presentan las medianas. Las diferencias significativas son para un valor de $p \leq 0.05$ en el test de Mann-Whitney

6.4 Análisis de pH

El pH del contenido de los fermentadores se midió a los tiempos 4, 8 y 96.

Tiempo 4

Al tiempo 4 h se observó que todos los tratamientos salvo 4C63C y 3F21C presentaron valores de pH significativamente mayores que el control (Figura 6.2).

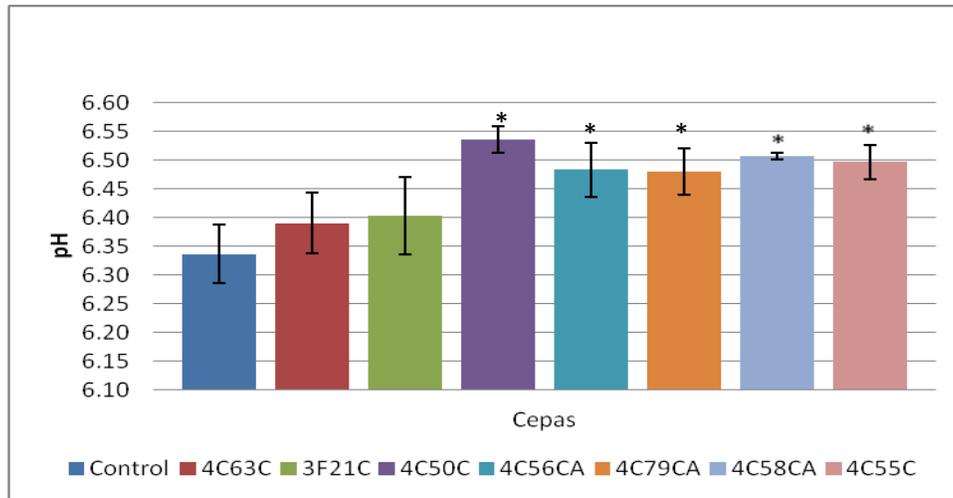


Fig 6.2 Valores de pH del contenido de los fermentadores a las 4 horas para cada uno de los tratamientos y el control. Los valores se presentan como medias con su respectiva desviación estándar. La presencia de un asterisco sobre la barra significa que existen diferencias significativas entre dicho tratamiento y el control según el test de Tuckey.

Tiempo 8

A las 8 horas de incubación no se registraron diferencias significativas entre el pH de los fermentadores suplementados con cepas bacterianas y el control (Figura 6.3).

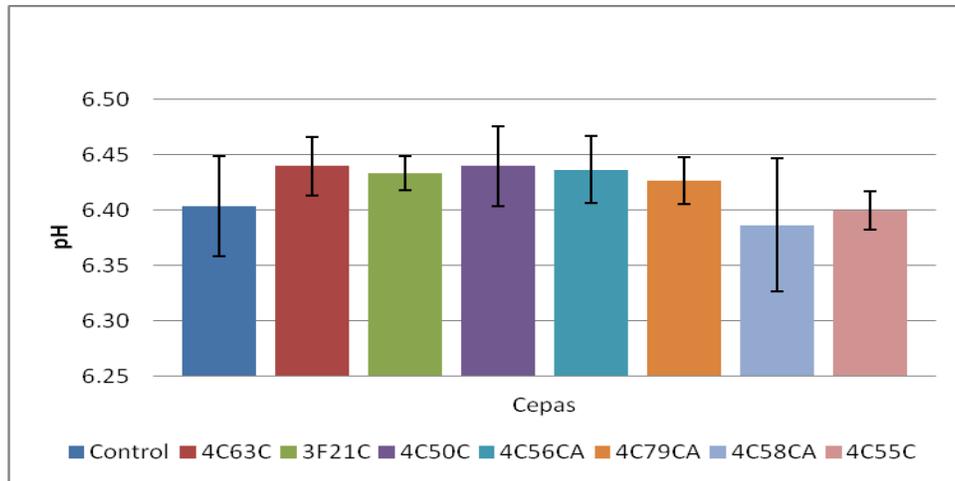


Fig 6.3 Valores de pH del contenido de los fermentadores a las 8 horas para cada uno de los tratamientos y el control. Los valores se presentan como medias con su respectiva desviación estándar. No se observaron diferencias entre los tratamientos y el control según el test de Tuckey.

Tiempo 96

En la Figura 6.4 se muestran los resultados a las 96 h de incubación. El tratamiento con la cepa 4C55C mostró un aumento significativo en el valor del pH con respecto al control.

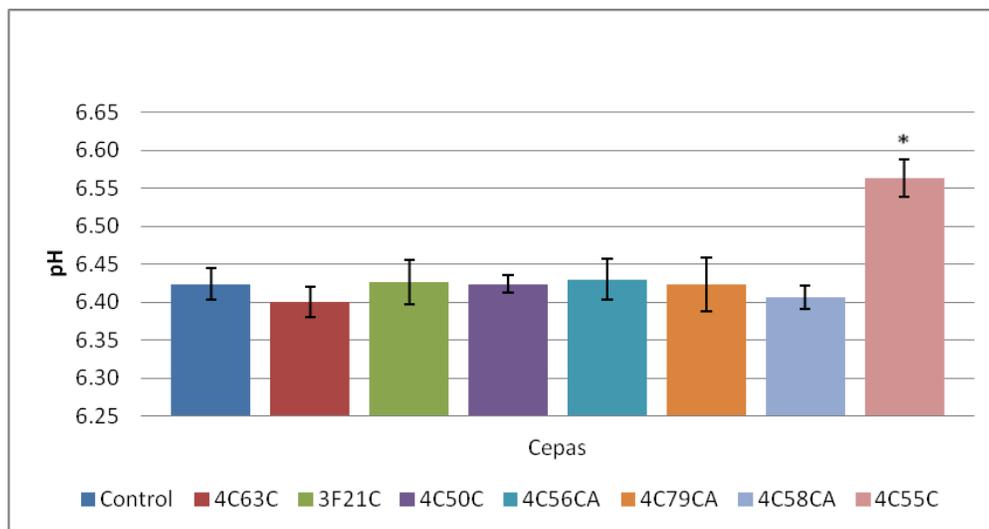


Fig 6.4 Valores de pH del contenido de los fermentadores a las 96 horas para cada uno de los tratamientos y el control. Los valores se presentan como medias con su respectiva desviación estándar. La presencia de un asterisco sobre la barra significa que existen diferencias significativas entre dicho tratamiento y el control según el test de Tuckey.

6.5 Cuantificación de metano

Dada la importancia del metano en el efecto invernadero y en la pérdida de energía y carbono para el rumiante, la producción de este gas se evaluó mediante su cuantificación en cromatografía de gases a las horas 4, 8 y 96. No se observaron diferencias significativas con el control para ningún tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras 6.5, 6.6 y 6.7 para los tiempos 4, 8 y 96, respectivamente.

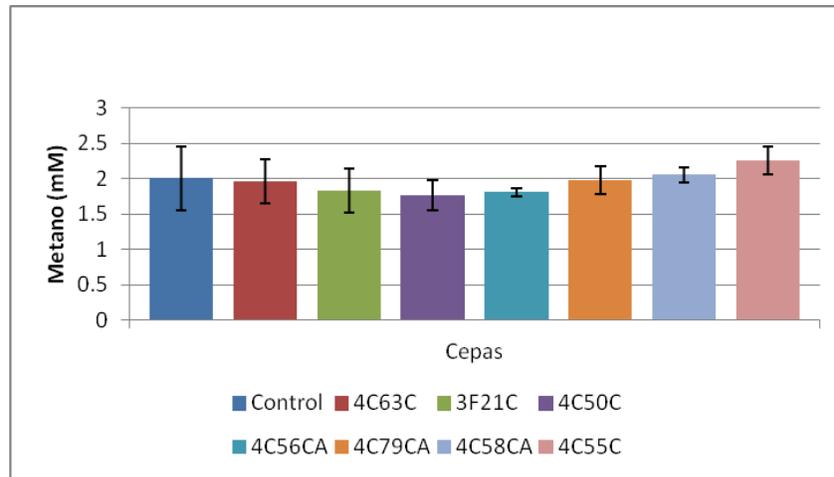


Fig 6.5 Concentración de metano (mM) a las 4 horas para el control y para los tratamientos. Los valores se presentan como medianas y para cada valor se presenta el promedio de los desvíos absolutos con respecto a la mediana. No se observan diferencias significativas con el control según el test de Mann-Whitney.

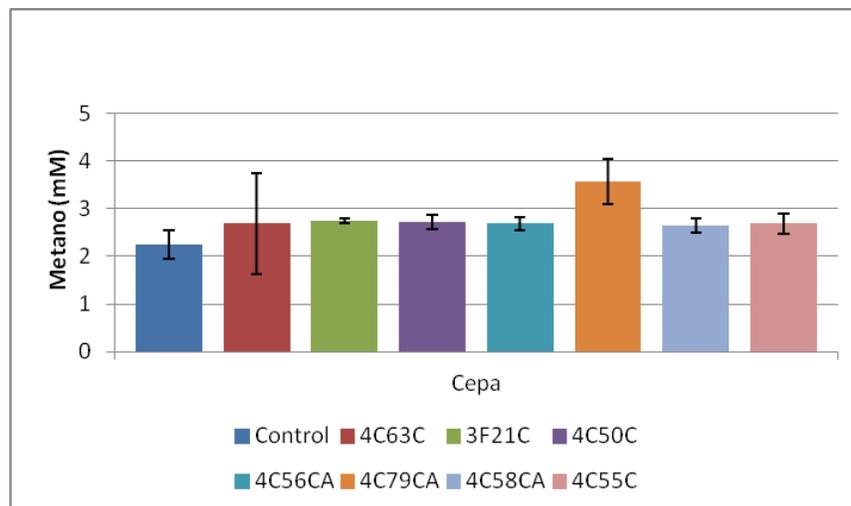


Fig 6.6 Concentración de metano (mM) a las 8 horas para el control y para los tratamientos. Los valores se presentan como medianas y para cada valor se presenta el promedio de los desvíos absolutos con respecto a la mediana. No se observan diferencias significativas con el control según el test de Mann-Whitney.

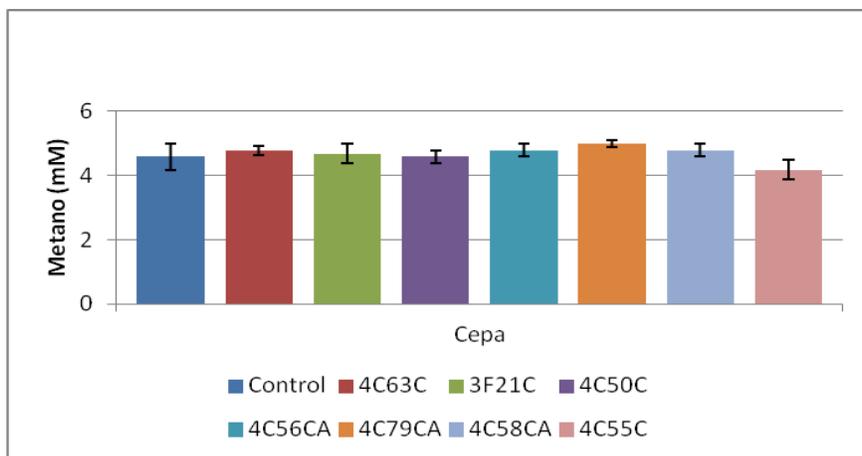


Fig 6.7 Concentración de metano (mM) a las 96 horas para el control y para los tratamientos. Los valores se presentan como medianas y para cada valor se presenta el promedio de los desvíos absolutos con respecto a la mediana. No se observan diferencias significativas con el control según el test de Mann-Whitney.

7. DISCUSIÓN

La microbiota ruminal juega un papel vital en la nutrición y bienestar de los rumiantes. Los microorganismos forman una unidad ecológica altamente integrada entre ellos y el rumiante, representando la fuente de proteína más importante para el animal y permitiendo la utilización de polisacáridos estructurales vegetales como fuente de energía. Esta comunidad puede ser una fuente de microorganismos probióticos potencialmente capaces de modular y mejorar los procesos fermentativos que se dan en el rumen. En este trabajo, se identificaron cepas aisladas de contenido ruminal por medio de la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. Luego, con el fin de evaluar el potencial modulador de la fermentación de los aislamientos, se realizó una aproximación *in vitro* en fermentadores que simulan el ambiente ruminal.

7.1 Identificación de los aislamientos

Las identidades de las cepas aisladas en este estudio fueron determinadas a partir de la comparación con las bases de datos NCBI y RDP. Todas las bacterias identificadas han sido descritas previamente como integrantes de la microbiota del rumen y se relacionan con microorganismos fibrolíticos anaerobios.

Los microorganismos del género *Butyrivibrio* representan una proporción importante de las bacterias cultivables del rumen (10-30%) (Forster et al. 1996). Cepas pertenecientes a este género poseen diversas características que podrían tener efectos beneficiosos en el tracto digestivo. Producen ácido butírico a partir de diferentes sustratos y sintetizan enzimas hidrolíticas importantes para la degradación eficiente del alimento, como xilanasas, amilasas y celodextrinasas (Cepeljnik et al. 2003, Kopečný et al. 2003). La mayoría son capaces de utilizar un gran espectro de monómeros y polímeros de azúcares (Kopečný et al. 2003) y producir bacteriocinas, últimamente muy estudiadas para el control de patógenos (Cepeljnik et al. 2003). Además se cree que las bacterias de este género son de las pocas que existen en el rumen capaces de producir ácido linoleico conjugado (CLA) durante la biohidrogenación del ácido linoléico. El CLA muestra efectos anticancerígenos y podría regular el metabolismo energético resultando en la reducción de grasa corporal y aumentando así la masa corporal magra (Pariza et al. 1999).

En el rumen existen bacterias semejantes a *Butyrivibrio* (“*Butyrivibrio*-like organisms”), que pueden llegar a representar entre el 24 y el 30% de los microorganismos cultivables del ambiente ruminal (Forster et al. 1996). Su denominación *Butyrivibrio*-like organisms surge debido que comparten muchas características fenotípicas y metabólicas con *Butyrivibrio*

fibrisolvens, y muchos microorganismos productores de ácido butírico han sido clasificados dentro de este grupo a pesar de su vasta diversidad y sin tener en cuenta la relación filogenética (Kopečný et al. 2003). Por ejemplo, en 1996, van Gylswik et al. (1996) describieron por primera vez a *Pseudobutyrvibrio ruminis*, un aislamiento que se asemejaba fenotípicamente a *B. fibrisolvens*, pero las grandes diferencias filogenéticas encontradas justificó la denominación de *Pseudobutyrvibrio* como un nuevo género (van Gylswik et al. 1996).

Para la elección de las cepas utilizadas en este ensayo se tomó en cuenta el hecho que microorganismos del género *Butyrvibrio* y de *Pseudobutyrvibrio* han sido descritos como integrantes de los denominados consorcios fibrolíticos. En estos existen asociaciones entre microorganismos que se complementan funcionalmente para llevar a cabo la degradación eficiente de la fibra (McAllister et al. 1994). Se pueden encontrar microorganismos fibrolíticos y no fibrolíticos que aceleran el proceso de digestión por el consumo o apartamiento de productos de degradación de la fibra (Shinkai et al. 2010).

Dos de los aislamientos presentaron homología con secuencias depositadas en los bancos de datos como bacterias aún no cultivadas. El aislamiento 4C56CA presenta un porcentaje de homología de 99% con la cepa 3F21C y ambas se clasificaron en la familia *Lachnospiraceae* del Orden Clostridiales (Clase *Clostridia* del Filo *Firmicutes*). Dentro de esta familia de microorganismos se encuentran géneros importantes y asociados con funciones fibrolíticas como *Butyrvibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, mencionadas anteriormente.

7.2 Modulación de la fermentación ruminal

Con el objetivo de evaluar el potencial efecto probiótico de las cepas seleccionadas, se realizó un estudio *in vitro* en el cual se estudiaron determinados parámetros relacionados con la fermentación. Uno de esos parámetros fue la cinética de producción de gas y la producción total de gas, utilizando el modelo matemático presentado por Schofield et al. (1994).

La fase lenta de formación de gas se atribuye a la degradación de los alimentos que se fermentan más lentamente, como la fibra insoluble. Si bien no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores de Kdl (tasa de fermentación de la fase lenta) de los tratamientos y el control, los tratamientos con las cepas 4C56CA, 4C79CA, 4C58CA y 4C55C mostraron valores de p entre 0.05 y 0.1, lo cual podría indicar una tendencia a aumentar la tasa de fermentación de la fase lenta. Por lo tanto, el aumento significativo de Vfl y la posible tendencia a aumentar Kdl en los tratamientos con las cepas 4C56CA, 4C79CA, 4C58CA y 4C55C podría deberse a una mayor efectividad y rapidez en la degradación de dichos alimentos.

Si bien no se han encontrado en la literatura estudios similares basados en la suplementación con bacterias, esta aproximación se ha empleado para evaluar otros agentes potencialmente

moduladores de la fermentación. Por ejemplo, en un estudio *in vitro* realizado por Colombatto et al. (2003) se obtuvieron mayores tasas de producción de gas cuando se agregaron enzimas fibrolíticas a los fermentadores, indicando un aumento en la fermentabilidad de los sustratos.

La fase rápida de formación de gas está relacionada a la digestión de los sustratos solubles fácilmente degradables como el almidón. El hecho de que la cepa 4C50C haya mostrado una mayor tasa de formación de gas en esta fase podría significar que tiene algún papel en la degradación de estos sustratos. La cepa 4C55C mostró una menor producción de gas en esta fase, por lo que se podría suponer que las vías metabólicas se hayan desviado a la formación de AGV o que se haya disminuido el proceso de fermentación en general. Como se puede observar en los resultados de AGV, esta cepa es la única que a la cual se asoció una menor concentración de los tres ácidos con respecto al control a las 4 horas, y por lo tanto podríamos suponer que en esta fase la fermentación no fue tan eficiente.

Los resultados de concentración de AGV en el tiempo 4 h fueron muy variados, pero en general se observó una disminución de la concentración de AGV total. Todos los tratamientos, menos el de la cepa 4C58CA, presentaron una menor concentración de AGV total y ácido acético que el control, lo cual concuerda con el hecho que el ácido acético se encuentra en una proporción de 70% con respecto a los demás AGV (Lana et al. 1998). La concentración de propiónico fue más homogénea entre todos los tratamientos presentando solo diferencias con el control el tratamiento con la cepa 4C55C, el cual presentó una menor concentración de este ácido. De esta manera, la relación A/P fue menor para todos los tratamientos, incluyendo el de la cepa 4C55C cuya concentración de propiónico fue menor que el control y el de la cepa 4C58CA que no presentó diferencias en la concentración de propiónico y acético con el control.

Con una menor relación A/P se podría esperar una disminución en la concentración de metano (Johnson y Johnson 1995), pero los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas de este parámetro con respecto al control. Dada la menor concentración de ácido acético y el mantenimiento de la concentración de propiónico que se observó de manera general en los tratamientos con relación al control, se podría suponer que las vías de fermentación se podrían haber desviado hacia la formación de ácido butírico o de gas, pero los resultados no concuerdan con esa suposición. Una posible explicación podría ser que las vías metabólicas se hayan desviado hacia el crecimiento microbiano, pero no se cuenta con la información suficiente como para comprobar esta hipótesis.

Se podría esperar que los resultados de pH se correlacionaran con la concentración de AGV. Cuando la formación de AGV es muy rápida, estos se acumulan y bajan el pH pudiendo causar el desorden metabólico denominado acidosis bovina (Tajima et al. 2000, Fernando et al. 2010). Todos los tratamientos, menos los de las cepas 4C63C y 3F21C, presentaron valores mayores de pH que el control, y de ellos todos excepto 4C58CA presentaron valores menores de AGV que el control. Los tratamientos con las cepas 4C63C y 3F21C no presentaron diferencias con el

control con respecto al pH, pero sí presentaron una menor concentración de ácidos grasos volátiles, lo cual indica que deben existir otros factores además de la concentración de los AGV estudiados que están afectando el valor de pH. El tratamiento con la cepa 4C58CA fue el único que no presentó diferencias con el control en cuanto a concentración de AGV y sin embargo mostró valores significativamente mayores de pH. Esto puede llegar a indicar que el tratamiento con esta cepa puede contribuir al mantenimiento del pH en los valores normales, lo que tiene un valor potencial en la prevención de la acidosis.

A las 8 horas de tratamiento los valores de pH y concentración de AGV fueron más homogéneos y semejantes al control. La única diferencia que hubo con respecto al control fue que el tratamiento con la cepa 4C50C presentó un aumento significativo en la concentración de ácido butírico. Este ácido es el que tiene mayor valor energético molar de los tres AGV más importantes formados en el rumen, y es muy importante para la síntesis de la grasa de la leche (Maynard et al. 1979, Chiba 2007). Además, tiene un efecto trófico sobre las células epiteliales, principalmente por la estimulación de la proliferación celular (Sakata y Yajima 1984). En cuanto al pH, no se encontraron diferencias significativas con el control, al igual que con los resultados de concentración de los otros AGV, y las concentraciones de metano.

A las 96 horas de tratamiento tampoco se observaron diferencias en las concentraciones de AGV con respecto al control, salvo por el tratamiento con la cepa 4C79CA, que presentó una menor relación A/P. Al igual que en la hora 4, no hubo concordancia de este resultado con el resultado de la concentración de metano, ya que no se observaron diferencias con el control. En cuanto al pH, solo el tratamiento con la cepa 4C55C indujo un mayor valor de pH en comparación con el control. Esta cepa presentó la misma concentración de AGV que el control, por lo que se habría que considerar otros factores en el fluido ruminal que afectarían el valor de pH. El hecho que esta cepa muestre un mayor valor de pH y la misma concentración de AGV, la hace muy interesante para seguir estudiándola como posible probiótico, ya que puede haber inducido cambios en el ambiente ruminal que lleven a un mantenimiento del pH, importante en la prevención de acidosis.

El hecho que en el control se mantuvieran constantes las concentraciones de AGV en los diferentes tiempos estudiados no se debió a que se haya detenido el proceso de fermentación, ya que se observó producción de gas en todos los tiempos, y el volumen total formado fue igual tanto para el control como para los tratamientos. Además, al igual que todos los tratamientos, el control presentó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la concentración de todos los ácidos con respecto a la concentración inicial de AGV de los fermentadores que no fueron inoculados con ninguna cepa. Una de las explicaciones podría ser que exista en el control un equilibrio entre la producción y el consumo de los AGV, que hace que se mantenga constante su concentración y que no se dio en los tratamientos con las cepas. En el control se registró una

menor concentración de ácido butírico a las 96 horas, y en este caso se podría inferir que el consumo de este ácido fue mayor que su producción.

Los tratamientos con las cepas 4C56CA 4C79CA, 4C58CA, 4C55C, no indujeron cambios significativos en la concentración de AGV totales entre las 4 y 8 horas de tratamiento, pero presentaron un aumento significativo entre las 8 y 96 horas. Esto se podría relacionar con el hecho que estas 4 cepas presentaron un aumento significativo de Vfl y una posible tendencia a aumentar Kdl, potencialmente relacionada con la fermentación de la fibra. De esta manera, estas cepas podrían haber inducido un aumento en la cinética de fermentación de la fibra insoluble, viéndose reflejado en la formación de gas y AGV a las 96 hs. Desafortunadamente no se cuentan con datos de concentración de AGV entre las 20 y las 96 horas, que ilustrarían el potencial efecto de los tratamientos sobre la cinética de formación de AGV durante ese período.

El tratamiento con 4C50C fue el único que presentó un aumento en la concentración de ácido acético y AGV totales entre las 4 y 8 horas. A su vez, esta cepa es la única que mostró una mayor tasa de formación de gas en la fase rápida, y una mayor concentración de ácido butírico a las 8 hs con respecto al control. Con estos resultados se puede concluir que el tratamiento con esta cepa podría favorecer la fermentación de sustratos solubles, ya sea el maíz que se utilizó como sustrato en el experimento, o aquellos sustratos solubles que podía contener el fluido ruminal. La rápida acumulación de AGV por la degradación de sustratos solubles puede llevar a una disminución del valor del pH, afectando la digestibilidad de la fibra (Russell et al. 2009). Por lo tanto, otra característica que hace a esta cepa interesante es el hecho que a pesar de su posible efecto sobre la fermentación de sustratos solubles, el valor del pH del fluido ruminal nunca fue significativamente menor al control.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que la administración de cepas ruminales nativas relacionadas filogenéticamente con organismos fibrolíticos es un camino promisorio para la modulación de la fermentación.

En general no se observaron diferencias notables en la concentración de los AGV entre los tratamientos y el control en los tiempos experimentales estudiados. Sin embargo, se observó que los tratamientos mostraron una cinética de fermentación diferente a la del control, presentando variaciones significativas en la concentración de AGV a lo largo del período de estudio.

Por otro lado, los tratamientos con las cepas 4C56CA, 4C79CA, 4C58CA y 4C55C aumentaron la formación de gas en la fase lenta y presentaron una posible tendencia a aumentar la tasa de formación de gas de esta fase, asociada a la degradación de la fibra insoluble. Estos cambios no se asociaron con una disminución significativa del pH ni con un aumento en la generación de metano y de volumen de gas total. Por lo tanto la pérdida de energía y carbono en forma de gas fue igual para estos tratamientos y el control.

A las 4 horas todos los tratamientos mostraron una relación A/P menor que aquella observada en el control, lo que implica una mayor producción de ácido propiónico en relación al acético, lo que conllevaría en un cambio positivo de acuerdo al papel del ácido propiónico en la gluconeogénesis.

Si bien no se puede inferir la existencia de un probiótico idóneo en esta colección de cepas, la cepa 4C50C provocó un aumento significativo de la concentración de ácido butírico, lo cual puede resultar interesante ya que este ácido es el que provee mayor energía por mol, es muy importante para la síntesis de la grasa de la leche, tiene un considerable efecto trófico sobre los epitelios, y está asociado a un mayor consumo de materia seca. Las cepas 4C56CA, 4C79CA, 4C58CA y 4C55C indujeron una mayor producción de gas en la fase lenta asociada a la digestión de la fibra insoluble y además, junto con la 4C50C, fueron las que presentaron un mayor valor de pH que el control a las 4 horas de tratamiento.

Futuros estudios sobre la estructura de la microbiota de los fermentadores a las horas 4, 8 y 96 aportarán mayor información sobre los cambios observados en estos sistemas. En un futuro se podrían seleccionar algunas de estas cepas y realizar un experimento para analizar la concentración y la cinética de AGV durante el período de tiempo definido como fase lenta de formación de gas. Además, se podría caracterizar la cinética del probiótico potencial y de la estructura de la comunidad microbiana a lo largo de ese lapso.

Es importante tener en cuenta que el ajuste de estas aproximaciones *in vitro* son fundamentales para poder seleccionar cepas para estudios *in vivo*, cuya realización se ve limitada por el esfuerzo y el costo que implican.

Este trabajo representa un paso más en la comprensión del potencial efecto que tendría la manipulación de la microbiota nativa para la mejora de la fermentación en rumiantes. Debido a la gran complejidad de la anatomía y la fisiología ruminal, las etapas que llevan a la dilucidación de los efectos de los probióticos son trabajosas aunque podrán ser de importancia para un aumento en el rendimiento animal y la producción ganadera.

9. AGRADECIMIENTOS

A Pablo Zunino, por darme la oportunidad de trabajar en este laboratorio.

A Martín Fraga, por su paciencia, confianza, apoyo y enseñanzas.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología del IIBCE.

A Estela, Alejandro y Federico. Por estar siempre.

A mis amigos. Mi otra familia.

Gracias.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup F, Seyfarth A, Emborg H, Pedersen K, Hendriksen R. 2001. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother* 45:2054-2059.
- Alonso C. 2001. Biodegradación anaerobia de residuos sólidos de curtiembre. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.
- Altschul S, Madden T, Schäfer A, Zhang J, Miller W, Lipman D. 1997. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Beuvink J, Kogut J. 1993 Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *J Anim Sci* 71:1041-1046.
- Britos A, Curbelo A, Pomiés N, Caramelli A, Antúnez M, Cajaraville C. 2008. Implementación de la técnica de producción de gas *in vitro* semiautomatizada en Uruguay: predicción del volumen de gas. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría.
- Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J. 2004. *Biología de los microorganismos*, Pearson Prentice Hall.
- Bryant M. 1959. Bacterial species of the rumen. *Bacteriol Rev* 23:125-159.
- Castejón F, Fraile A, Ponz F. 1979. *Fundamentos de Fisiología Animal*, EUNSA, Ediciones Universidad de Navarra.
- Carrillo L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Cap 5. Rumen y biogás. Universidad Nacional de Salta.
- Cepeljnik T, Zorec M, Kostanjsek R, Nekrep F, Marinsek-Logar R. 2003 Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* strain Mz5T suitable as a probiotic? An in vitro study. *Folia Microbiol* 48:339-345
- Cheng R, McCowan R, Costerton J. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *Am J Clin Nutr* 32:139-148
- Cheng K, Fay J, Howarth R, Costerton J. 1980. Sequence of Events in the Digestion of Fresh Legume Leaves by Rumen Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 40: 613-625
- Cheng K, Fay J, Coleman R, Milligan L, Costerton J. 1981. Formation of Bacterial Microcolonies on Feed Particles in the Rumen. *Appl Environ Microbiol* 41: 298-305.

- Cheng K, McAllister T, Popp J, Hristov A, Mir Z, Shin H. 1998. A review of bloat in feedlot cattle. *J Anim Sci* 76:299-308
- Chiba L. 2007. *Animal Nutrition Handbook*. College of Agriculture, Auburn University.
- Chiquette J, Allison M, Rasmussen M. 2008. *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *J Dairy Sci* 91:3536-543.
- Cho S, Cho K, Shin E, Lim W, Hong S, Choi B, Kang J, Lee S, Kim Y, Kim H, Yun H. 2006. 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *J Microbiol Biotechnol* 16:92-101.
- Colombatto D, Mould F, Bhat M, Morgavi D, Beauchemin K, Owen E. 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Anim Sci* 81:1040-1050.
- Dehority B, Grubb J. 1981. Bacterial population adherent to the epithelium on the roof of the dorsal rumen of the sheep. *Appl Environ Microbiol* 41:1424-1427.
- Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M. 2007. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Mol Biol Rep.* 35:265-74.
- Edwards J, Huws S, Joong Kim E, Kingston-Smith A. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol Ecol* 62:323–335.
- FAO /WHO. 2001. Joint FAO /WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food; Córdoba, Argentina.
- Fernando S, Purvis H 2nd, Najjar F, Sukharnikov L, Krehbiel C, Nagaraja T, Roe B, Desilva U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl Environ Microbiol* 76:7482-90.
- Flint H. 1997. The rumen microbial ecosystem -some recent developments. *Trends in Microbiology* 5:483-488.
- Forster R, Theater R, Gong J, Deng S. 1996. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol* 23:218-222.
- Fraga M, Perelmuter K, Delucchi L, Cidade E, Zunino P. 2008. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.

- Fraga M. 2010. Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.
- Frioni L. 2006. Microbiología Básica, Ambiental y Agrícola, Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República
- Grubb J, Dehority B. 1976. Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Environ Microbiol* 31:262-267.
- Gworgwor Z, Mbahi T, Yakubu B. 2006. Environmental Implications of Methane Production by Ruminants: A Review. *J Sustain Dev Agr Environ* 2:1-14.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm (Acceso 28/08/2012)
- Hespell R. 1987. Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. *Proc Nutr Soc* 46:407-413.
- Hill R, Wyse G, Anderson M. 2006 *Fisiología Animal*, 10ª ed., Editorial Médica Panamericana.
- Hoar W. 1978. *Fisiología General y Comparada*, Ediciones Omega.
- Huhtanen P, Seppälä A, Ots M, Ahvenjärvi S, Rinne M. 2008. In vitro gas production profiles to estimate extent and effective first-order rate of neutral detergent fiber digestion in the rumen. *J Anim Sci* 86:651-659.
- Hungate R. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. En J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press Inc., New York.
- Johnson K, Johnson D. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 73:2483-2492.
- Kardong K. 1999. *Vertebrados*, Mc Graw Hill Interamericana.
- Klieve A, Hennessy D, Ouwerkerk D, Forster R, Mackie R, Attwood G. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J Appl Microbiol* 95:621-30
- Kobayashi Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim Sci J* 77:375-385.

Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, Tanaka K. 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 229:23-30.

Koike S, Handa Y, Goto H, Sakai K, Miyagawa E, Matsui H, Ito S, Kobayashi Y. 2010. Molecular Monitoring and Isolation of Previously Uncultured Bacterial Strains from the Sheep Rumen. *Appl Environ Microbiol* 76: 1887–1894.

Kopečný J, Zorec M, Mrázek J, Kobayashi Y, Marin ek-Logar R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:201-209.

Krause D, Bunch R, Conlan L, Kennedy P, Smith W, Mackie R, McSweeney C. 2001. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. does not result in persistence, but changes in other microbial populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. *Microbiology* 147:1719-1729.

Krause D, Denman S, Mackie R, Morrison M, Rae A, Attwood G, McSweeney C. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev* 27:663-693.

Krehbiel C, Rust S, Zhang G, Gilliland S. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J Anim Sci* 81:E120-E132.

Kung L, Hession A. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J Anim Sci* 73:250-256.

Lana R, Russell J, Van Amburgh M. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76:2190-2196.

Larue R, Yu Z, Parisi V, Egan A, Morrison M. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environ Microbiol.* 7:530-543.

Lopez S, McIntosh F, Wallace R, Newbold C. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim Feed Sci Tech* 78: 1-9.

McAllister T, Bae H, Jones G, Cheng J. 1994. Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen. *J Anim Sci* 72:3004-3018.

Mackie R, White B. 1990. Symposium: Rumen Microbial Ecology and Nutrition, Recent Advances in Rumen Microbial Ecology and Metabolism: Potential Impact on Nutrient Output. *J Dairy Sci* 73:2971-2995.

- Mackie R, McSweeney C, Aminov R. 2001. Rumen, Encyclopedia of Life Sciences, Ed. Wiley-Blackwell.
- Macy J, Farrand J, Montgomery L. 1982. Cellulolytic and non-cellulolytic bacteria in rat gastrointestinal tracts. *Appl Environ Microbiol* 44:1428-1434.
- Martin S. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J Anim Sci* 76:3123-3132.
- Mauricio R, Mould F, Dhanoa M, Owen E, Channa K, Theodorou M. 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol* 79:321-330.
- Maynard L, Loosli J, Hintz H, Warner R. 1979. *Animal Nutrition*, seventh ed. McGraw Hill Publishing, New York.
- McCowan R, Cheng K, Bailey C, Costerton J. 1978. Adhesion of bacteria to the epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Appl Environ Microbiol* 35:149-155.
- Meissner H, Henning P, Horn C, Leeuw K, Hagg F, Fouché G. 2010. Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii*. *S Afr J Anim Sci* 40:79-100.
- Miller T, Wolin M. 1974. A serum bottle modification of the Hungate Technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985-987.
- Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci* 84:1294–1309.
- Montgomery L, Flesher B, Stahl D. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 38:430–436.
- Moss A, Jouany J, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech* 49: 231–253.
- Oeztuerk H, Schroeder B, Beyerbach M, Breves G. 2005. Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on in vitro ruminal microbial metabolism. *J Dairy Sci* 88:2594-600.
- Olubobokun J, Craig W. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J Anim Sci* 68:3360-3370.

Parizia M, Park Y, Cook M. 1999. Conjugated Linoleic Acid and the Control of Cancer and Obesity. *Toxicol Sci* 52:107-110.

Parrott T, Rehberger T, Owens F. 2001. Selection of *Propionibacterium* strains capable of utilizing lactic acid from in vitro models. *J Anim.Sci* 79:80.

Patterson H, Irvin R, Costerton J, Cheng K. 1975. Ultrastructure and Adhesion Properties of *Ruminococcus albus*. *J Bacteriol* 122:278-287.

Pitta D, Pinchak E, Dowd S, Osterstock J, Gontcharova V, Youn E, Dorton K, Yoon I, Min B, Fulford J, Wickersham T, Malinowski D. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb Ecol* 59:511-522.

Relling A, Mattioli G. 2003. *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.L.P.

Russell J, Wilson D. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J Dairy Sci* 79:1503-1509.

Russell J, Muck R, Weimer P. 2009. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiol Ecol* 67:183–197.

Rymer C, Huntington J, Williams B, Givens D. 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim Feed Sci Technol* 123-124:9-30.

Sadet-Bourgeteau S, Martin C, Morgavi D. 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Vet Microbiol* 146: 98-104.

Sakata T, Yajima T. 1984. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. *Q J Exp Physiol* 69:639-648.

Schofield P, Pitt R, Pell A. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J Anim Sci* 72:2980-2991.

Scott H, Dehority B. 1964. Vitamin requirements of several cellulolytic bacteria. *J Bacteriol.* 89:1169-1175.

Shinkai T, Ueki T, Kobayashi Y. 2010. Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *J Anim Sci* 81:72-79.

- Stahl D, Flesher B, Mansfield H, Montgomery L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 54:1079-1084.
- Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov R, Benno Y. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.
- Tajima K, Aminov R, Nagamine R, Matsui H, Nakamura M, Benno Y. 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67: 2766–2774.
- Theodorou M, Williams B, Dhanoa M, Mcallan A, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 48:185-197.
- Torres C, Zaragoza M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit* 16:109-12.
- Van Gylswyk N, Hippe H, Rainey F. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a Butyrate-Producing Bacterium from the Rumen That Closely Resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in Phenotype. *Int J Syst Evol Micr* 46:559-563.
- van Soest P. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press.
- Vinderola C, Medici M, Perdígón G. 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J Appl Microbiol* 96:230-243.
- Wallace R. 1994. *Ruminal Microbiology, Biotechnology, and Ruminant Nutrition: Progress and Problems*. *J Anim Sci* 72:2992-300.
- Wang Q, Garrity G, Tiedje J, Cole J. 2007. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261-5267.
- Weimer P, 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J Anim Sci* 76:3114-3122.
- Weimer P, Waghorn G, Odt L, Mertens D. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81:122-134.

Whitford M, Forster R, Beard C, Gong J, Teather R. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* 4:153-163.