

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIBROLÍTICAS
COMO POTENCIALES PROBIÓTICOS PARA
RUMIANTES

María Laura Rodríguez Martínez

Tutor: Dr. Pablo Zunino

Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable

Tesina de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

MONTEVIDEO, 2013

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

ÍNDICE

<u>1. Resumen</u>	<u>4</u>
<u>2. Introducción</u>	<u>5</u>
2.1 Los Rumiantes	5
2.2 Ecosistema Ruminal	9
2.3 pH ruminal	10
2.4 Metabolismo de los hidratos de carbono	11
2.5 Relación entre los AGV	15
2.6 Metabolismo de las proteínas	15
2.7 Bacterias celulolíticas	19
2.8 Bacterias hemicelulolíticas	30
2. 9 Bacterias amilolíticas	30
2.10 Bacterias que utilizan ácidos	32
2.11 Bacterias que utilizan azúcares solubles	34
2.12 Bacterias proteolíticas	34
2.13 Bacterias lipolíticas	36
2.14 Microorganismos metanogénicos	37
2.15 Protozoarios	40
2.16 Hongos	41
2.17 Probióticos	43
<u>3. Hipótesis</u>	<u>51</u>
<u>4. Objetivos</u>	<u>51</u>
<u>5. Materiales y Métodos</u>	<u>52</u>
5.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	52
5.2 Tratamiento de cepas celulolíticas a ensayar	53
5.3 Recuento bacteriano	54
5.4 Identificación molecular	54

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

5.5 Ensayo de fermentadores " <i>in vitro</i> " de cepas fibrolíticas con potencial probiótico	55
5.6 Lecturas de producción de gas	57
5.7 Procesamiento y análisis de datos	57
5.8 Recuento de microorganismos presentes en el inóculo por tinción con DAPI	58
<u>6. Resultados</u>	<u>59</u>
6.1 Identificación de las cepas potencialmente probióticas	59
6.2 Cuantificación del inóculo mediante tinción con DAPI	59
6.3 Producción de gas " <i>in vitro</i> "	61
<u>7. Discusión</u>	<u>70</u>
7.1 Cultivo e identificación de las cepas ruminales potencialmente probióticas	70
7.2 Producción de gas " <i>in vitro</i> "	71
7.3 Valores de pH	74
<u>8. Conclusiones y perspectivas</u>	<u>76</u>
<u>9. Agradecimientos</u>	<u>77</u>
<u>10. Bibliografía</u>	<u>78</u>

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

RESUMEN

Los rumiantes son animales de gran importancia económica debido a que aportan una sustancial fuente de proteínas para el consumo humano. En nuestro país la actividad ganadera es uno de los pilares de la economía nacional, lo que se puede apreciar en el hecho de que en el año 2011 la faena solo de bovinos fue de 1.866.238 (Memoria anual 2011/Dirección Gral. de Servicios Ganaderos/MGAP). Por esta razón generar nuevos conocimientos que aporten en esta área, es una tarea de fundamental importancia.

Debido a las distintas prácticas de alimentación, el ganado de producción puede sufrir cambios en las poblaciones microbianas presentes en el rumen, lo que puede disminuir la eficiencia con la cual el alimento es convertido en energía y por lo tanto disminuir la productividad.

La terapia antimicrobiana ha sido utilizada desde larga data en los sistemas de producción animal, pero sin embargo ha ido perdiendo aceptación, ya que este tipo de práctica aumenta el riesgo de resistencia antimicrobiana en los animales y por lo tanto puede constituir un factor de riesgo para la salud humana. Se plantea así la necesidad de buscar distintas opciones para paliar este problema, siendo los probióticos una alternativa eficaz debido a sus distintas aplicaciones.

En el presente trabajo se evaluó el potencial probiótico de cepas potencialmente fibrolíticas nativas del rumen para incrementar la eficiencia de la fermentación ruminal. Para ello se cultivaron y caracterizaron bacterias aisladas del rumen de un bovino, se identificaron a nivel molecular y se seleccionaron cinco cepas a ensayar. Luego se determinó la cinética de producción de gas y pH *in vitro*, en función del sustrato y el tiempo de incubación asociada a la adición de las cepas.

Se observó que el volumen de gas total producido fue mayor en aquellos fermentadores suplementados con la mezcla de dos cepas (4C50C+4C62C), en particular cuando los sustratos utilizados para la incubación fueron el xilano de avena y la paja de trigo. Se observaron diferencias en todos los parámetros de cinética de gases evaluados. Por ello concluimos que la inoculación de las cepas ensayadas y el tipo de sustrato incubado tuvo efecto sobre la fermentación *in vitro* llevada a cabo en el interior de los fermentadores.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Los rumiantes

Los rumiantes son animales capaces de digerir la celulosa, el polímero orgánico más abundante en el mundo, en base a una relación simbiótica entre poblaciones microbianas presentes en el rumen. Durante la fermentación ruminal, el alimento es convertido en ácidos grasos volátiles (AGV), amonio, metano, dióxido de carbono, material celular y calor. Los AGV son utilizados por el animal como principal fuente de energía, mientras que los microorganismos aportan la fuente principal de aminoácidos para la síntesis de proteínas. El amonio, metano y el calor, por el contrario, representan una pérdida tanto de energía como nitrógeno para el rumiante (Hobson, 1988).

Los rumiantes constituyen un grupo de animales herbívoros, con un estómago formado por cuatro compartimientos y que rumian un bolo alimenticio parcialmente digerido. Como ejemplos de animales rumiantes se pueden mencionar el ganado bovino, ovino y caprino, alces, ciervos, jirafas y búfalos (Prescott et al., 1999). Los compartimientos del estómago son denominados rumen, retículo, omaso y abomaso. Los tres primeros, llamados también preestómagos, se caracterizan por tener un epitelio no secretor, a diferencia de la cavidad gástrica propiamente dicha (abomaso), cuya mucosa es secretora y cumple prácticamente las mismas funciones que el estómago simple de los monogástricos, por lo que el contenido del rumen experimenta una digestión gástrica convencional sólo después de abandonarlo. A pesar de que los preestómagos carecen de enzimas propias para la degradación del alimento ingerido por el animal, es en éstos que se lleva a cabo la mayor parte de la digestión del alimento debido a la fermentación microbiana (ver Fig.2.1).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

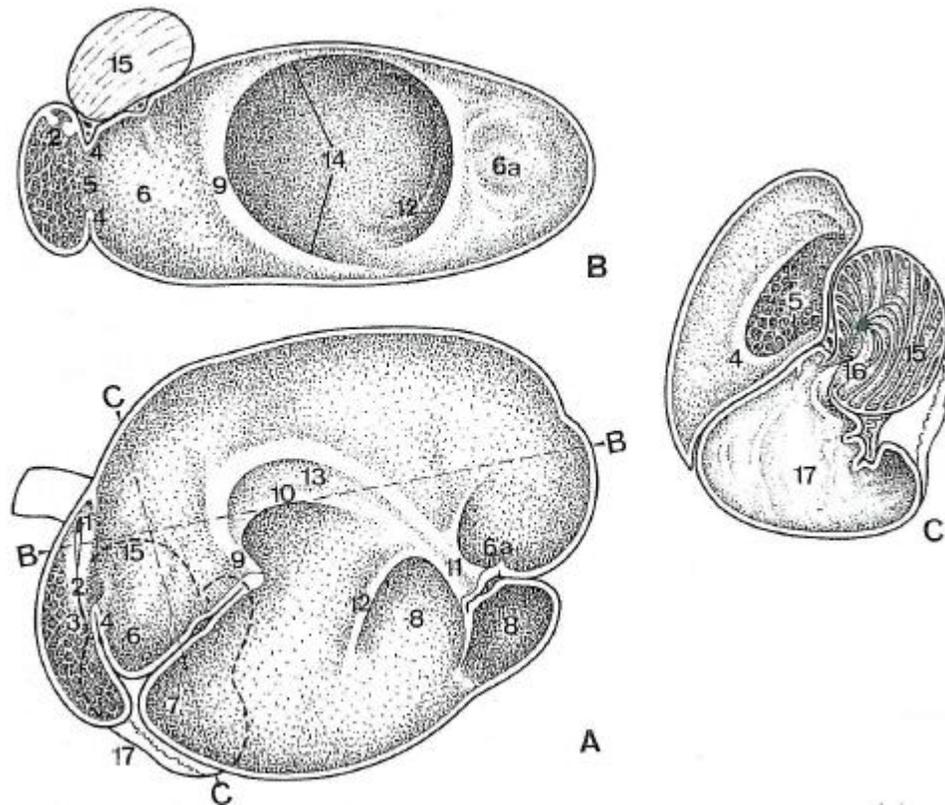


Figura 2.1 Relación espacial y disposición de la estructura interna del estómago de los rumiantes en general. **A** sección longitudinal, vista izquierda; **B** sección horizontal, vista dorsal; **C** sección transversal vista cudad. 1=cardias, 2= gotera reticular, 3=abertura retículo omasal, 4= pliegue retículo ruminal, 5=abertura retículo ruminal, 6=principal zona de absorción del atrio, 6a=principal absorción del saco ciego dorsocaudal, 7= saco ventral, 8= saco ciego ventrocaudal, 9= pilar craneal, 10=pilar longitudinal derecho, 11=pilar caudal, 12= pilar coronario ventral, 13= ínsula ruminis, 14=abertura intra ruminal, 15=omaso, 16=gotera del omaso, 17=abomaso. (Fuente: adaptado de Church, D. C.1993. El Rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia, Zaragoza).

En los animales lactantes el rumen y el retículo se encuentran poco desarrollados, de modo que la leche que llega hasta el estómago es canalizada por la gotera esofágica, hasta el omaso y abomaso. Una vez que comienzan a consumir alimentos sólidos el retículo-rumen aumenta considerablemente de tamaño, de forma que en los animales adultos llega a ocupar el 85% de la capacidad total del estómago. En este estadio de crecimiento del animal la gotera esofágica deja de funcionar y los alimentos junto con el agua llegan de forma directa al retículo-rumen (McDonald, 2006).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Todos los mamíferos herbívoros dependen de asociaciones simbióticas con microorganismos heterótrofos presentes en sus aparatos digestivos para desarrollar su capacidad de obtener energía de los componentes estructurales de las paredes vegetales, por lo que su tracto digestivo presenta adaptaciones anatómicas que permiten la fermentación microbiana. La principal ventaja de la fermentación pregástrica, es que el animal es capaz de utilizar los AVG y vitaminas, así como la proteína microbiana producida, de alto valor biológico y con una composición en aminoácidos muy estable y de alta calidad (Van Soest, 1994; Flint, 1997).

El rumen es el más voluminoso de los reservorios y su contenido suele encontrarse en dos fases: una inferior, líquida donde se encuentran en suspensión las partículas de menor tamaño de los alimentos y otra superior menos acuosa y en la cual se sitúan los productos sólidos más groseros. Posee paredes delgadas cuya superficie interior se encuentra constituida por un epitelio corneo, tapizado de papilas que poseen un rol importante en la absorción de AGV y amoníaco productos del metabolismo de los microorganismos presentes en este compartimiento.

El retículo posee una mucosa reticulada tapizada de papilas absorbentes y participa de la circulación de partículas ya que de él parten las contracciones que aseguran la motilidad del conjunto de los reservorios gástricos. El tamaño del orificio contráctil retículo-omasal es pequeño, permitiendo el pasaje de partículas de alimento entre 1 a 2 mm en ovinos y entre 2 a 4 mm en bovinos; los alimentos sólidos son secuestrados hasta que adquieran un tamaño mínimo de partícula, el cual es alcanzado por la acción combinada de las enzimas microbianas y de la masticación luego de la ingestión y la rumia.

Cuando un rumiante ingiere el alimento, éste llega al retículo y es bombeado rápidamente al rumen; el contenido ruminal se mezcla continuamente, debido a las contracciones rítmicas de sus paredes junto con la saliva y es homogeneizado mediante un movimiento rotatorio durante el cual tiene lugar la fermentación microbiana. Los alimentos que se encuentran en el extremo anterior ingresan al esófago y mediante una contracción antiperistáltica regresan a la boca y son masticadas otra vez (rumia). El rumiar implica ondas de contracción que se desplazan por todo el rumen y están sincronizadas con la remasticación y con el paso de alimento a lo largo del tubo digestivo. El tiempo empleado en la rumia por los animales depende del contenido en fibra de la ración, ya que el principal factor que induce la rumia es el estímulo en el epitelio de la parte anterior del

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

rumen. El ganado vacuno en pastoreo emplea unas 8 horas por día en rumiar, casi el mismo tiempo invertido en pastar. Este proceso también es importante para disminuir la velocidad de paso del alimento a través de las cámaras de fermentación.

Una vez que estos sólidos son finamente divididos y bien mezclados con saliva, son engullidos nuevamente y regresan al rumen donde se da la fermentación microbiana, dando lugar a los AGV, el amoníaco y el agua que se absorben por la pared ruminal y al mismo tiempo gases (metano y dióxido de carbono) los cuales se eliminan por eructación. Los componentes de los alimentos no degradados en el rumen junto con las células microbianas pasan al abomaso e intestino delgado. Allí son digeridos por las enzimas secretadas por el animal hospedador, absorbiéndose los productos de la degradación. En el intestino grueso existe una segunda digestión microbiana donde los AGV producidos se absorben, pero las células microbianas junto con los componentes no digeridos de los alimentos se excretan con las heces (McDonald, 2006).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

2.2 Ecosistema ruminal

El rumen es un ecosistema microbiano complejo que hace posible la conversión de un amplio espectro de sustratos en AGV de los cuales depende el rumiante para obtener energía. Es un medio principalmente anaeróbico debido a su alto potencial redox que varía entre -250 a -400 mV, con una temperatura que alterna en el entorno a 38 y 42 °C. Posee muchas características de un sistema de cultivo continuo y ha sido comparado a un fermentador. El pH varía normalmente entre 5,8 a 7,0, el cual se mantiene en estado de equilibrio por neutralización por sustancias tampón presentes en la saliva y por la absorción de los AGV por la pared del rumen. Además cuenta con una fase gaseosa situada a nivel del saco dorsal del rumen, compuesta principalmente de CO₂, metano y nitrógeno, presencia permanente de sustrato y agua provenientes de la ingestión y de la rumia, eliminación continua de los productos del metabolismo ya sea por absorción a través de la pared ruminal, pasaje hacia la parte posterior del tubo digestivo o por eructación y actividad fermentativa de intensidad variable.

En este órgano pregástrico cohabitan diversos microorganismos incluyendo bacterias, aproximadamente 10⁹ a 10¹⁰ unidades formadoras de colonias (ufc)/mL que representan la clase predominante de microorganismos dentro de la microbiota ruminal, protozoarios en número de unos 10⁶ cel/mL la mayoría de ellos ciliados, hongos en una población aproximada de 10⁴ esporos/mL y arqueas.

Se estima que existen más de 200 especies bacterianas, las cuales son integrantes de un consorcio que realiza varias funciones vitales para el desarrollo del hospedero. Son fundamentalmente anaerobias estrictas aunque también anaerobias facultativas en contacto íntimo con el tejido epitelial que recubre al órgano (Flint, 1997; Krause et al., 2003).

Estos microorganismos aparecen ubicados en tres sitios diferentes en el rumen: adheridos a la pared ruminal (microbiota epimural), asociados a partículas alimenticias y libres flotando en el líquido ruminal. Los microorganismos adheridos al epitelio de rumen constituyen un 5% del total, hidrolizan la urea y consumen el poco oxígeno que pueda llegar con el alimento ingerido. Los grupos microbianos asociados o adheridos a partículas alimenticias digieren polisacáridos insolubles, como almidón o fibras y las proteínas menos solubles, constituyendo el 70% de la biomasa microbiana. Mientras que

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

los microorganismos que nadan libremente en el líquido ruminal atacan sustratos solubles, como proteínas o carbohidratos solubles, hidrófilos. Esta proporción constituye un 25% de la biomasa microbiana (Frioni, 2006).

La proliferación continua de los microorganismos está asegurada por la ingestión periódica de los alimentos, flujo continuo de saliva, pasaje del contenido a través del tracto gastrointestinal y por la absorción de los productos finales del metabolismo a través de las paredes del rumen. En general, los microorganismos sobreviven en este ecosistema si su tiempo de generación es menor que el tiempo de retención en el rumen (Prescott et al., 1999).

2.3 pH ruminal

El pH del rumen varía entre 5,8 a 7,0, siendo un factor crítico para el normal funcionamiento del mismo debido a su profundo efecto sobre la población microbiana residente, en los productos de fermentación y sobre las funciones fisiológicas, como la motilidad y la absorción.

El tipo de dieta proporcionada al animal condiciona el desarrollo de la microbiota adecuada para su fermentación así como el rango de pH ideal. Por ejemplo, una ración rica en almidón es fermentada principalmente por una población bacteriana amilolítica que se desarrolla mejor en valores de pH entre 5,5 y 6,0 mientras que una ración compuesta por forraje con alto contenido de hidratos de carbono estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) será fermentada por una población microbiana celulolítica que se desarrolla mejor a pH de 6 a 7. Además, la forma física de los alimentos es importante para inducir una adecuada rumia. El forraje fibroso estimula mucho más a la rumia que los concentrados, durante la rumia se secreta saliva que posee un pH alcalino y que en el rumen actúa como tampón frente a la producción de ácidos. Cuando el animal consume concentrados, la rumia disminuye, por lo tanto también la producción de saliva, lo que hace por tanto descender el pH ruminal. Otros factores que afectan el pH es el régimen de alimentación así como también la forma química de los alimentos; por ejemplo, los carbohidratos de fácil digestión son fermentados mucho más rápido que los estructurales, lo que conlleva a una producción más rápida de AGV, acompañada por una baja producción de saliva, lo cual hace descender el pH ruminal.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Por lo tanto, para poder adecuar el pH del rumen a la dieta el rumiante pone en juego tres mecanismos fisiológicos: i) la saliva, que difiere mucho a la de otros animales, es alcalina (pH de 8,2 a 8,4) y en bovinos de alto consumo puede superar la secreción a los 100L/día; ii) la rumia, ya que con ella aumenta la producción de saliva y por ende la llegada de tampones al rumen y iii) por último la absorción de los AGV por las paredes del rumen, este mecanismo donde se eliminan ácidos del medio es acompañado por secreción de bicarbonato al rumen (McDonald et al., 2006).

2.4 Metabolismo de los hidratos de carbono

Los carbohidratos presentes en los alimentos pueden clasificarse en tres grandes grupos de acuerdo a su función/ubicación: contenido celular, polisacáridos de reserva o almacenamiento (almidón) o estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina).

La celulosa es un homopolímero lineal no ramificado formado por monómeros de D-glucosa que tienen configuración β , debido a su estructura, las cadenas de celulosa se unen por puentes de hidrógeno intermoleculares formando microfibrillas. La celulosa y el almidón pueden ser hidrolizados para formar glucosa, pero difieren en el tipo de enlace glucosídico. En el almidón las moléculas de glucosa se unen por enlaces α 1-4, mientras que en la celulosa por enlaces β 1,4 -O-glucosídico. Presente junto a la celulosa en casi todas las paredes celulares de la plantas, se encuentra la hemicelulosa, son polímeros heterogéneos que contienen tanto hexosas (glucosa, manosa y galactosa) como pentosas (xilosa y arabinosa) unidos por enlaces β 1-4. Dependiendo de la especie vegetal, estos azúcares se asocian con ácidos urónicos formando estructuras poliméricas diversas como los xilanos, mananos y arabinogalactanos (Lehninger et al., 1993).

Los vertebrados no poseen enzimas capaces de desdoblar los enlaces de tipo β 1-4, por lo que no son capaces de digerir la celulosa o hemicelulosa. Estas sólo pueden ser digeridas mediante el empleo de enzimas de origen microbiano, lo que fundamenta la simbiosis establecida entre el rumiante y los microorganismos. Las celulasas hidrolizan las uniones β 1-4 entre residuos sucesivos de D-glucosa de la celulosa liberando glucosa, la cual es posteriormente fermentada para dar AGV, verdadera fuente de energía para el rumiante (Lehninger et al., 1993; Prescott et al., 1999).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

El metabolismo anaerobio de los microorganismos convierte a los glúcidos en AGV, dióxido de carbono y metano. Los AGV y el metano retienen la mayor parte de la energía contenida en el sustrato, debido a la ausencia de oxígeno, lo que impide llegar hasta la formación de dióxido de carbono y agua. Los microorganismos presentes en el ambiente ruminal anaerobio utilizan la vía glucolítica para obtener energía en forma de ATP, AGV, NADH⁺ y H⁺. Para poder degradar una segunda molécula de glucosa es necesario que el cofactor NADH que se ha reducido sea nuevamente oxidado, pero debido a la ausencia de cadena respiratoria, los microorganismos transfieren sus electrones a distintos aceptores como el carbono, produciendo metano. Éste no puede ser utilizado por el animal ya que no posee una ruta metabólica para degradarlo, lo que reduce la eficiencia en la utilización de los hidratos de carbono.

Todos los carbohidratos, independientemente de su clasificación, son hidrolizados en el rumen hasta glucosa (Fig.2.3) la cual pasa a piruvato, un intermediario clave que a través de las distintas vías metabólicas es transformado en acetato, propionato, butirato, dióxido de carbono y metano (Fig.2.4). Una típica ecuación estequiométrica para la fermentación de la hexosa es: $57 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 65 \text{ HAc} + 20 \text{ HPr} + 15 \text{ HBu} + 35 \text{ CH}_4 + 60 \text{ CO}_2 + 25 \text{ H}_2\text{O}$, aunque esta proporción se ve modificada por la dieta (Wolin, 1979).

El propionato se puede producir a partir del piruvato por varias rutas alternativas, lo que está influenciado por el tipo de dieta que consume el animal. Cuando las raciones incluyen una alta proporción de concentrados, predomina la ruta a través del lactato y acrilato, donde el lactato producido en la primera ruta puede acumularse en el rumen y llegar a producir acidosis, mientras que las rutas del succinato se siguen cuando las raciones están formadas principalmente por alimentos altamente fibrosos. También, se forman ácidos grasos en pequeñas cantidades por desaminación de aminoácidos en el rumen: ácido isobutírico a partir de valina, ácido valérico a partir de prolina, ácido 2-metilbutírico a partir de isoleucina y ácido fórmico, importantes desde el punto de vista metabólico, ya que son esenciales para la síntesis de lípidos de membrana de cadena larga (Prescott et al., 1999; McDonald et al., 2006).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

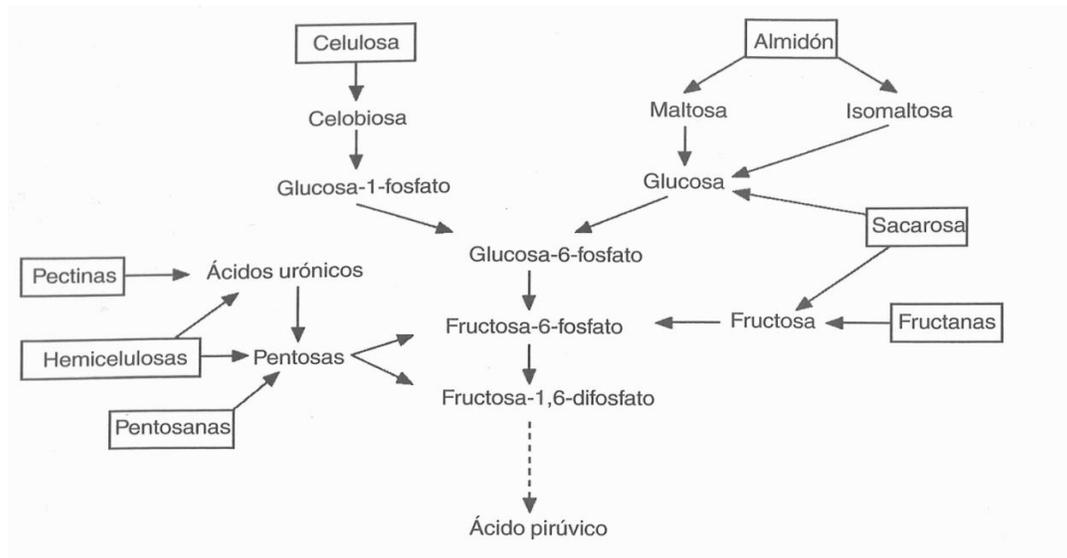


Figura 2.3 - Conversión de los carbohidratos en piruvato en el rumen. (Fuente: adaptado de McDonald et al., 2006. Nutrición Animal, sexta edición. Editorial Acribia, Zaragoza).

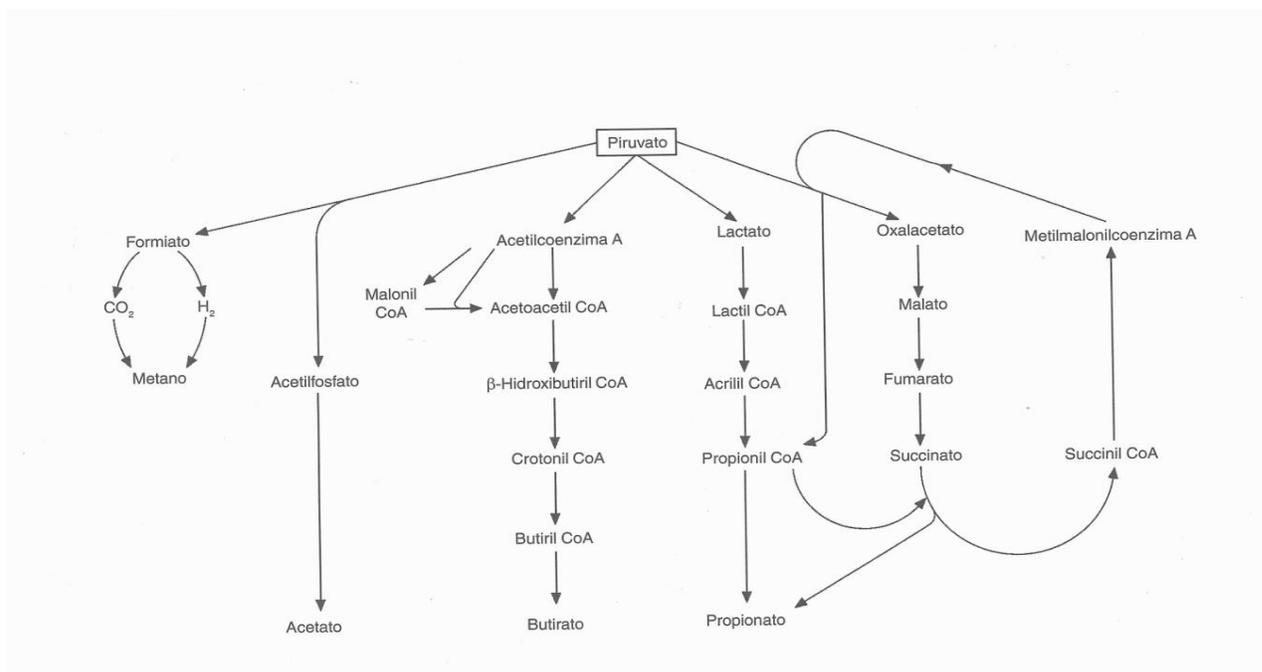


Figura 2.4 - Conversión del piruvato en AGV en el rumen. (Fuente: adaptado de McDonald et al., 2006. Nutrición Animal, sexta edición. Editorial Acribia, Zaragoza).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

La importancia del propionato, radica en ser el sustrato glucogénico más eficaz, ya que el 90% del propionato absorbido y circulando por la vena porta es captado por el hígado, debido a que posee un transportador celular específico de alta afinidad por este AGV. Dependiendo del estado fisiológico y la alimentación del animal, el propionato asegura entre un 50-70% de las necesidades de neoglucogénesis. Menor importancia tiene el lactato, ciertos aminoácidos (alanina y glutamina) y el glicerol. La neoglucogénesis es de fundamental importancia para el rumiante ya que las cantidades de glucosa absorbidas a nivel intestinal son muy bajas y los requerimientos de este azúcar son similares a los de un monogástrico. A diferencia de éstos, es en el animal bien alimentado y no durante el ayuno que la neoglucogénesis es más intensa, debido a la disponibilidad de propionato proveniente de la fermentación ruminal (Church, 1993; Cirio et al., 2000).

En rumiantes, el acetato es la principal fuente de acetyl-CoA para la lipogénesis que se lleva a cabo en el tejido adiposo y hepático. Este AGV es de fundamental importancia para la producción de ácidos grasos de cadena corta de la leche. Para su obtención en primer lugar se da una descarboxilación oxidativa del piruvato, por una piruvato deshidrogenasa para dar acetyl-CoA, que es posteriormente convertido en acetato por una reacción fosfotransacetilasa reversible. En el caso de los protozoarios holotricos, convierten el piruvato a acetato e hidrógeno en organelos membranosos análogos a las mitocondrias llamados hidrogenosomas. (Hobson, 1988; Church, 1993).

La principal bacteria productora de butirato en el rumen es *Butyrivibrio fibrisolvens*; tras condensar dos moléculas de acetyl-CoA, la acetoacetyl-CoA resultante es luego convertida a butiril-CoA por una serie de reacciones similares a una β -oxidación. Por lo tanto, dos pares de equivalentes reductores son oxidados, formándose una molécula de ATP por la conversión de acetoacetyl-CoA en butirato vía butiril-CoA y/o butirilfosfato (Hobson, 1988). La pequeña cantidad de ácido butírico que logra escapar el metabolismo en el epitelio ruminal es utilizado en el hígado, junto con los ácidos grasos de cadena más larga que se originaron en rumen durante la digestión fermentativa, para la síntesis de grasas más complejas, o bien es oxidado produciendo radicales acetyl que se utilizan en el ciclo de Krebs para la producción de CO₂ y energía (Church, 1993; Cirio et al., 2000).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

2.5 Relación entre los AGV

Los AGV más abundantes en el rumen son los ácidos acético, propiónico y butírico, en una proporción aproximada de 63: 21: 16. El acetato es el AGV que siempre se produce en mayor cantidad, siendo el producto típico de rumiantes que consumen forrajes. Mientras que cuando se agregan concentrados a la dieta se proporciona almidón, lo que induce el crecimiento de una población bacteriana amilolítica, en estas condiciones se aumenta la proporción de propionato en el rumen, aunque su cantidad nunca llega a ser mayor que la del acetato. Por lo tanto, la dieta influencia el tipo de población bacteriana presente en el rumen, ya que el tipo de alimento ingerido afecta directamente al pH del mismo (Hobson, 1988).

2.6 Metabolismo de las proteínas

El metabolismo proteico en el rumen es el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos ruminales. El principal aporte de proteína para el rumiante lo constituye la microbiota ruminal, ya que la mayoría de las proteínas de la dieta son degradadas por bacterias proteolíticas. Las proteínas son sintetizadas *de novo* para formar parte de la biomasa bacteriana y una vez que pasan hacia el intestino son digeridas, constituyendo así la fuente primaria de nitrógeno para el animal. El nitrógeno microbiano representa aproximadamente el 40% del nitrógeno no amoniacal que penetra en el intestino delgado con niveles altos de proteína dietaria, sobre el 60% en dietas pobres en proteína y casi el 100% en dietas purificadas suplementadas con nitrógeno no proteico (Church, 1993).

Los microorganismos del rumen hidrolizan las proteínas de origen alimenticio hasta péptidos y aminoácidos, algunos de los cuales pueden degradarse hasta ácidos orgánicos, amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco producido, así como también péptidos sencillos y aminoácidos libres, son utilizados por los microorganismos para la síntesis proteica *de novo*, parte de la cual es degradada en el rumen y su nitrógeno reciclado por los microorganismos (ver Fig. 2.5). El rumiante, al igual que otros animales, no puede sintetizar la cadena carbonada de los aminoácidos esenciales, por lo que depende para obtener su aporte de la proteína bruta microbiana sintetizada en el rumen más la proteína dietaria que escapa a la degradación en dicho compartimiento (Church, 1993; Bach et al., 2005).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

La cantidad de proteína microbiana que puede ser sintetizada en el interior del rumen está limitada por la cantidad de energía disponible, ya sea en cantidad de ATP o de materia orgánica digestible para los microorganismos. Además de una adecuada cantidad y tipo de carbohidrato como fuente de energía, debe considerarse la sincronía a la cual dichos nutrientes se tornan disponibles, ya que cuando la tasa de fermentación de los carbohidratos excede la tasa de degradación proteica, la síntesis de proteína microbiana decrece (Bach et al., 2005).

La mayor parte de la proteína que llega al intestino delgado es de origen microbiano. Su composición es relativamente constante, mientras que la parte restante, corresponde a la proteína proveniente del alimento no degradado en el rumen, cuya composición en aminoácidos varía de acuerdo a la naturaleza de la dieta. Una vez que los microorganismos atraviesan el abomaso y el intestino delgado, sus proteínas celulares son digeridas y absorbidas. Cuando la dieta es deficiente en proteína o si la proteína es resistente a la degradación en rumen, la concentración de amoníaco baja y se enlentece el crecimiento microbiano. Por el contrario, si la degradación de proteína es más rápida que su síntesis, el amoníaco se acumula en el líquido ruminal, pasa a la sangre y llega hasta el hígado donde se convierte en urea, parte de la cual puede regresar al rumen con la saliva o directamente a través de la pared ruminal, pero la mayor parte se pierde al excretarse en la orina. Si los alimentos aportan poca proteína y la cantidad de amoníaco en rumen es baja, la cantidad de nitrógeno que regresa al rumen como urea puede ser mayor que la absorbida en forma de amoníaco en el rumen, conduciendo a una ganancia neta en el nitrógeno reciclado que se convierte en proteína microbiana, lo que determina que la proteína que llega al intestino puede ser mayor a la ingerida con los alimentos (McDonald et al., 2006).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

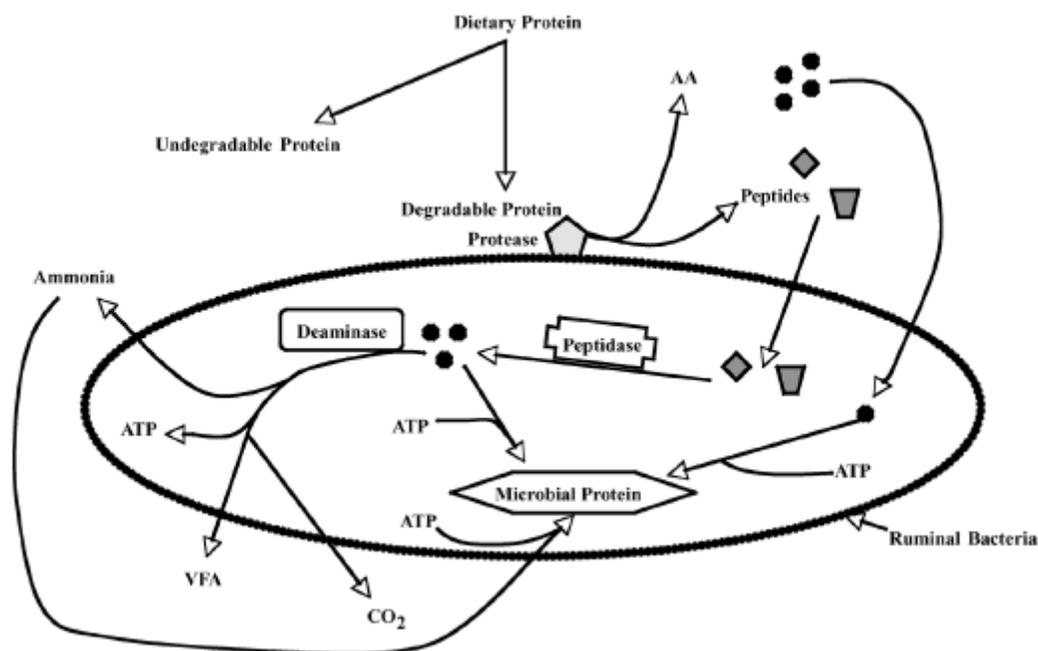


Figura 2.5 - Esquema de la degradación proteica y obtención de los productos finales en el rumen.

(Fuente: adaptado de Bach et al., 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. J. Dairy Sci. 88:E9-E21).

En los rumiantes, la urea endógena puede ser utilizada para la síntesis de proteínas en los preestómagos del animal. La digestión del nitrógeno alimentario por parte de los microorganismos produce importantes cantidades de amoníaco el cual es parcialmente utilizado por estos para sintetizar sus proteínas y parcialmente absorbido a través de la pared ruminal para ser transformado en urea en el hígado mediante el ciclo de la ornitina. Parte de esta urea así producida es eliminada por el riñón y cierta proporción retorna al retículo-rumen con la saliva y por la difusión directa a partir de la sangre que irriga la pared de los preestómagos. Este retorno transmural es posible gracias a la presencia de ureasa sintetizada por la microbiota epimural adherida a la pared ruminal que hidroliza la urea a amoníaco y CO₂ a medida que va difundiendo, debido a un gradiente de concentración desde la sangre hacia la luz del órgano.

La urea que entra a los preestómagos con la saliva es también hidrolizada por ureasas bacterianas presentes en el líquido ruminal, provenientes de la microbiota epimural por descamación del epitelio y también de las bacterias libres. La urea por tanto provee así de radicales aminados para el anabolismo proteico en el rumen y estas proteínas serán

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

recuperadas por el rumiante luego de la digestión y absorción en el tracto intestinal (Church, 1993; McDonald et al., 2006).

La degradabilidad de las proteínas y por tanto su susceptibilidad a proteasas microbianas es influenciada por distintos factores. Entre ellos se destacan la estructura de la proteína, la interacción con otros nutrientes y la población microbiana predominante, la cual a su vez depende del tipo de ración, de la tasa de pasaje ruminal y el pH ruminal (Bach et al., 2005).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Las bacterias ruminales pueden ser clasificadas por el empleo de distintos sustratos sobre los cual actúan y por los productos finales de su metabolismo en: bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas, amilolíticas, proteolíticas, lipolíticas, bacterias que utilizan ácidos, azúcares solubles, etc.

2.7 Bacterias celulolíticas

La celulosa es el carbohidrato más abundante en el mundo, formando parte de entre el 20 al 40 % de la materia seca de plantas superiores. Es el principal polisacárido estructural de la pared celular de las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. En la naturaleza, la celulosa pura es una rareza biológica confinada a fibras especializadas como el algodón con un 90% de contenido de este homopolisacárido. Toda la celulosa estructural está combinada en algún grado con lignina, hemicelulosa, cutina y minerales (Van Soest, 1994).

La disponibilidad nutricional de la celulosa varía desde totalmente indigestible a completamente digestible, dependiendo en gran medida del grado de lignificación. Los tejidos de las plantas difieren tanto en tamaño como en su organización, algunos tipos de células vegetales como las células mesófilas tienen paredes pobremente lignificadas y son fácilmente degradadas por enzimas que hidrolizan polisacáridos, mientras que las células pertenecientes al esclerénquima tienen gruesas paredes celulares y una lámina media que separa a las células entre sí altamente lignificada, por lo que estas paredes celulares deben ser atacadas por las enzimas desde la superficie luminal. Por lo tanto a las limitaciones adicionales derivadas de la difusión y el transporte de los agentes celulolíticos hacia el sitio de acción, deben ser sumadas las limitaciones impuestas por la estructura de la celulosa en sí misma (Lynd et al., 2002).

Entre las bacterias existen diferencias en cuanto a la estrategia celulolítica utilizada por los grupos aeróbicos o anaeróbicos. En los primeros, la celulosa es degradada a través de la producción de cantidades substanciales de celulasas extracelulares y aunque algunos representantes se adhieren a la superficie de la celulosa, éste contacto físico no parece ser necesario para la hidrólisis de la misma. En cambio; las especies anaerobias con algunas excepciones, degradan la celulosa principalmente mediante un sistema celulasas complejo, el cual se localiza sobre la superficie celular o el glicocálix. La mayoría de las especies anaeróbicas celulolíticas crecen de manera óptima en celulosa cuando

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

pueden adherirse a su sustrato y al menos en algunas especies esta unión parece ser obligatoria (Lynd et al., 2002).

Los sistemas hidrolíticos enzimáticos que actúan sobre la celulosa también son activos contra la hemicelulosa y enzimas específicamente activas contra esta última son comúnmente co-producidas por los microorganismos degradadores de la celulosa (Lynd et al., 2002).

En los sistemas celulasa complejos se pueden encontrar tres tipos diferentes de actividades enzimáticas: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasas o β -glucósido glucohidrolasa. Las endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas cortan la celulosa en sitios internos al azar de la cadena polisacáridica, originando oligosacáridos de longitud variable (celodextrinas) y por lo tanto nuevos extremos de cadena. Mientras que las exoglucanasas, que incluyen a las 1,4- β -D-glucanohidrolasas (celodextrinasas) actúan de forma progresiva a partir de los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa, generando glucosa o celobiosa. Por último las β -glucosidasas hidrolizan celodextrinas solubles y celobiosa para dar glucosa (Fig. 2.6).

Estos sistemas celulasa no son simples aglomeraciones de enzimas representantes de los tres grupos sino que actúan de manera coordinada para hidrolizar de manera eficiente la celulosa. Otra característica importante a resaltar de estos sistemas es el fenómeno de sinergismo que presentan, por el que exhiben una actividad colectiva mayor que la suma de las actividades enzimáticas individuales.

Las celulasas se caracterizan por su capacidad de hidrolizar los enlaces β -1,4-glucosídicos y la mayoría de ellas presentan una estructura modular que incluye tanto módulos catalíticos como módulos de unión al sustrato (módulos de fijación a carbohidratos, CBMs). Estos últimos se unirían a la superficie de la celulosa para facilitar la hidrólisis de la misma al conducir los dominios catalíticos a la proximidad del sustrato (celulosa insoluble), la presencia de los módulos CBM parece ser particularmente importante para la iniciación y progresión de las exoglucanasas (Lynd et al., 2002).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

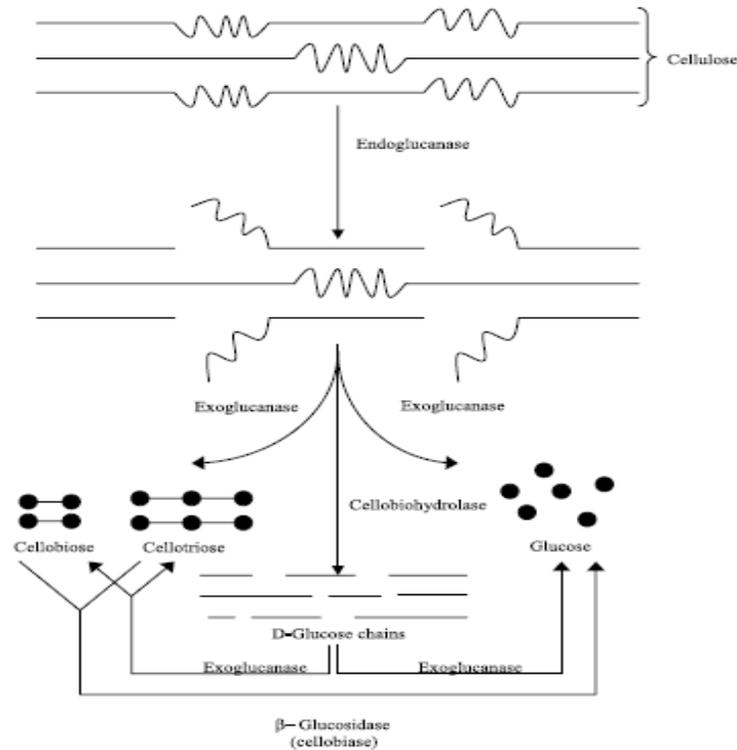


Figura 2.6. El sistema enzimático celulasa consiste de tres componentes principales: endo- β -glucanasa, exo- β -glucanasa y β -glucosidasa. El modo de acción: (1) endo- β -glucanasa, 1,4- β -D-glucanohidrolasa, carboximetilcelulasas cortan aleatoriamente las cadenas de celulosa dando glucosa y celo-oligosacaridos.(2) exo- β -glucanasa, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa atacan los extremos no reductores de la celulosa (3) β -glucosidasa, celobiasa: hidrolizan la celobiosa a glucosa. (Fuente: adaptado de Krause et al.,2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiology Reviews 27: 663-693.)

Los microorganismos han adoptado distintas estrategias para hidrolizar la celulosa, que en la naturaleza se encuentra en forma de partículas insolubles o embebidas dentro de polímeros de hemicelulosa y lignina. Las bacterias anaeróbicas no poseen la habilidad de penetrar de manera eficiente el material celulolítico, como lo hacen los hongos filamentosos que son capaces de penetrar los sustratos a través de extensiones de sus hifas. En consecuencia, las bacterias debieron desarrollar mecanismos alternativos para degradar la celulosa y ganar acceso a los productos de su hidrólisis incluso en competencia con otros microorganismos y con cantidades de energía limitantes para la síntesis de celulosas. Esto pudo haber conducido al desarrollo de los sistemas celulosas complejos llamados celulosomas, los cuales posicionan a las bacterias productoras de celulosas en el sitio de acción de la hidrólisis sobre la superficie del sustrato, como se

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

observa en bacterias celulolíticas del ambiente ruminal. Esta estructura, en muchos casos parece ser esencial para la degradación de la fibra, promueve la adherencia hacia la superficie vegetal y otorga a la bacteria de una ventaja competitiva directa en la utilización de los productos de hidrólisis solubles. Los microorganismos productores de celulosomas se encuentran normalmente en ambientes anaeróbicos, donde existen en consorcio con otros microorganismos tanto celulolíticos como no celulolíticos (Lynd et al., 2002; Krause et al., 2005).

Los celulosomas son complejos multienzimáticos grandes y estables especializados en la adhesión y degradación de la celulosa, se presentan como protuberancias visibles sobre la pared celular de las bacterias celulolíticas que crecen sobre materiales celulósicos. Son responsables de la adhesión celular así como también de economizar la secreción de enzimas, ya que poseen la capacidad de concentrar las actividades enzimáticas en la proximidad de la pared bacteriana. Esto proporciona un sinergismo óptimo entre las enzimas presentes en el celulosoma, a la vez que minimiza las distancias de difusión de los productos de hidrólisis de la celulosa, permitiendo así una eficiente captación por parte de la bacteria de los oligosacáridos resultantes (Lynd et al., 2002; Bayer et al., 2008).

En general, los celulosomas consisten de un gran andamio proteico (*scaffolding*) no catalítico y multimodular que incluye dominios cohesinas, módulos hidrofóbicos y CBMs, que se ancla a la pared celular mediante dominios cohesinas del tipo II (Fig.2.7). Estas cohesinas del andamio proteico pueden asociarse a módulos catalíticos que poseen porciones de anclaje y exhiben actividad endoglucanasa, exoglucanasa y glucosidasa. Los celulosomas se encuentran extensamente glicosilados, principalmente en el andamio proteico, lo que podría protegerlo de la acción de proteasas. La gran eficiencia del celulosoma se ha adjudicado a una buena relación entre dominios catalíticos que optimiza el sinergismo entre ellos, una correcta distancia entre los componentes individuales y a la existencia de distintas actividades enzimáticas (celulolíticas o hemicelulolíticas) (Lynd et al., 2002).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

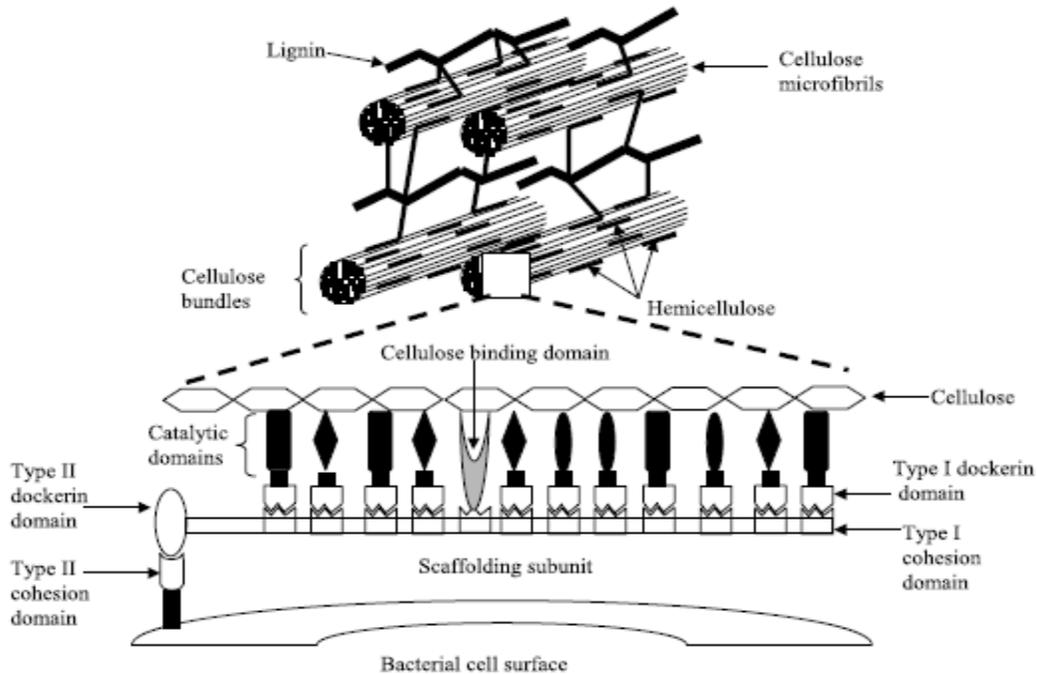


Figura 2.7- Representación idealizada de la fibra y de los componentes de la celulosa, microfibrillas, hemicelulosa y lignina que son degradados vía el complejo celulosoma.

El "celulosoma" es un complejo multienzimático producido por muchos organismos celulolíticos del rumen. Los celulosomas están asociados con la superficie, median la adhesión celular al sustrato insoluble y lo degradan hasta productos solubles que son luego absorbidos. Las múltiples subunidades del celulosoma están compuestas de numerosos dominios funcionales que interactúan entre sí y con el sustrato celulolítico. Una de estas subunidades, una gran glicoproteína, llamada "scaffolding", integra selectivamente a varias subunidades celulasa y xilanasas en un complejo cohesivo, mediante la combinación de sus dominios "cohesin" con un dominio "dockerin" presente sobre cada una de las subunidades enzimáticas (Fuente: adaptado de Krause et al. ,2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiology Reviews 27: 663-693).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

La morfología de los celulosomas es similar entre los distintos microorganismos, mientras que su composición varía de especie a especie. Existe una variedad de bacterias celulolíticas que producen celulosomas entre las que se incluyen *Clostridium thermocellum* (bacteria anaerobia termófila no ruminal en la cual se describió originalmente esta estructura), *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellobioparum*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*. Aún no se han identificado en *Fibrobacter succinogenes*, otra eficiente bacteria celulolítica del rumen que se adhiere activamente a la celulosa (Bayer et al., 2008).

La adherencia de la bacteria a la celulosa en el ecosistema ruminal puede ser dividida en cuatro fases para las especies *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus*: (1) transporte de la bacteria no móvil hacia el sustrato vegetal, cuyo contacto inicial depende del tamaño de la población celulolítica libre en suspensión; (2) adhesión inicial de la bacteria de forma no específica a sitios disponibles no protegidos sobre la pared de la célula vegetal mediada por el componente constitutivo glicocálix de la bacteria. La masticación que ocurre durante la alimentación y la rumia en el animal hospedero es necesaria para la disrupción de la capa de cutícula de la planta y así exponer las porciones digestibles. Esto incrementa el área de superficie del sustrato y su hidratación, aumentando la probabilidad de que la bacteria celulolítica pueda iniciar la fijación no específica hacia el sitio fibroso; (3) adhesión específica vía adhesinas o formación de ligandos sobre la superficie de la célula bacteriana que reconocen receptores sobre el tejido del sustrato, lo cual debe ser facilitado por estructuras tales como celulosomas, conexiones fimbriales, epítopes glicosilados de proteínas de fijación a celulosa (CBP) o glicocálix y CBM de enzimas. (4) proliferación de la bacteria adherida sobre el tejido de la planta potencialmente digestible.

Este tipo de estrategia de adhesión fuerte y específica al sustrato (Fig. 2.8), le provee a la bacteria de varias ventajas: las enzimas celulolíticas son concentradas sobre el sustrato y otros microorganismos son excluidos del sitio de hidrólisis, lo que le permite a la bacteria adherida ser la primera en tener acceso a los productos de hidrólisis. Esto la protege de la predación por parte de los protozoarios y del ataque por bacteriófagos, así como también resguarda a las enzimas celulolíticas de la acción de proteasas presentes en el ambiente ruminal.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Las bacterias adheridas a las partículas de alimento poseen un tiempo de retención en el rumen tres veces mayor al de las bacterias libres en la fase líquida, por lo que tendrán una mejor oportunidad de digerir los polisacáridos de las paredes celulares vegetales.

La adhesión bacteriana puede ser afectada por distintos factores entre los que se incluyen: edad de la bacteria, condición del glicocálix, competencia con otros microorganismos, factores relacionados con la naturaleza del sustrato como la presencia de cutícula, área de superficie, hidratación, carga iónica y factores ambientales tales como el pH, la temperatura, presencia de oxígeno y cationes (Na^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2}) así como también carbohidratos solubles (Miron et al., 2001).

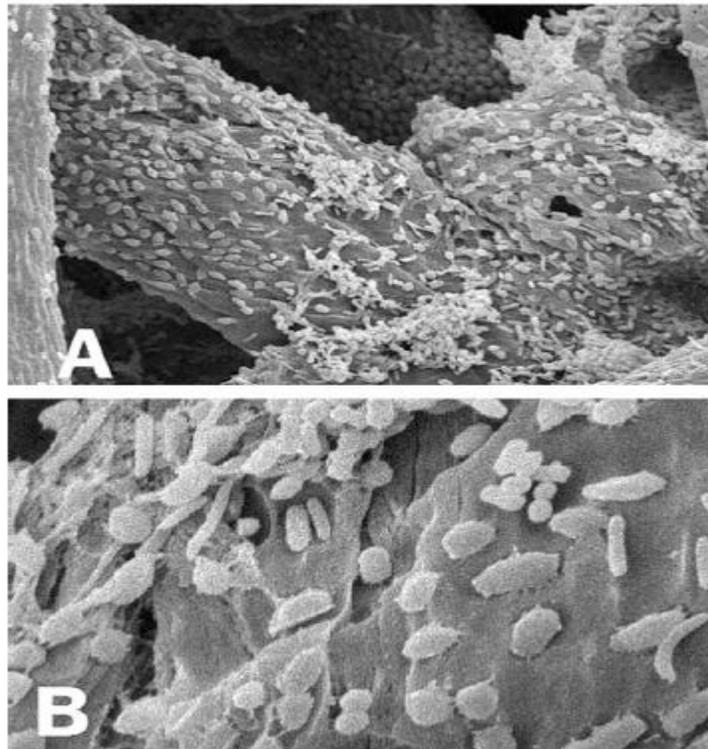


Figura 2.8 -Adherencia de bacteria ruminal al material vegetal.A: Micrografía electrónica de barrido de la adhesión a la pared celular de la planta. B: Examinación cercana a la célula bacteriana revela protuberancias que son como factores de adhesión que fijan las células a la superficie de la planta. (Fuente: adaptado de Krause et al., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiology Reviews 27: 663-693).

En general las bacterias celulolíticas son organismos especializados, en primera instancia degradadores de carbohidratos y generalmente no pueden procesar proteínas o lípidos como fuentes energéticas. Además, las especies pertenecientes al género *Fibrobacter* y

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Ruminococcus utilizan un rango limitado de carbohidratos. Estas especies están preparadas para crecer en presencia de celulosa y sus productos de hidrólisis pero no pueden hacerlo a partir de monosacáridos, oligosacáridos ni polisacáridos compuestos de azúcares distintos a la glucosa. Producen primariamente succinato y acetato como productos finales de la fermentación. Conjuntamente han evolucionado para digerir la celulosa de forma relativamente rápida. Una posible estrategia para soportar tasas rápidas de hidrólisis es mediante la localización primaria de celulasas sobre la superficie celular en complejos multienzimáticos como los celulosomas, lo que permite una fuerte adherencia a la celulosa proveyéndoles de varias ventajas. Muchas de las especies celulolíticas pueden también degradar la hemicelulosa (Weimer, 1996).

Los requisitos nutricionales para el crecimiento de las especies celulolíticas suponen disponibilidad de nitrógeno, fósforo, azufre, macro y microminerales y vitaminas. Las bacterias celulolíticas que predominan en el rumen requieren asimismo ácidos grasos volátiles de cadena ramificada. También nutrientes presentes en el medio de cultivo como peptonas y extracto de levadura, estimulan el crecimiento de las cepas.

La celulólisis en el rumen se debe principalmente a la actividad en particular de tres especies bacterianas *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*. Estas especies bacterianas sin embargo no son las más abundantes, lo cual se observó en un estudio realizado por Stevenson y Weimer (2007). Estos autores analizaron mediante PCR en tiempo real la abundancia de taxones individuales como fracciones de la población bacteriana ruminal total en muestras de contenido ruminal de dos bovinos hembra lecheras, posteriormente a las 3 horas de ser alimentadas en dos días sucesivos. Las poblaciones bacterianas analizadas mostraron una clara dominancia del género *Prevotella*, que comprendió entre un 42 a 60% de las copias del gen ARNr 16S, mientras que la proporción de copias atribuibles a *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Selenomonas ruminantium* y *S. dextrinosolvans* fueron entre 0,5 a 1%. Las especies menos abundantes fueron *Ruminococcus albus*, junto con *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Streptococcus bovis* y *Megasphaera eldenii*, comprendiendo un porcentaje de copias del gen ARNr bacterial < 0,03 % (Stevenson y Weimer, 2007).

Los cocos celulolíticos *R. albus* y *R. flavefaciens* fueron originalmente diferenciados en base a su pigmentación, los aislamientos no pigmentados o blancos se les llamo *R. albus*

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

y *R. flavefaciens* aquellos aislamientos de color amarillo, aunque la pigmentación varía. *R. albus* produce como resultado de su fermentación etanol, acetato, formiato e hidrógeno molecular, mientras que *R. flavefaciens* produce succinato en vez de etanol. Los ruminococos son bacterias Gram positivas pertenecientes al filum *Firmicutes*, *R. albus* a menudo tiñe como Gram negativa, mientras que *R. flavefaciens* es Gram variable, no pueden crecer sobre pentosas, pero pueden utilizar hemicelulosa como fuente de energía, sugiriendo una capacidad de crecer sobre productos de la hidrólisis enzimática de la misma (Russell et al., 2009).

Fibrobacter succinogenes fue considerado en un principio miembro del grupo *Bacteroides*, aunque estudios posteriores basados en el ARNr 16S indicaron que el género *Fibrobacter* no se encuentra cercanamente relacionado a la mayoría de las eubacterias y fue clasificada en un filum separado llamado *Fibrobacteres* (Gupta, 2004). La mayoría de las células presentan forma de bastón aunque en cultivo pueden presentarse en forma de cocos u ovoides, con un diámetro de 0,8 a 1,6 μm , en forma solitaria o también formando cadenas. Todas las cepas son capaces de hidrolizar celulosa y celobiosa produciendo succinato como producto final, mientras que sustratos como pectina, xilano y lactosa son degradados en forma cepa dependiente (Russell et al., 2009). El valerato y el isobutirato son esenciales para su crecimiento así como biotina y ácido p -aminobenzoico (Hobson y Stuart, 1997).

Fibrobacter succinogenes es una de las principales especies celulolíticas presentes en el tracto gastrointestinal de animales herbívoros; en base a datos moleculares puede ser clasificada en cuatro grupos filogenéticos 1-4 (Amann et al., 1992). El grupo 1 es el que probablemente juegue el papel más importante en la degradación de la fibra, ya que se encuentra ampliamente distribuido en las plantas, sin preferencias específicas con respecto al tejido de la misma y con altos niveles de actividad metabólica sobre el material fibroso. Comparada con otras especies fibrolíticas como *R. flavefaciens* y *R. albus*, es capaz de digerir la fibra de forma más rápida y en mayor medida, aún digiriendo celulosa microcristalina, siendo una ventaja fisiológica en el rumen de animales que reciben dietas basadas en forrajes de baja calidad (Kobayashi et al., 2008).

El pH es uno de los factores más variables del ambiente ruminal, es afectado por la naturaleza del alimento, forma física del mismo, la frecuencia de la ingesta, etc. La mayoría de las bacterias ruminales prefieren valores de pH cercanos a la neutralidad para

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

su crecimiento. Las bacterias celulolíticas son particularmente sensibles a pH bajos y ninguna de las tres especies bacterianas principales crecen a pH menores a 6, así como también las arqueas metanógenicas son afectadas intensamente una vez que el pH del rumen desciende por debajo de dicho valor.

Un pH ruminal bajo provoca una disminución de la actividad o número de microorganismos celulolíticos. Una posible explicación de esta inhibición es el efecto tóxico de los AGV a pH bajo, en donde los AGV no disociados son liposolubles pudiendo actuar como moléculas desacoplantes, atravesando la membrana y así causando la acumulación de protones, junto con la disipación de la fuerza protón motriz. A medida que el pH extracelular decrece, el pH intracelular también declina y el crecimiento cesa una vez que el pH intracelular es menor a 6. El mantenimiento de un pH intracelular constante crea un gradiente de pH que causa una acumulación excesiva de AGV en forma aniónica. Para evitar esto, una estrategia alternativa es dejar disminuir su pH interno, lo que inhibe por lo tanto el metabolismo celular (Russell y Wilson, 1996).

La fermentación de la celulosa puede inhibirse principalmente como consecuencia de la suplementación alimenticia con concentrados ricos en almidones o azúcares. La velocidad en el proceso celulolítico está influenciada tanto por el pH como por el tipo de sustratos presentes, por lo que la presencia en la dieta de productos que favorecen la acidez inhibe la digestión de materiales fibrosos.

Las bacterias celulolíticas presentes en el rumen son microorganismos anaerobios estrictos que generalmente requieren amonio como fuente de nitrógeno (al existir amonio en el rumen, se multiplican rápidamente y el agregado de urea al alimento favorece esta multiplicación). Al mismo tiempo, su ritmo de desarrollo depende de la disponibilidad de ácidos grasos de cadena ramificada, como el ácido isobutírico y el isovalérico (McDonald et al., 2006).

La mayoría de los microorganismos presentes en el tracto digestivo poseen requerimientos nutricionales complejos pudiendo utilizar pocos tipos de polisacáridos, por lo que el sinergismo entre varios organismos puede resultar importante para el eficiente uso del forraje por parte del rumiante. El sinergismo es definido como el incremento en el crecimiento o productividad como resultado de la combinación de dos o más microorganismos, lo cual excede el efecto aditivo de sus actividades por separado. En

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

general se establece a través del intercambio de productos de hidrólisis, utilización de productos finales o por medio de la producción de nutrientes esenciales. En el caso del co-cultivo de *F. succinogenes* y *S. ruminantium* y de *R. flavefaciens* y *S. ruminantium* se observó un incremento en la producción de propionato y digestión de la fibra (Sawanon y Kobayashi, 2006). La utilización de celodextrinas por bacterias ruminales no celulolíticas es otro ejemplo del intercambio de productos de hidrólisis, mientras que en el caso de los microorganismos metanogénicos que utilizan el hidrógeno y el dióxido de carbono para generar energía a través de la producción de metano, lo son la utilización de productos finales. También se ha observado sinergismo en la digestión de la fibra, donde un organismo primero degrada parte de la fibra y luego un segundo organismo utiliza el material solubilizado o puede alcanzar físicamente los carbohidratos estructurales insolubles remanentes (Dehority, 1991).

Otras especies fibrolíticas típicamente cultivables son *Eubacterium celulosolvens* y *Butyrivibrio fibrosolvens*. Bryant describió a *Eubacterium celulosolvens* (1959) como un bastón celulolítico, móvil y Gram positivo. Es la bacteria celulolítica cultivable más numerosa, contribuyendo al menos al 50% del recuento de bacterias celulolíticas en el contenido del rumen de un bovino alimentado con paja y concentrados. Por otra parte *Butyrivibrio fibrosolvens* es un bastón curvado, pequeño, Gram negativo que fermenta una amplia variedad de carbohidratos, con considerable variación de cepa a cepa lo que la hace un aislamiento muy común del contenido del rumen. Produce ácido butírico, CO₂, hidrógeno y ácido fórmico, como principales productos de la fermentación. Se ha visto que también participa de la degradación de los xilanos (Bryant, 1959; Hobson, 1988).

Pseudobutyrovibrio ruminis es una bacteria aislada del ambiente ruminal, anaerobia estricta, Gram negativa, no formadora de esporas, que posee forma de bastón curvado y móvil por medio de un solo flagelo polar o subpolar. Fermenta una variedad de carbohidratos para producir butirato principalmente, formato y lactato. Estas características junto con un contenido de G+C en su ADN de entre 40 a 41%, hacen que se parezca fenotípicamente a *B. fibrosolvens*, mientras que diferencias sustanciales en la secuencia de su ADNr 16S justifican su colocación en un nuevo género. Además *P. ruminis* no es capaz de degradar xilano, materiales amiláceos ni proteínas, su contenido en ácidos grasos C₁₈ es menor y posee una tendencia a producir células muy largas

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

cuando crece sobre medios conteniendo agar. Estas propiedades fenotípicas las diferencian por tanto de *B. fibrosolvans* (Van Gylswyk et al., 1996).

2.8 Bacterias hemicelulolíticas

Cuando el forraje es tierno, las paredes celulares poseen la mayor concentración de pectinas, y a medida que maduran pasan a predominar la celulosa y la hemicelulosa que le otorgan mayor resistencia, para que finalmente aparezcan concentraciones crecientes de lignina, que infiltra la pared celular y le da mayor rigidez y el color amarillento característico del forraje maduro. La hemicelulosa es un carbohidrato estructural como la celulosa y la pectina, es insoluble en agua pero soluble en álcalis o ácidos diluidos, constituyendo un porcentaje importante del forraje que es consumido por el animal.

Las bacterias celulolíticas poseen casi en la misma medida la habilidad de digerir celulosa y hemicelulosa. Dentro de las bacterias hemicelulolíticas encontradas en el rumen están *B. fibrosolvans*, *Prevotella ruminicola* (son bastones Gram negativos y sus principales productos de fermentación son los ácidos succínico, acético y fórmico) y *Ruminococcus* spp. (Hungate, 1966; Hobson, 1988; Prescott et al., 1999).

2.9 Bacterias amilolíticas

Al ingresar en la dieta el almidón es atacado principalmente por las bacterias amilolíticas, que fermentan hidratos de carbono de reserva (almidón) presentes en granos, a partir de glucosa y producir AGV, especialmente propionato. La digestibilidad del almidón en el rumen es elevada y la fracción que logra pasar al intestino puede ser degradado por la amilasa pancreática del animal y así absorberse como glucosa, lo que favorece al rumiante al aportarle una fuente directa de glucosa, que de otro modo debería sintetizar por gluconeogénesis hepática empleando el propionato absorbido en el rumen.

Las bacterias amilolíticas fermentan almidón, ya que poseen enzimas amilolíticas, las cuales están ampliamente distribuidas entre bacterias, protozoos y hongos. La mayoría de estas son incapaces de degradar celulosa (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinomonas amylolytica* y *Selenomonas*

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

ruminantium), aunque existen bacterias celulolíticas que también son amilolíticas (*Clostridium lochheadii*, la mayoría de las cepas de *B. fibrisolvens* y algunas cepas de *F. succinogenes*) (Hungate, 1966; Frioni, 2006).

Bajo ciertas condiciones, cuando repentinamente se cambia la dieta del animal hacia una dieta rica en granos, los niveles de *S. bovis* se incrementan de forma casi explosiva, lo que aumenta de forma importante la cantidad producida de ácido láctico. Esta especie es más tolerante a la acidez que la mayoría de las bacterias del rumen y se hace dominante si la acumulación del ácido láctico sobrepasa la capacidad tampón del rumen. La caída del pH está asociada con la acumulación de ácido láctico, que puede conducir a una acidosis láctica aguda, cuyo principal agente causante es *S. bovis*. Por el contrario, si el animal es sometido a un adecuado período de adaptación, los recuentos de *S. bovis* no varían de forma considerable respecto a aquellos animales alimentados a base de fibras.

S. bovis es un estreptococo homofermentativo cuyas cepas ruminales difieren de las aisladas a partir de infecciones en humanos y animales domésticos. La mayoría de las cepas ruminales producen α -amilasa y forman dextrano con uniones ($\alpha 1 \rightarrow 6$) y muy poco ramificados a partir de sacarosa; mientras que no fermentan ramnosa, manitol, xilano, goma arábica ni celulosa. Son capaces de crecer rápidamente en medios con carbohidratos fácilmente fermentables y debido a que no requiere un potencial de óxido-reducción demasiado bajo son uno de los aislamientos más comúnmente encontrados de las bacterias ruminales (Hungate, 1966).

Otra especie bacteriana importante es *Selenomonas ruminantium*, bacilos Gram negativos, móviles, capaces de fermentar una amplia variedad de carbohidratos, cuyo principal sustrato es el almidón pero que pueden llegar a usar lactato. Se ha reportado que esta especie puede llegar a representar entre el 22 al 51 % del total de los recuentos de bacterias ruminales viables (Hobson, 1988).

Dentro de las bacterias degradadoras de almidón encontramos también a *Ruminobacter amylophilus*, cuyas células poseen forma irregular y no son capaces de fermentar monómeros de glucosa como las bacterias celulolíticas. El almidón y los oligosacáridos originados a partir del primero son los únicos sustratos capaces de ser fermentados para producir ácido fórmico, acético, succínico y algo de lactato.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Algunas cepas de *Prevotella ruminicola* también degradan almidón y son capaces de degradar una mayor variedad de azúcares fermentables que la que es capaz de fermentar *Ruminobacter amylophilus*. *P. ruminicola* está presente en el rumen de bovinos sin importar prácticamente el tipo de dieta que ellos reciban.

Succinomonas amylolytica es otra bacteria capaz de fermentar sólo almidón y sus productos de hidrólisis, liberando trazas de ácido propiónico, pero no de ácido fórmico. Presentan morfología en forma de bastón corto con un único flagelo polar y se encuentra en un número considerablemente menor en relación con *Ruminobacter amylophilus* o *Prevotella ruminicola* (Hungate, 1966).

2.10 Bacterias que utilizan ácidos

Los ácidos se producen en el rumen debido a los procesos de fermentación donde participan distintas poblaciones microbianas. La mayoría de ellos son absorbidos a través de la pared del rumen, fermentados por distintas bacterias o transportados a porciones posteriores del tracto gastrointestinal, de modo que no se acumulen en el órgano.

Entre los ácidos que son degradados en el rumen están el lactato, succinato, propionato, formiato y acetato. Las especies bacterianas principalmente asociadas con la producción de ácido láctico en el rumen son *S. bovis*, *Lactobacillus* spp., *B.fibrisolvens* y *Lachnospira muliparus*.

Las bacterias capaces de utilizar el ácido láctico, controlan su acumulación en el rumen, ya que este ácido se caracteriza por una menor absorción por las paredes del órgano, *Megasphaera elsdenii* es un ejemplo de ello. *M. elsdenii* (anteriormente *Peptostreptococcus elsdenii*) es un coco Gram negativo, que se presenta en pares o cadenas, no móvil, anaerobio y un importante fermentador de ácido láctico en el ganado bovino (puede contribuir a la fermentación de entre el 60 y el 80 % del ácido), se encuentra principalmente en el rumen de animales jóvenes o en animales recibiendo raciones con grandes cantidades de granos donde la fermentación de lactato asume particular importancia (Hobson, 1988).

M. elsdenii es capaz de crecer sobre lactosa y fructosa entre otros sustratos. Es un fermentador importante de DL-lactato, siendo el responsable de metabolizar más del 70% del lactato producido en el rumen. Es el único microorganismo ruminal conocido en

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

fermentar lactato produciendo propiónico por la vía metabólica del acrilato. Es un productor de propionato importante en el rumen, aunque también genera otros productos de fermentación como son el ácido acético, butírico, valérico y caproico, CO₂ y trazas de H₂. Además no muestra represión catabólica por carbohidratos tales como glucosa y maltosa, ya que generalmente utiliza de manera preferencial el lactato en lugar de glucosa cuando ambos están presentes. Mientras que otro organismo fermentador predominante como *Selenomonas ruminantium* subsp. lactilytica, fermenta en primer lugar glucosa, sacarosa y xilano antes de utilizar el ácido láctico (Counotte, 1981).

De acuerdo a sus características *M. elsdenii* es una bacteria candidata a uso como probiótico en aquellos animales sometidos a un cambio rápido de dieta, de una basada en forraje a una ración ricas en granos ,debido a las implicancias en la salud de los animales enfrentados a estas prácticas de manejo (Klive et al., 2003).

Wolinella succinogenes (anteriormente *Vibrio succinogenes*) es otra bacteria fermentadora de ácidos, cuyas células son pequeñas, Gram negativo, anaerobio, que obtiene energía mediante el acoplamiento de la oxidación de H₂ o formiato con la reducción de fumarato, malato, nitrato u otros aceptores de electrones, produciendo succinato, CO₂ y H₂S (Hungate, 1966).

Veillonella parvula (anteriormente *V. alcalescens*) es un micrococo Gram negativo, no móvil, que fermenta D,L-lactato, piruvato, L-malato, fumarato, pero es incapaz de fermentar carbohidratos. Los productos de la fermentación del lactato son acetato, propionato, CO₂ y H₂. Su contribución en la degradación del ácido láctico es mucho menor en comparación a la de *M. elsdenii* (Hobson, 1988).

Por último, otro microorganismo fermentador de lactato en el rumen es *Selenomonas ruminantium*, una bacteria Gram negativa, anaerobia, que constituye del 22 al 51% de bacterias cultivables totales. Es capaz de fermentar muchos azúcares como ser glucosa, sacarosa y xilosa, antes de fermentar lactato. Sus cepas se pueden agrupar en dos subespecies dependiendo si fermentan glicerol y lactato. Si lo fermentan se les denomina *Selenomonas ruminantium* subsp. lactilytica y si no lo hacen *Selenomonas ruminantium* subespecie *ruminantium* (Hobson,1988).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

2.11 *Bacterias que utilizan azúcares solubles*

Los lactobacilos son bacterias utilizadoras de azúcares, particularmente prominentes miembros de la microbiota de rumiantes jóvenes, así como también abundantes en compañía de *Streptococcus* spp. en aquellos animales alimentados con raciones conteniendo grandes cantidades de carbohidratos rápidamente fermentables. Muchos son homofermentativos y cuando en el rumen se dan condiciones ácidas, su desarrollo es importante. La leche que ingresa al rumen de los terneros jóvenes sufre un tipo de fermentación láctica que produce una acidez que inhibe el crecimiento de la mayoría de los anaerobios, pero que permite el desarrollo de los lactobacilos.

Dos especies de importancia son *Lactobacillus vitulinus* y *Lactobacillus ruminis* ambas especies requieren condiciones de anaerobiosis para su crecimiento. *L. ruminis* es un bastón Gram positivo, móvil, productor de ácido láctico, que es capaz de fermentar una gran cantidad de azúcares entre ellos sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa. *L. vitulinus* es un bastón no móvil, Gram positivo que fermenta un rango similar de sustratos al de *L. ruminis* (Hungate, 1966; Hobson, 1988).

Treponema bryantii es una espiroqueta ruminal incapaz de degradar celulosa, aminoácidos, pectinas o almidón pero utilizadora de la glucosa y la celobiosa liberadas al ambiente ruminal a partir de las actividades metabólicas de las bacterias celulolíticas. Es una bacteria anaerobia estricta con forma de bastón helicoidal, Gram negativo, móvil con uno flagelo periplasmático insertado en cada extremo de la célula. Al interactuar con las bacterias celulolíticas es capaz de utilizar como fuente de carbono y energía los azúcares solubles liberados a partir de la degradación de la celulosa (Hobson, 1988).

2.12 *Bacterias proteolíticas*

El catabolismo de las proteínas y aminoácidos que produce amonio en el rumen es de gran interés nutricional para el animal. Asimismo es requerido por microorganismos fermentadores, algunos de los cuales pueden utilizar también aminoácidos o péptidos.

Los microorganismos ruminales degradan más de la mitad de las proteínas consumidas mediante proteasas que se encuentran principalmente sobre la superficie celular. El primer paso de la lisis es la adsorción de la proteína soluble o insoluble a la superficie celular, luego las proteasas desdoblan las proteínas en péptidos y algunos aminoácidos

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

libres, los que son luego absorbidos por el microorganismo. La acumulación de los péptidos o no en el fluido ruminal depende de la naturaleza de la proteína.

Una vez incorporados, los péptidos son hidrolizados por peptidasas hasta aminoácidos, los cuales pueden ser empleados para sintetizar proteína microbiana o son utilizados como fuente energética, en cuyo caso separan el grupo amino del aminoácido, lo liberan al medio ruminal como un producto de desecho y emplean la cadena carbonada para obtener energía como si se tratara de un hidrato de carbono. Los grupos amino libres se convierten, por adiciones de H^+ en el ambiente reductor del rumen, en amoníaco y luego en amonio, por lo cual la concentración de este último sirve como un indicador de la actividad proteolítica en el rumen. No es común que especies bacterianas del rumen utilicen a las proteínas como fuente de energía, pero entre el 30 al 50% de las bacterias aisladas a partir del fluido ruminal tienen actividad proteolítica frente a proteínas extracelulares.

La proteólisis ruminal puede resultar en una pérdida de proteína dietaria de alta calidad que podría de otra manera ser digerida y absorbida directamente en el intestino delgado de los rumiantes (Brock et al., 1982).

Una de las especies aisladas con actividad proteolítica más activa es *Ruminobacter amylophilus* cuya actividad está tanto asociada como no a sus células. Las bacterias más importantes productoras de proteasas en el rumen son Gram negativos e incluyen especies de los géneros *Prevotella*, *Selenomonas* y *Butyrivibrio*. Otras especies, probablemente de menor importancia son *Megasphaera elsdenii*, *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., *Lachnospira multiparus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Spirochaetes* y *S. bovis*. Esta última juega un rol importante en la proteólisis que tiene lugar en el rumen, especialmente en dietas altamente concentradas (Hobson, 1988).

Como resultado de la actividad proteolítica extracelular se producen péptidos y aminoácidos libres; la tasa a la cual son transportados al interior celular, depende de la disponibilidad de energía. Si la energía está disponible, los aminoácidos pueden ser transaminados o utilizados para la síntesis de proteína, si la energía es limitante son desaminados y sus esqueletos de carbono fermentados hacia AGV. Sin embargo los aminoácidos libres no son incorporados habitualmente a la proteína microbiana, sino que son rápidamente desaminados para producir principalmente amonio, fuente importante de

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

nitrógeno para la síntesis de proteína, por tanto esencial para el crecimiento de microorganismos ruminales (Bach et al., 2005).

Bacterias capaces de asimilar directamente al menos algún aminoácido incluyen *S. bovis*, *F. succinogenes*, *Eubacterium* spp., *Selenomonas* spp., *B. fibrisolvens*, *M. elsdenii*, *S. dextrinosolvens*, *Lactobacillus* spp. y *Prevotella ruminicola* (Hungate, 1966). *Prevotella ruminicola* es la bacteria productora de amonio mas importante en el rumen de bovinos adultos (Bach et al., 2005).

El primer paso en la asimilación del amonio es el transporte hacia el interior a través de la membrana celular. Cuando la concentración de nitrógeno es limitante en el rumen, se utiliza la ruta del sistema enzimático glutamina sintetasa y glutamato sintasa para su asimilación, el cual es dependiente de energía. Este sistema enzimático posee una alta afinidad por el amonio, lo que proveería de una ventaja a los organismos que lo poseen, ya que se adecuan bien a los niveles bajos de amonio en el ambiente ruminal. En cambio en condiciones habituales de producción, el sistema que predomina es el de glutamato deshidrogenasa, el cual no requiere del aporte de energía en forma de ATP y poseer una afinidad relativamente pobre al amonio. Los distintos mecanismos enzimáticos para la asimilación de amonio probablemente reflejan distintos nichos que los microorganismos pueden ocupar. Una vez que el nitrógeno se fija a un componente apropiado como el ácido glutámico, este nitrógeno es transferido a un esqueleto carbonado específico, dando comienzo a la síntesis *de novo* de aminoácidos bacterianos (Hobson, 1988).

2.13 Bacterias lipolíticas

Los lípidos que se encuentran en la dieta de los rumiantes provienen de los forrajes y de los suplementos añadidos en forma de concentrados. Los lípidos presentes en los forrajes constituyen entre un 6 a 7% del peso seco de las hojas de las plantas forrajeras y consisten mayormente en fosfolípidos y glicolípidos, debido a su naturaleza estructural. A niveles más altos de lípidos en la dieta, la liberación de ácidos grasos por su lipólisis inhibe la digestión de las fibras, posiblemente por recubrimiento superficial de las partículas, lo que limita la adhesión bacteriana.

En el rumen los microorganismos modifican rápidamente los lípidos de la dieta, provocando la hidrólisis de los triglicéridos para dar glicerol y ácidos grasos. Este glicerol tras la fermentación microbiana, dará lugar principalmente al ácido propiónico.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Selenomonas ruminantium subesp. *lactilytica* es un ejemplo de una bacteria fermentadora de glicerol, cuyo principal producto de su fermentación es el ácido propiónico entre otros ácidos.

Los ácidos grasos del tipo insaturados, debido al ambiente fuertemente reductor del retículo-rumen, son hidrogenados para dar lugar a ácidos grasos saturados, que serán posteriormente absorbidos por la pared ruminal y utilizados por el animal. Esta modificación de las grasas es importante, ya que las grasas vegetales son insaturadas. Por ello, tanto la grasa corporal como la presente en la leche en los rumiantes serán ricas en ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos pueden ser utilizados también por las propias bacterias del rumen para formar fosfolípidos, necesarios para la biosíntesis de sus membranas, estos lípidos son luego digeridos y absorbidos en el intestino delgado del animal (Hawke et al., 1968; Hobson, 1988).

No todas las bacterias ruminales son capaces de realizar lipólisis, un ejemplo de quienes si pueden, lo son *Anaerovibrio lipolytica*, la cual es responsable de gran parte de la actividad lipolítica del rumen, es una bacteria capaz de degradar los diferentes componentes lipídicos presentes en la dieta. Se trata de un bastón anaerobio, Gram negativo, curvado y móvil, el cual es capaz de crecer en medio conteniendo aceite de linaza, el cual es hidrolizado para producir glicerol y ácidos grasos libres. Este microorganismo también fermenta glicerol para producir ácido propiónico y succínico, mientras que ribosa, fructosa y D, L-lactato son fermentados principalmente a ácido acético, ácido propiónico y CO₂ (Hobson, 1988; Hungate, 1966).

2.14 Microorganismos metanogénicos

Los organismos metanogénicos predominantes son generalmente Gram positivos pertenecientes al dominio *Archaea*, capaces de crecer en ambientes donde el potencial redox tenga valores por debajo a -300mV. Entre sus principales representantes se encuentran *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi* y *Methanosarcina* spp. las que han sido cultivadas a partir de ambiente ruminal.

En un normal funcionamiento del rumen, el alimento ingerido es fermentado por una comunidad microbiana compleja para dar AGV, NH₄, CO₂ y H₂. Ninguna de las bacterias o

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

protozoos fermentadores producen metano, pero algunos producen formiato, CO₂ y H₂. En el rumen la principal vía de formación de metano es a partir del CO₂ y H₂, ($4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$). El hidrógeno es metabolizado por los metanogénicos, lo que facilita un crecimiento más eficiente de otros microorganismos, la presencia de un patrón favorable en la formación de los AGV y un incremento en la tasa de fermentación tras la eliminación del efecto inhibitorio del H₂ sobre la fermentación microbiana. Por lo tanto este mecanismo juega un rol importante en la función del rumen y en la nutrición animal. La producción de metano a partir de acetato (formado por la conversión de propionato, butirato y otros AGV) no ocurre en el rumen y la producción a partir de AGV es un proceso muy lento.

Aunque H₂, formiato, acetato, metanol, mono, di y trimetilamino, son potenciales sustratos para los metanogénicos, solo el H₂, CO₂ y formiato en menor grado, son usados como precursores del metano. Estos microorganismos poseen un rango óptimo de pH entre 6,5 a 7,0 aproximadamente similar al de bacterias celulolíticas, por lo que están íntimamente relacionados y asociados a la producción de acetato, ya que en la formación de este último se libera CO₂ necesario para la formación del metano (Prescott et al., 1999; Janssen et al., 2008).

El porcentaje molar de los distintos AGV influencia la producción de metano en el rumen, el ácido acético y butírico promueven su producción, mientras que la formación del ácido propiónico puede ser considerada una vía competitiva para el uso del hidrógeno molecular, por lo tanto una vía alternativa para la regeneración de los co- factores oxidados en el rumen, reduciendo la pérdida de energía por formación de metano. El animal obtiene más energía cuando se produce ácido propiónico en relación al ácido acético, ya que la liberación de CH₄ y H₂ es mayor cuando se forma este último (Hobson, 1988).

Methanobrevibacter ruminantium es un cocobacilo corto no móvil, Gram positivo y su principal sustrato es H₂ /CO₂, aunque puede utilizar formiato cuando éste se encuentra en grandes concentraciones por arriba del rango en el rumen. Así como otras arqueobacterias, su pared celular carece de peptidoglicano y su composición química es bastante diferente a la de las eubacterias, siendo el polímero pseudomureína su principal componente (Hobson, 1988; Prescott, 1999).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Methanobrevibacter ruminantium y *Methanosarcina barkeri* son considerados los microorganismos metanogénicos más significativos estando presentes a una tasa mayor de 10^6 /mL en el ambiente ruminal (Kumar et al., 2009).

Los principales factores que afectan la producción de metano en los rumiantes son el pH (el valor óptimo para su obtención es de 7,0 a 7,2), perfil de ácidos grasos volátiles, las estrategias de alimentación, la especie animal y el estrés ambiental.

El grupo de los metanogénicos puede producir más de 200 litros de metano por día en una vaca de 500 kg a partir de 800 litros de H_2 producido, este gas es expelido por el animal junto con el CO_2 y sólo trazas de H_2 se acumulan en la fase gaseosa del rumen, evitando así la acumulación del gas (meteorismo) que lleva a que la distensión de este órgano comprima los pulmones (Hungate, 1966).

La fermentación entérica emite 80 millones de toneladas de metano al año, por lo que este grupo de organismos poseen un rol fundamental en el calentamiento global (Moss et al., 2000). Aproximadamente el 95,5 % del metano producido por los rumiantes es producido en el rumen y la pérdida asociada de energía para el animal ha sido estimada entre el 2 al 15% de la ingesta de energía bruta (Wright et al., 2004), por lo que su producción por parte de los rumiantes tendría perjuicios tanto productivos como ambientales. Cambios en el régimen de alimentación o en las prácticas de producción, podrían remover el presente escenario de la emisión de metano por el ganado y de esta forma mitigar en algo su incremento. Dado que su tiempo de vida media atmosférica es corto, disminuciones en su concentración pueden ser notadas en breve tiempo.

La metanogénesis puede ser directamente inhibida con análogos halogenados del metano, intervención dietaria que produjera una alteración en los perfiles de AGV producidos a nivel ruminal (más propionato y menos acetato), suplementación con "buffers" u otras sustancias modificadoras del ambiente ruminal. Otra alternativa plausible es la estimulación de la población microbiana acetogénica presente en la parte anterior del aparato digestivo de mamíferos y termitas. Estas bacterias producen ácido acético por reducción del CO_2 con H_2 , desviando al H_2 de la producción de metano (Kumar et al., 2009). Las bacterias acetogénicas son los utilizadores de hidrógeno más importantes en el rumen de terneros jóvenes y luego los microorganismos metanogénicos comienzan a

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

sustituir a los acetogénicos como principales utilizadores de hidrógeno, presumiblemente debido a su mayor afinidad por el H₂ (López et al., 1999).

2.15 Protozoarios

Los protozoarios son los organismos más conspicuos del rumen y se encuentran en una concentración típica que varía entre 10⁴ a 10⁶ protozoos/mL, distribuidos en más de 25 géneros. En dietas altamente concentradas sus valores pueden bajar a 10² a 10³ protozoos/mL y van disminuyendo su número desde el nacimiento a la madurez del animal. La actividad celulolítica la realizan por medio de la microbiota bacteriana asociada, liberando como productos finales de la fermentación principalmente acetato, butirato e H₂. Son proteolíticos y se alimentan de bacterias, por lo que son capaces de degradar proteína microbiana contribuyendo a aumentar el amonio del rumen. Pueden llegar a contener del 10 al 40% del nitrógeno total del rumen, siendo las bacterias la principal fuente de componentes nitrogenados para su crecimiento (Hobson, 1988; Frioni, 2006).

La mayoría de los protozoos encontrados en el rumen son ciliados, aunque también se encuentran regularmente algunas especies de pequeños flagelados. Los ciliados son los protozoos unicelulares más abundantes en el rumen de los rumiantes adultos y las clases principales son los holotricos (presentan cilias en toda la superficie celular) y los entodinomorfos (las cilias se encuentran restringidas a un solo grupo alrededor de la citofaringe por donde ocurre la entrada de los nutrientes). Los primeros nadan más rápidamente y debido a su gran tamaño son los protozoos principalmente observados cuando se examina el contenido ruminal fresco bajo el microscopio (Hungate, 1966).

Están involucrados en el metabolismo y digestión del material vegetal y juegan un rol importante en el ecosistema microbiano por producir hidrógeno. Poseen requerimientos complejos para su crecimiento lo que dificulta su cultivo en el laboratorio, siendo la técnica PCR real time una aproximación que permite cuantificar la biomasa de protozoarios en el rumen (Skillman et al., 2006).

Los principales géneros holotricos son *Isotricha* y *Dasyticha*, mientras que entodinomorfos encontramos a los géneros *Entodinia* y *Diplodinia* (Hobson, 1988).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Los ciliados difieren de las bacterias en que son capaces de almacenar hidratos de carbono en forma de amilopectina, emplean los aminoácidos de las bacterias tras fagocitarlas y por lo tanto son responsables de gran parte de la producción del amonio en el rumen. A diferencia de las bacterias no son esenciales para los procesos de fermentación pero contribuyen en su eficiencia (Hobson, 1988; Frioni, 2006).

2.16 Hongos

Además de las principales poblaciones bacterianas celulolíticas, el rumen contiene grandes cantidades de hongos fibrolíticos anaerobios estrictos, los cuales fueron descritos por primera vez por Orpin en 1975, quien fue el primero en cultivar de forma exitosa estos organismos poliflagelados bajo condiciones anaerobias.

Su distribución parece estar limitada al tracto digestivo de los herbívoros. Los hongos filamentosos anaerobios son más difíciles de enumerar que las bacterias debido a su estilo de vida dual: zoosporas móviles de vida libre, las cuales se confundieron mucho tiempo con protozoos y el estado vegetativo de adhesión a la fibra, donde desarrolla un cuerpo de fructificación (esporangio) sobre la superficie exterior del fragmento de la planta y filamentos rizoidales que penetran la matriz lignocelulósica, liberando un complejo celulolítico más soluble que en el caso de las bacterias.

Estos hongos producen una amplia variedad de enzimas que pueden digerir los principales carbohidratos estructurales de la pared celular de las plantas. Muchas de estas enzimas que hidrolizan polisacáridos se producen en el estado vegetativo y de zoospora, así como también se encuentran presentes en el medio de cultivo extracelular. En cultivo puro alguno de estos hongos fermentan celulosa, liberando acetato, lactato, CO₂ e H₂. También son capaces de degradar hemicelulosa, xilanos, almidón y azúcares. Su rol principal parece estar relacionado a facilitar la desaparición de la pared celular vegetal mediante fuerza mecánica, acción enzimática o combinación de ambas. La colonización inicial ocurre en sitios donde el tejido se encuentra dañado o a través de los estomas. Son capaces por tanto de ganar acceso a polisacáridos de la planta no disponibles para las bacterias celulolíticas. Este debilitamiento de los tejidos de la planta permite un incremento sustancial de la digestión por parte de las bacterias ruminales, por formación de más sitios disponibles para la colonización bacteriana. Además la actividad

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

de los hongos podría afectar el tiempo de residencia de las partículas en el rumen, debido a su capacidad de reducir el tamaño de los fragmentos vegetales (Hobson, 1988).

Existe una variedad de tipos morfológicos diferentes, pero solo han sido identificados cuatro géneros: *Neocallimastix*, *Piromyces* (formalmente *Phyromonas*), *Caecomyces* (previamente *Sphaeromona*) y *Orpinomyces*.

Su contribución a la biomasa microbiana es baja, como la de los protozoarios, ya que se ubican en la ingesta de lento movimiento, evitando su rápido lavado. No son esenciales para la supervivencia de los rumiantes, pero se piensa que contribuyen a la digestión de los forrajes de baja calidad (Frioni, 2006).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

2.17 *Probióticos*

Los antibióticos se emplean ampliamente en veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos, mientras que también son utilizados como “promotores del crecimiento” ya que pertenecen al amplio grupo de aditivos usados rutinariamente en alimentación animal. Generalmente se administran a dosis subterapéuticas durante largos períodos produciendo una ganancia de peso estimada de un 5%. El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud, aunque se piensa que actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la microbiota intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de afecciones subclínicas y reduciendo la microbiota nativa que compite con el huésped por los nutrientes. Esto conduce por último a una mejora en la productividad y atenúa la mortalidad de los animales (Aarestrup et al., 2001; Torres y Zarazaga, 2002).

Debido al uso generalizado de antibióticos en la alimentación animal y la posibilidad de transferir la resistencia a los mismos hacia bacterias causantes de patologías en humanos, su uso habitual como promotores del crecimiento ha ido perdido la aceptación social (Gustafson y Bowen, 1997). La Unión Europea prohibió el uso no terapéutico de antibióticos en enero del 2006 (Directiva 1831/2003/CEE). En nuestro país el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) prohibió la importación, fabricación, comercialización y uso de alimentos para animales que contengan antibióticos como promotores de crecimiento. Esta prohibición recae sobre especies bovinas y ovinas, de acuerdo al Decreto N° 98/2011 que entró en vigencia a principios de junio del 2011.

Las implicancias de dicha prohibición son varias. Se ha observado un efecto favorable del uso de antibióticos promotores del crecimiento sobre la producción de excretas y de gases, ya que reducen la producción de metano y la excreción de nitrógeno y fósforo. La supresión del su uso en la alimentación del ganado conllevaría a una aumento marcado en dichos desechos. A su vez, también existen implicancias económicas en el sector zootécnico ya que puede ocasionar un aumento de los costos de producción. Estos inconvenientes podrían paliarse si se encuentran alternativas eficaces al uso de estos antibióticos, como ser la implantación de nuevas estrategias de manejo y la utilización de otros agentes que tengan efectos similares a los de los antibióticos promotores del crecimiento sobre los niveles productivos de los animales (Payne, 1981). En el marco de esta situación, el empleo de probióticos podría presentarse como una alternativa segura

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

para sustituir el uso de compuestos antimicrobianos y sustancias químicas en la producción animal.

Se han propuesto muchas definiciones de los probióticos, que tradicionalmente se han considerado como microorganismos vivos que afectan de forma benéfica la salud del huésped tras su ingestión, ya que mejoran el balance de la microbiota intestinal (Fuller, 1989). Una de las definiciones más ampliamente aceptadas en la actualidad es la de "microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios en la salud del huésped" (FAO/WHO, 2002).

Los probióticos han sido suministrados a los animales durante periodos de estrés o baja ingesta de materia seca, asumiendo que el establecimiento de una población microbiana benéfica en el tracto digestivo podría decrecer o prevenir el establecimiento de microorganismos patógenos (NRC, 2001).

El uso de probióticos es una práctica que tiene ya varias décadas (Reid, 1999) y en los últimos años se han realizado abundantes estudios sobre los efectos de la administración de cepas seleccionadas en humanos y animales (Cross, 2002). Miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* y *Propionibacterium* han sido utilizados como probióticos fundamentalmente en especies de animales monogástricos (Jan et al., 2002).

Existen suficientes evidencias que demuestran efectos benéficos de los probióticos en animales de producción, entre los que se encuentran la estimulación del sistema inmune, el aumento de la ganancia del peso corporal, la disminución de diarreas y la mejora de la eficiencia de la conversión del alimento (Patterson et al., 2003).

Existe una serie de criterios microbiológicos que deben cumplir las bacterias probióticas para desempeñar su función. Las bacterias deben ser no patógenas, específicas del hospedero, capaces de sobrevivir, colonizar y ser activos metabólicamente en el sitio de acción. Esto implica ser resistentes al ambiente digestivo, persistente en el tracto gastrointestinal, ser capaces de adherirse al epitelio y de competir con la microbiota residente, entre otras. Además deben cumplir otros criterios de seguridad como ser genéticamente estables, producir sustancias antimicrobianas, desplegar antagonismo frente a bacterias patógenas, modular la respuesta inmune, etc. (Gaggia et al., 2011).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Los resultados de la suplementación con microorganismos son altamente variables debido al gran número de factores que regulan su eficiencia.

Los probióticos juegan un papel importante en mantener la salud intestinal en pre rumiantes, mientras que a nivel ruminal no se han establecido su modo de acción, pero se han sugerido distintos mecanismos. Estos incluyen alterar los patrones de fermentación ruminal mejorando la anaerobiosis, estabilizar el pH previniendo su descenso, incrementar la degradación de celulosa y por lo tanto aportar nutrientes a microorganismos presentes en este microambiente, inhibir el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos, reducir la emisión de metano, incrementar el flujo de nutrientes hacia el intestino delgado, mejorar la digestibilidad de la dieta, entre otros (Ghorbani et al., 2002; Krehbiel et al., 2003; Brashears et al., 2003).

Los principales microorganismos utilizados como probióticos en rumiantes son bacterias y levaduras, ya que los aditivos microbianos facilitan el establecimiento y mantenimiento de una microbiota estable en el tracto gastrointestinal. Estos dos tipos de microorganismos tienen roles específicos en el cuerpo del animal hospedero, en el caso de bacterias como *Lactobacillus* spp., es principalmente responsable de la exclusión de bacterias enterotoxigénicas, mientras que las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* afectan el funcionamiento del rumen. Entre las bacterias, las más usadas son *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. La mayoría de las bacterias probióticas son productoras de ácido láctico, el cual inhibe el crecimiento de enteropatógenos en el tracto gastrointestinal de terneros jóvenes, debido a una disminución del pH del medio, ya que un ambiente ácido es perjudicial para muchos patógenos. Además, algunas cepas probióticas son capaces de producir bacteriocinas (toxinas que inhiben el crecimiento de cepas bacterianas similares o cercanamente relacionadas). Se ha observado una reducción en la incidencia y duración de diarreas en terneros recién nacidos alimentados con leche conteniendo bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus acidophilus* 15 o *Saccharomyces cerevisiae* NDC49 (Agarwal et al., 2002). Entre los patógenos zoonóticos, la cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H17, es una de las principales amenazas a la salud de los rumiantes, siendo el ganado su principal reservorio, lo que tiene gran importancia en la epidemiología de las infecciones humanas ya que es una bacteria patógena transmitida por los alimentos. Terneros de pocas semanas de vida fueron tratados con una mezcla de tres cepas de *E.coli* como bacterias probióticas de exclusión competitiva con el fin de

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

reducir el contenido y la excreción fecal de *E.coli* O157:H17. En dicho ensayo se observó que las *E.coli* utilizadas como probióticos redujeron significativamente o incluso eliminaron la presencia de *E.coli* O157:H17 en las heces de los terneros (Tkalcic et al., 2003). Resultados similares se observaron cuando se suplementó la dieta con aditivos probióticos como *Lactobacillus acidophilus* NPC 747 como una estrategia de intervención antimicrobiana para disminuir la prevalencia y carga de esta bacteria patógena en las heces y cueros de ganados. Los resultados de este estudio sugieren una disminución, aunque no la eliminación, en la excreción fecal de *E.coli* O157:H17 así como la contaminación de los cueros, sin efectos perjudiciales en el rendimiento (Brashears et al., 2003).

Otra estrategia eficaz es la utilización de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, para prevenir o reducir la incidencia de patógenos, mejorando así la inocuidad de los alimentos y la salud de los consumidores (Callaway et al., 2008, Gaggia et al., 2011).

Lactobacillus acidophilus NP51 también ha sido empleado como probiótico para el control del crecimiento de patógenos lo que resultó en una disminución significativa en el recuento de *E. coli* O157:H7 en las heces, sin reducción en la performance del ganado de engorde (Peterson et al., 2007).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Acidosis bovina

En rumiantes adultos, los probióticos son recomendados en situaciones de desbalance poblacional microbiano, como es el caso de vacas lecheras en período de transición. En estos casos, cuando la dieta es abruptamente cambiada desde una basada en forraje a una rica en concentrados, particularmente carbohidratos rápidamente fermentables, la comunidad microbiana se ve forzosamente influenciada.

La rápida acumulación de ácidos grasos volátiles debido a la alta tasa de fermentación de estos sustratos, junto a una limitada capacidad del animal para tamponar el rumen debido a una insuficiente secreción de la saliva, conduce a una inminente disminución del pH ruminal. Se provoca así una disminución en la actividad de bacterias celulolíticas y en la población de protozoarios ciliados, un incremento en el número de bacterias capaces de tolerar valores de pH bajos tales como *Streptococcus bovis* y otros microorganismos productores de ácido láctico y un aumento en las poblaciones microbianas consumidoras de lactato como *Megasphaera elsdenii* que no permiten entonces que este ácido se acumule. Mientras los valores de pH se encuentren entre 5,2 y 5,6 el animal enfrenta una situación de acidosis sub aguda, en la cual decrece de forma marcada la ingesta de materia seca conduciendo a una disminución en la eficiencia de producción de leche. A medida que el pH ruminal continúa disminuyendo, la proporción de *Lactobacillus* spp. aumenta y se eleva por tanto la concentración de lactato, lo que contribuye a que el pH alcance valores por debajo de 5, 2 generando así una disminución en las poblaciones fermentadoras de ácido láctico como *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*. De esta forma se alcanza un estado en el cual los microorganismos productores de ácido láctico sobrepasan a los consumidores lo que provoca en el animal un estado de acidosis aguda. Cuando esta patología progresa, la concentración de AGV declina de forma drástica debido a la destrucción de la microbiota normal y a la dilución del rumen por influjo de fluidos para compensar el incremento de la osmolaridad, lo que causa acidificación de medio ruminal y la alteración de su microbiota normal. Una acidosis grave puede conducir a la muerte del animal. Para evitarla se debe cambiar paulatinamente la alimentación a lo largo de varios días, sustituyendo el forraje por el grano. Una introducción lenta de almidón permite que en vez de *S. bovis*, se seleccionen aquellos microorganismos que producen ácidos grasos volátiles a partir del almidón, lo que evita la

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

interrupción de los procesos bioquímicos normales del rumen (Krause et al., 2005; Nagaraja et al., 2007; Chiquette, 2009).

Para la prevención de la acidosis se han utilizado distintas bacterias como probióticos, como es el caso de *Megasphaera elsdenii*. Esta bacteria ruminal es fermentadora de lactato, ha mostrado un rápido establecimiento tras su inoculación en rumen en ensayos *in vivo* y ha demostrado ser eficiente en la disminución de la concentración de lactato y estabilización del pH ruminal en ganado vacuno cuando se ofreció una dieta basada en granos (Klieve et al., 2003).

Otras bacterias con capacidad de fermentar almidón sin producir lactato pertenecen al género *Propionibacterium*, las cuales convierten lactato y glucosa en acetato y propionato, lo que despierta especial interés ya que éste es el principal precursor de la glucosa.

Estas bacterias han sido utilizadas como probióticos en estudios en los que se pretendía minimizar los riesgos de acidosis en ganado de engorde alimentado con dietas ricas en concentrados. Animales suplementados con estas bacterias utilizadas como probióticos no mostraron efecto sobre el pH ruminal, pero sí en otras variables indicando un decrecimiento en el riesgo de producir acidosis (Ghorbani et al., 2002).

El género *Prevotella* es el más abundante en el rumen de ganado alimentado con dietas con alta proporción de concentrados. Estas bacterias son capaces de fermentar almidón, produciendo succinato el cual es posteriormente metabolizado a propionato en lugar de lactato. En un estudio llevado a cabo por Chiquette y colaboradores se inoculó una cepa de *Prevotella bryantii* (*P. bryantii* 25A) en vacas lecheras durante siete semanas luego del parto y se observó una reducción en la producción del ácido láctico luego de la comida, aunque el pH ruminal no se vio afectado. Esto puede deberse al hecho de que la concentración de AGV se incrementó en aquellos animales inoculados con *P. bryantii* 25A, que podría contrarrestar el efecto de la disminución en la concentración del lactato (Chiquette et al., 2008).

Los probióticos usados comercialmente en rumiantes adultos se basan fundamentalmente en preparaciones de levaduras vivas de *S. cerevisiae* y *Saccharomyces boulardi*, que contienen células deshidratadas para preservar su viabilidad y actividad metabólica o cultivos que contienen la levadura, el medio de cultivo y sus productos de fermentación.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

El hongo *Aspergillus oryzae* se utiliza comercialmente un extracto de la fermentación de este, incluyendo el medio de cultivo junto con sus productos de fermentación, aunque sin garantía de que las células del hongo estén vivas. El mecanismo principal de acción de este hongo, parece relacionarse con su capacidad de estimular la degradabilidad de la fibra en el rumen, mediante el estímulo directo del hongo celulolítico *Neocalimastix frontalis*. La suplementación con *A. oryzae in vitro* resultó en un incremento del 27% en la masa celular de *N. frontalis* (Welch et al., 1996). Los hongos presentes en el rumen tienen una actividad celulolítica elevada, por lo que el papel en la digestión de la fibra es probablemente estratégico, abriendo vías de degradación en las paredes celulares, permitiendo el acceso a otras bacterias celulolíticas que son las que realizan la mayor parte de la digestión cuantitativa de la fibra. El aumento en la degradabilidad de la fibra resulta en el aumento en la concentración de AGV y cambios en el perfil de AGV individuales (Martin y Nisbet, 1992).

El efecto de las levaduras en el caso de los animales rumiantes es múltiple y complejo y se explica por diferentes mecanismos de acción: estimulación del crecimiento bacteriano, el cual puede ser explicado por el suministro de factores de crecimiento tales como ácidos orgánicos, vitaminas y aminoácidos entre otros, así como el consumo del oxígeno residual disponible en el medio ruminal mediante la actividad de respiración, protegiendo así a las bacterias anaeróbicas más estrictas. Debido a que las levaduras son microorganismos aerobios, pueden llegar a prosperar en el oxígeno atrapado en la fracción sólida del contenido ruminal, asociándose de manera íntima con las partículas sólidas, alrededor de las cuales se crea un micro consorcio, dando lugar a un microambiente más anaerobio, lo que favorece el crecimiento de bacterias residentes. Estos microorganismos disminuyen la presión parcial del oxígeno en el rumen, lo que favorece la conversión del lactato a propionato conduciendo a la estabilización del pH ruminal, que es benéfico para el crecimiento de microorganismos celulolíticos ácido sensibles.

De esta forma se estimula el crecimiento de bacterias celulolíticas, su adhesión a las partículas de fibra y aumentar la tasa inicial de digestión de la celulosa, puede explicar el incremento de la ingesta de materia seca, observado cuando se suplementa el alimento con levaduras en animales de producción.

En estudios *in vitro* se han reportado la estimulación de poblaciones celulolíticas ruminales y el incremento de la actividad enzimática, con un aumento de entre dos a

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

cuatro veces en la cantidad de copias del gen que codifica para el ARNr 16S de *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens* en ovinos suplementados con levaduras utilizadas como probióticos (Mosoni et al., 2007).

Las bacterias productoras de lactato compiten con las levaduras por la obtención de glucosa y oligosacáridos, disminuyendo la producción de lactato y liberando al medio ruminal ácido málico que favorece el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*. Como consecuencia de estas acciones, el pH ruminal se estabiliza y se impide así el descenso acusado del mismo cuando se administran raciones ricas en concentrados y se aumenta la degradación de la fibra debido a la proliferación de las bacterias fibrolíticas que resulta en un incremento en su digestión y en la producción de AGV (Scott y Nisbeti, 1992; Chiquette, 2009).

La suplementación de levaduras en vacas lecheras consumiendo una dieta basada en forraje y mezcla de concentrados a dos niveles de inclusión, mostró disminuir la concentración de lactato en rumen, ya sea por la competencia con *Streptococcus bovis* por la fermentación del almidón o por estimular el crecimiento de poblaciones bacterianas utilizadoras de lactato, por lo que la presencia del probiótico alteró algunos patrones de la fermentación ruminal. También se observaron incrementos marcados en la producción de leche como resultado de un aumento en la ingesta de la materia seca en comparación con vacas que no recibieron el suplemento de probióticos utilizadas como control (Williams et al., 1991).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

3. HIPÓTESIS

Distintas cepas bacterianas con capacidad potencial como probióticos serían capaces de modular la fermentación microbiana ruminal, lo cual conllevaría a un aumento en la eficiencia en el aprovechamiento del alimento ingerido por el animal.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial probiótico de cepas potencialmente fibrolíticas nativas del rumen para incrementar la eficiencia de la fermentación ruminal.

Objetivos Particulares

1. Cultivar y caracterizar bacterias potencialmente fibrolíticas, aisladas del rumen de un bovino.
2. Identificar las bacterias ruminales por medio de la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.
3. Determinar la cinética de producción de gas y pH *in vitro* en función del sustrato y el tiempo de incubación asociado a la adición de bacterias ruminales fibrolíticas.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para el cultivo de bacterias ruminales y su mantenimiento se utilizó un medio modificado de Stahl et al., 1988 (el cual será referido como MS en el texto) o un medio selectivo para el recuento de bacterias celulolíticas sin otros carbohidratos ni ácidos grasos y con celulosa microcristalina como principal fuente de carbono y energía (MS-C). La composición de los mismos se describe en la Tabla 5.1.

La preparación e inoculación del medio y de los viales con solución tampón salina fosfatada (PBS) para realizar las diluciones se llevaron a cabo bajo condiciones de anaerobiosis, las cuales se obtuvieron por desplazamiento de aire mediante CO₂ libre de oxígeno previo a la esterilización, así como también por la presencia de agentes reductores (cisteína y sulfuro de sodio) en el medio de cultivo. Los medios se envasaron y esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 120°C (Hungate, 1966).

Tabla 5.1. Composición de medio (MS) y medio para bacterias utilizadoras de celulosa (MS-C).

Ingrediente (cantidad cada 500 mL)	Medio base (MS)⁺	Medio celulosa (MSC)⁶⁺
Solución A ¹	83 mL	83 mL
Solución B ¹	83 mL	83 mL
Fluido ruminal clarificado ²	100 mL	100 mL
Extracto de levadura	250 mg	100 mg
Triptona	250 mg	250 mg
Glucosa	0,5 g	
Almidón	0,5 g	
Maltosa	0,5 g	
Celobiosa	0,5 g	
Xilosa	0,5 g	
Mezcla de ácidos grasos ³	0,31 mL	0,31 mL
Solución A de vitaminas ⁴	0,01 mL	0,01mL
Solución B de vitaminas ⁴	0,05 mL	0,05 mL
Solución de vitaminas lábiles ^{4*}		
Solución Reductora ^{5*}		
Resarzurina	0,5 mg	0,5 mg
Avicel		10%

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

¹ Macy et al., 1982.

² Gruub et al., 1976.

³ Modificado de Macy et al., 1982. No contiene ácido isobutírico DL- α -metilbutírico.

⁴ Modificado de Scott et al., 1964 Stock de Solución A contiene: piridoxina clorhidrato 0,1 mg/mL, riboflavina 0,1 mg/mL, tiamina clorhidrato 0,1 mg/mL, nictinamina 0,1 mg/mL, Ca-D-pantotetato 0,1 mg/mL y ácido p-aminobenzoico 5×10^{-3} mg/mL Stock Solución B: vitamina B12 0,25 mg/mL. Stock Solución C: ácido fólico 0,5 mg/mL y biotina 0,5 mg/mL, se esteriliza por filtración al ser vitaminas lábiles.

⁵ Para 1L de solución stock: hervir 1L de H₂O durante 10 min. y enfriar bajo corriente de CO₂. Añadir 12,5g de cisteína, disolver y ajustar el pH a 9 con NaOH 12 M. Agregar 12,5g de Na₂S y gasear antes de autoclavar. Sulfuro-cisteína 0,5g/L de medio modificado de Alonso, C., 2001.

⁶ Modificado de Stahl et al., 1988.

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

+ pH ajustado a 6,5 con NaHCO₃.

5.2 Tratamiento de cepas celulolíticas a ensayar

Las cepas bacterianas de origen ruminal identificadas como 3C20C, 4C50C, 4C55C, 4C60C, 4C62C, 3F21C y 3F22C pertenecientes a la colección del Departamento de Microbiología del IIBCE preservadas a -80 °C se recuperaron en el medio modificado de Stahl et al., 1988. A partir del cultivo bacteriano crecido se prepararon diluciones seriadas (10^{-5} a 10^{-7}) en viales con 9 o 9,9 mL según la dilución de PBS junto con 100 μ L de solución reductora.

Para el cultivo y recuento de bacterias ruminales se empleó la técnica de "roll in tube" (Hungate, 1966; Macy et al., 1982; Stahl et al., 1988) donde se inocularon 100 μ L de la dilución bacteriana mediante utilización de jeringas estériles descartables, lavadas con solución reductora 0,25g/L de Na₂S-cisteína a viales conteniendo medio MS suplementado con agar (1,88%) previamente fundido a 45 °C conteniendo 100 μ L de vitaminas lábiles y 100 μ L de solución reductora. Una vez inoculado el vial, este se hizo rodar sobre una superficie fría hasta que el agar solidificara. De ese modo las bacterias quedaron incluidas en el agar solidificado sobre las paredes del recipiente; por último se incubaron en posición vertical a 39 °C por 24 horas.

Posteriormente las colonias se repicaron utilizando jeringas lavadas con solución reductora a modo de saca bocado y cada colonia se inoculó en un nuevo vial conteniendo caldo MS para asegurarse la obtención de un cultivo puro necesario para la posterior extracción del ADN genómico. Tras 24 horas de incubación se realizó coloración de Gram y se observó la morfología bacteriana mediante microscopía óptica.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

5.3 Recuento bacteriano

Mediante la visualización directa de las colonias incluidas en el agar sobre la cara interna del vial se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC), el cual se informó como UFC/mL teniendo en cuenta el inverso de la dilución y el del volumen inoculado.

5.4 Identificación molecular

Con el fin de identificar desde un punto de vista molecular las cepas de interés, se amplificó por PCR el gen que codifica para el ARN 16S, para lo cual se extrajo el ADN genómico empleando el sistema comercial *Gen Elute bacterial genomic DNA extraction kit* (Sigma, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación del ADNr 16S se utilizaron los cebadores universales para el Dominio Bacteria 27 F (5-AGATTGATCMTGGCTAGGGA-3) y 1492 R (5 TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3).

Las mezclas de PCR consistieron en 2,5 µL de buffer de la ADN polimerasa, 0,5 µL de desoxinucleosidos trifosfato (dNTPs) Mix 10mM, 0,3 µL de cada cebador, 2 µL de ADN molde, 1,5 µL de MgCl₂ 50mM y 0,2 µL de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas, Brasil) en un volumen final de 75 µL. El programa de PCR consistió de un ciclo inicial de 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min y 30 seg. y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo por un termociclador T1 (Biometra, Alemania) y los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%) teñidos con bromuro de etidio (concentración final 1µg/mL). La purificación y secuenciación de los fragmentos se realizó en MacroGen Inc. (Seoul, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa Bioedit y se compararon con secuencias ya publicadas en la base de datos *Genbank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando la herramienta informática BLASTn con el fin de determinar la identidad de los aislamientos (Tabla 5.2).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

5.5 Ensayo de fermentadores *in vitro* de cepas fibrolíticas con potencial probiótico

Se realizó un ensayo de producción de gas *in vitro* para así evaluar el potencial efecto de las cepas seleccionadas para modular la fermentación ruminal, siguiendo el procedimiento descrito por Mauricio et al. (1999). Las cepas utilizadas en este ensayo fueron seleccionadas a partir de una colección de 41 aislamientos aislados del medio selectivo MS-C y por poseer actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp. (Tabla 6.1). Este ensayo fue realizado previamente en el Departamento de Microbiología del IIBCE.

Los sistemas de fermentación *in vitro* consistieron en frascos de 125 mL de capacidad, cerrados herméticamente con tapón de goma y precinto. Cada frasco contenía 10 mL de líquido ruminal, 500 mg de sustrato: paja de trigo molida, celulosa microcristalina (Avicel) o xilano de avena (Sigma), 40 mL de solución "buffer" (saliva artificial) propuesto por Williams et al., 2005, la cual se elaboró por frasco con 38 mL de solución basal (Tabla 5.2) a la que se le añadió 2 mL de solución de bicarbonato (82g de Na₂CO₃ en 1 L de agua destilada bajo atmósfera saturada por CO₂) y 0,5mL del agente reductor (20,5 g de Na₂S·9H₂O) en 1 L de agua destilada hervida y enfriada con CO₂).

Tabla 5.2. Solución basal

KCl	0.6 g
NaCl	0.6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1,46 g
Na ₂ HPO ₄	3.55 g
Solución minerales traza ²	10 ml
Solución Hemina ¹	10 ml
Agua destilada	1 L

¹ Se disuelve 0,1 g de Hemina en una pequeña cantidad de NaOH 0,05 M y se lleva a 1 L con agua destilada hervida (con CO₂ burbujeando).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

² Solución minerales traza

MnCl ₂ .4H ₂ O	0.025 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.020 g
ZnCl ₂	0.025 g
CuCl.2H ₂ O	0.025 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.050 g
SeO ₂	0.050 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0.250 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250 g
NaVO ₃	0.0314 g
H ₃ BO ₃	0.250 g

Se disuelve en este orden en HCl 0.02M y se lleva a 1L.

Los viales utilizados como fermentadores fueron dosificados en el laboratorio del Departamento de Microbiología del IIBCE con los distintos sustratos, 40 mL de la solución buffer, utilizada como saliva artificial y 0,1mL de solución reductora (Na₂S) y refrigerados a 4°C durante 12 horas antes de su traslado para su hidratación.

Al día siguiente se extrajo el fluido ruminal fresco del fondo del saco dorsal ruminal de un bovino hembra Holstein canulada perteneciente al Campo Experimental N°2, Libertad, de la Facultad de Veterinaria (UdelaR). La dieta del animal consistía exclusivamente en heno de pradera, 24 horas previas a la extracción del fluido ruminal el animal fue sometido ayuno. La muestra fue filtrada utilizando cuatro paños de quesería y luego gaseada con CO₂ para mantener las condiciones de ausencia de oxígeno del fluido, luego se midió el pH y temperatura de la misma. Los frascos fueron previamente precalentados a 39 °C, luego se adicionaron 10 mL de líquido ruminal y 1 mL del inóculo con la dilución adecuada del cultivo crecido en caldo rumen de la cepa potencialmente probiótica a ensayar de manera de obtener una suspensión final de 10⁶ células/mL. Los frascos fueron nuevamente saturados con CO₂, tapados con tapón de goma y finalmente cerrados herméticamente con precinto de aluminio y se incubaron a 39°C en baño de agua por un intervalo de tiempo variable entre 0 y 96 horas.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Se utilizó un control para cada uno de los sustratos con todos los componentes menos las cepas a evaluar y un blanco sin adición de sustrato ni cepa. Los blancos y controles se descontaron adecuadamente, lo que permitió corregir los valores de liberación de gases. Las cepas fueron unidades estadísticas y cada una se testeó con los tres sustratos por triplicado, con un total de 83 frascos a incubar.

Para el posterior recuento de bacterias mediante la tinción con DAPI se fijó 1 mL de la dilución en 1 mL de etanol.

5.6 Lecturas de producción de gas

La presión originada por los gases acumulados en la parte superior de cada frasco como producto de la fermentación se registró mediante un manómetro digital manual (Cole Parmer Instruments Co.) provisto de una aguja hipodérmica de 0,6 mm a los tiempos 2, 4, 6, 8, 10, 18, 24, 48, 72 y 96 horas luego de la inoculación.

En la hora 96 se realizó la última medida de gas y se efectuó la apertura de los viales en los cuales se midió el pH de cada frasco.

5.7 Procesamiento y análisis de datos

La presión de gas interna de los frascos fue registrada en psi (P), fue convertida a volumen de gas producido según Britos et al., 2008, por una ecuación predictiva: $V = 4,40 P + 0,09P^2$.

Para estimar la evolución de la producción de gas, los datos de presión obtenidos se ajustaron a un modelo bicompartimental (Schofield et al., 1994) en el cual V_r es volumen de gas producido por la degradación de la fracción soluble, K_{dr} es la tasa de degradación de la fracción soluble, V_l : volumen de gas producido durante la degradación de la fracción no soluble, K_{dl} es la tasa de degradación de la fracción no soluble y L la fase Lag. Para ello se utilizó el paquete estadístico del SAS® (SAS Institute, Cary, USA, 2000).

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

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Los parámetros obtenidos del modelo utilizado para describir la cinética de producción de gas en los fermentadores se muestran en la Tabla 4.

Los parámetros de fermentación se compararon entre las distintas muestras mediante el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS[®], las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

5.8 Recuento de microorganismos presentes en el inóculo por tinción con DAPI

Se filtraron directamente 20 μL o una dilución adecuada de las muestras utilizando filtros ISOPORE 0,2 μm GTTP (MILLIPORE, Irlanda). Luego se cortaron secciones del filtro correspondiente a cada muestra, las cuales se colocaron en placas de Petri con el filtrado hacia arriba y cada una fue cubierta con 50 μL de solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron con etanol (80%) por varios minutos y posteriormente con agua destilada estéril; finalmente se dejaron secar. Las secciones de filtro se montaron sobre un portaobjetos con Citifluor[™] (Citifluor, Ltd.) y se conservaron a -20°C en la oscuridad.

Para la observación microscópica de las bacterias se utilizó un microscopio de epifluorescencia (BX51, Olympus) equipado con filtros FLUBE FITC (Olympus) con el fin de observar la emisión de la fluorescencia, donde se contaron campos suficientes hasta las 1000 células utilizando una grilla de $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ de área.

En la Tabla 6.1 se muestran los recuentos bacterianos, para su cálculo se tuvo en cuenta por lo tanto el número de campos contados, el área del campo, el área del filtro de 17,3 cm^2 y la dilución filtrada.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de las cepas potencialmente probióticas

Las cepas de interés se identificaron a nivel molecular mediante la amplificación por PCR y secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S a partir del ADN genómico de 7 cepas seleccionadas por crecer en medio con celulosa microcristalina como principal fuente de C y energía. El producto obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa para posterior visualización del fragmento esperado. En todos los casos se obtuvo una sola banda del tamaño predicho (alrededor de 1500 pb, figura 6.1).

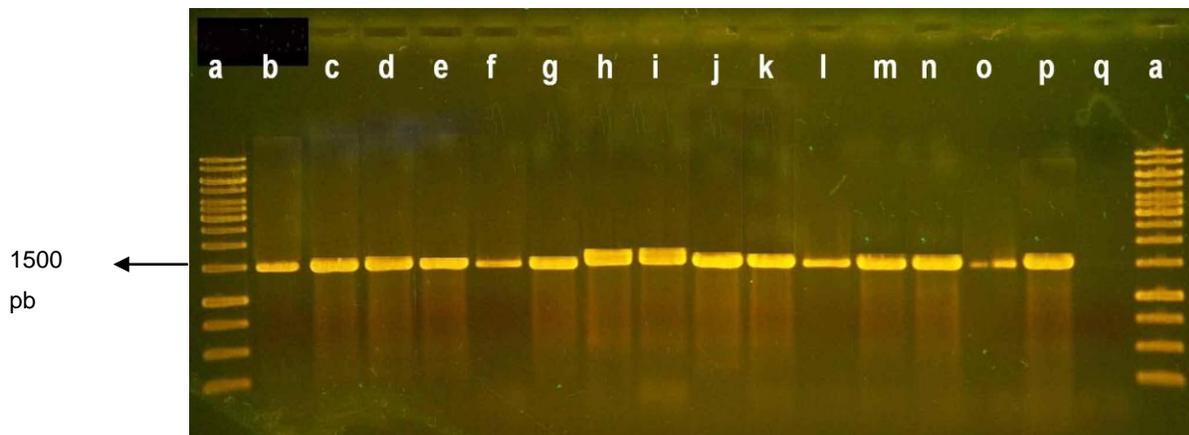


Fig. 6.1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al del gen que codifica para el ARNr 16S (1500 pb). (a) Ladder (GeneRuler™ 1 kb DNALadder, Fermentas, USA); (b) 3C20C; (c) 4C50C; (d) 4C55C; (e) 4C60C; (f) 3F21C; (g) 3F22C; (h) 4C62C; (i) 2C1; (j) 2C4; (k) 2C6; (l) 3C5; (m) 3F20C; (n) 4C53C; (o) 4C52C; (q) control negativo.

Las cepas aisladas fueron identificadas en este trabajo en base a la comparación con la base de datos del *GenBank*; sus identidades son presentadas en la Tabla 6.1.

6.2 Cuantificación del inóculo mediante tinción con DAPI

La técnica de recuento mediante tinción con DAPI se utilizó para estimar la concentración del inóculo utilizado en los fermentadores como sistemas de simulación de la digestión ruminal; los valores obtenidos también se muestran en la Tabla 6.1. En la figura 6.2 se muestra una micrografía de epifluorescencia de células bacterianas marcadas con DAPI.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Tabla 6.1. Identidad de las cepas utilizadas en el ensayo *in vitro* y recuento mediante la técnica DAPI de la concentración del inóculo.

Nº de aislamiento	Identidad	Recuento por DAPI del inóculo (log células/mL)	<i>S.bovis</i> *	<i>E.coli</i> *
3C20C	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	8,11	+	+
4C50C	<i>P. ruminis</i>	8,38	-	-
4C55C	<i>P. ruminis</i>	8,29	+	+
4C60C	<i>P. ruminis</i>	8,51	+	+
3F21C	<i>Lachnospiraceae</i>	8,73	-	-
3F22C	<i>Lachnospiraceae</i>	8,46	-	+
4C62C	<i>P. ruminis</i>	8,25	-	-
4C50C+4C62C	<i>P. ruminis</i>	8,9		

* El ensayo de efecto antimicrobiano no fue realizado en esta tesis, los datos se presentan a modo informativo.

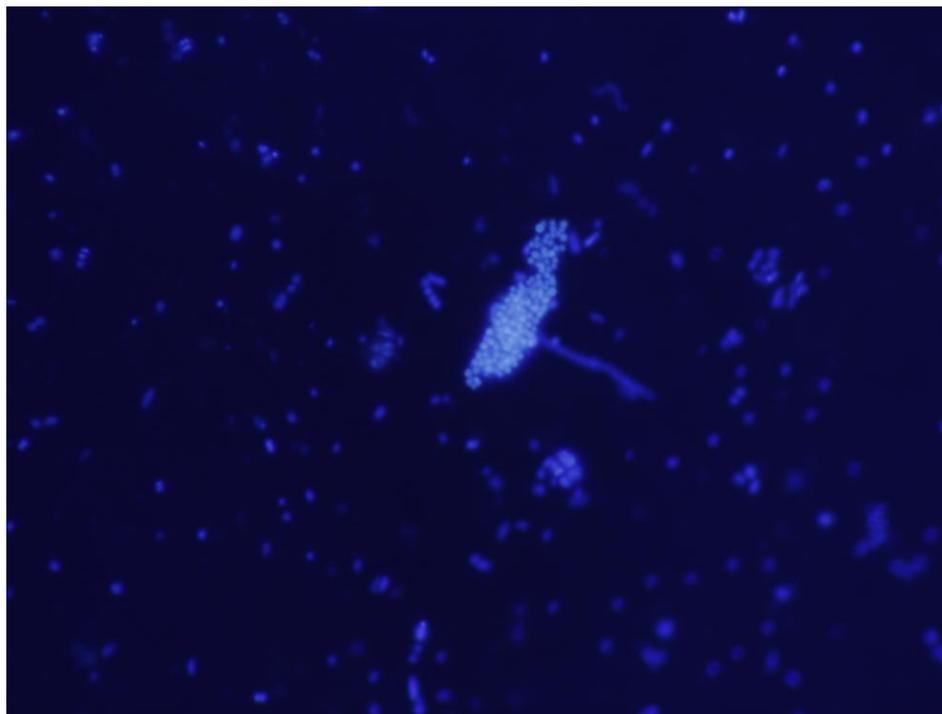


Figura 6.2. Micrografía de epifluorescencia de células teñidas con DAPI.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

6.3 Producción de gas "in vitro"

La presión de gas interna de los fermentadores fue convertida a volumen de gas producido, de acuerdo a lo expuesto en Materiales y Métodos. En las figuras 6.3, 6.4 y 6.5 se observa la curva obtenida al graficar el volumen de gas acumulado con respecto al tiempo de incubación para los sustratos paja de trigo, celulosa microcristalina (Avicel) y xilano de avena, respectivamente.

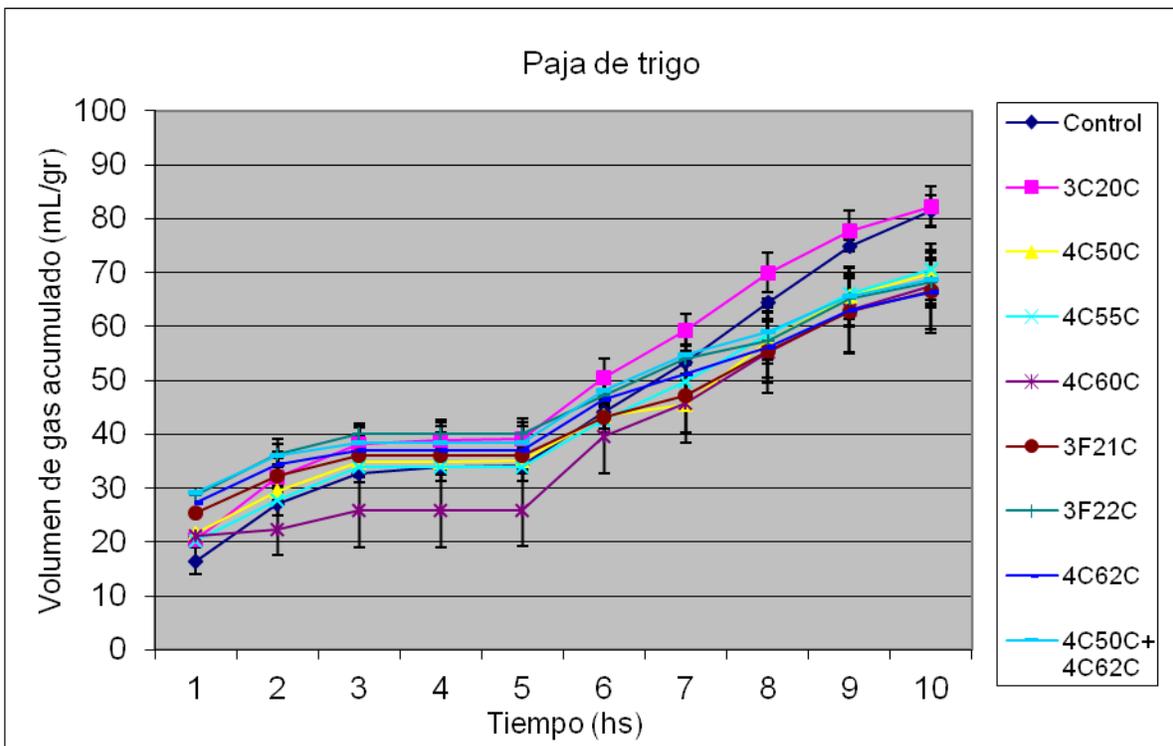


Figura 6.3. Volumen de gas acumulado (mL/gr de sustrato) en la parte superior del fermentador vs el tiempo de incubación (hs) cuando el sustrato fermentado fue la paja de trigo. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

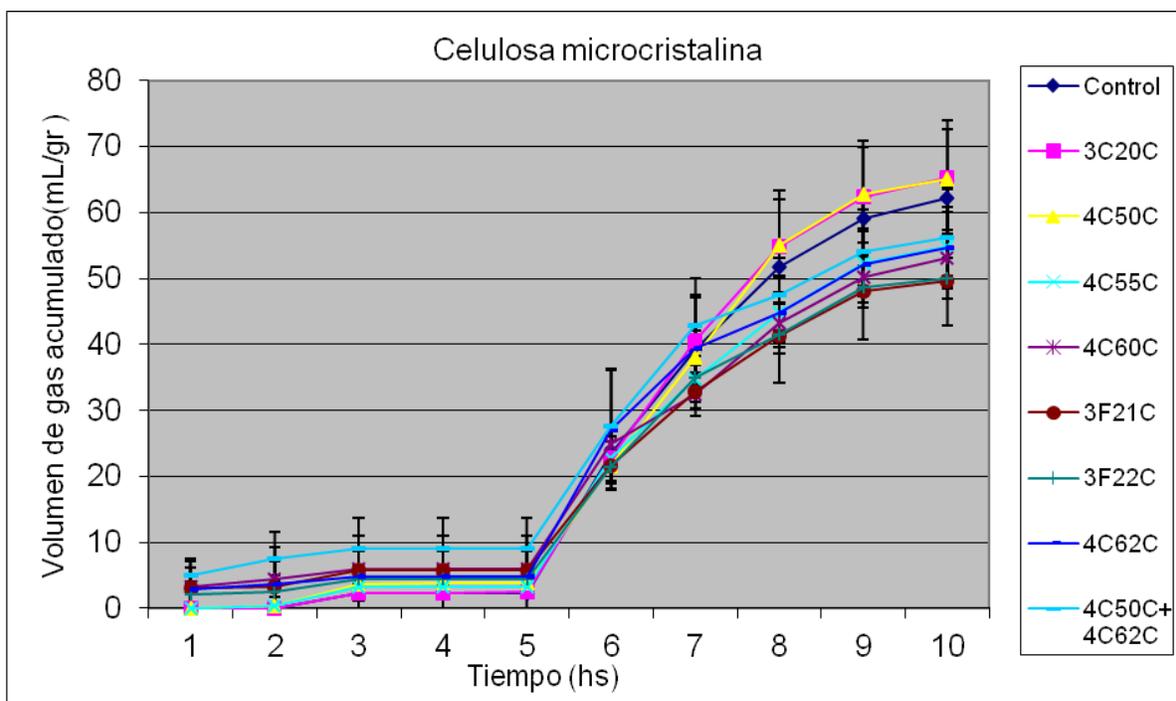


Figura 6.4. Volumen de gas acumulado mL/gr de sustrato en la parte superior del fermentador vs el tiempo de incubación (hs) cuando el sustrato fermentado fue celulosa microcristalina. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

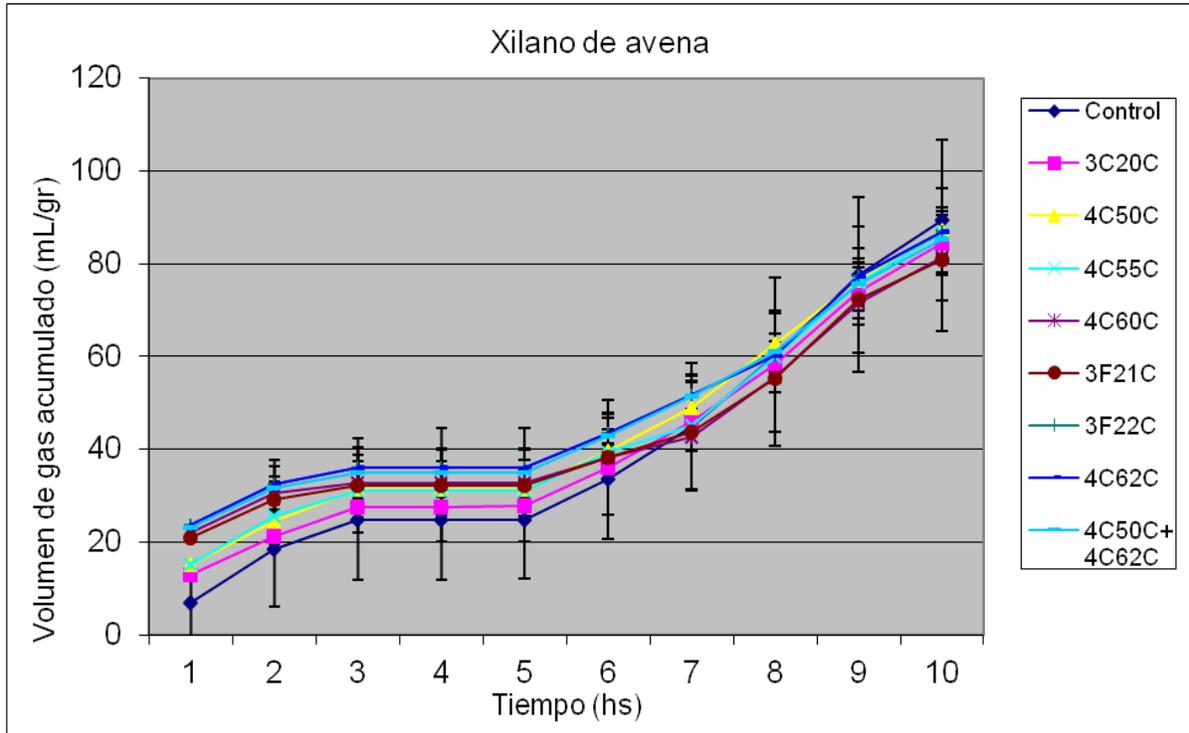


Figura 6.5. Volumen de gas acumulado mL/gr de sustrato en la parte superior del fermentador vs el tiempo de incubación (hs) cuando el sustrato fermentado fue xilano de avena. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

Los datos de volumen de gas producido se ajustaron de acuerdo a un modelo bicompartimental logístico (Schofield et al., 1994) y los parámetros obtenidos se utilizaron para describir la cinética de producción de gas en los fermentadores; los datos se muestran en la Tabla 6.2.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Tabla 6.2. Parámetros de cinética de gases del ensayo de fermentadores "in vitro" de acuerdo al modelo propuesto por Schofield y colaboradores.

Cepa	Vt	Vfr	Kdr	Vfl	Kdl	L	pH
Control	76,738 ^{BA}	30,663 ^{BAC}	0,639 ^{BA}	46,075 ^A	0,016 ^A	9,201 ^A	5,876 ^A
3C20C	82,424 ^{BA}	32,008 ^{BAC}	0,134 ^B	50,416 ^A	0,015 ^A	1,592 ^{B*}	5,604 ^{B*}
4C50C	75,288 ^{BA}	29,026 ^{BAC}	0,129 ^B	46,263 ^A	0,015 ^A	2,929 ^{BA*}	5,490 ^{B*}
4C55C	72,825 ^B	28,251 ^{BC}	0,142 ^B	44,574 ^A	0,014 ^{BA}	2,396 ^{B*}	5,504 ^{B*}
4C60C	71,890 ^B	27,908 ^C	0,152 ^B	43,981 ^A	0,013 ^{BAC}	1,086 ^{B*}	5,508 ^{B*}
3F21C	71,353 ^B	28,662 ^{BAC}	0,141 ^B	42,692 ^A	0,011 ^{BAC*}	0,812 ^{B*}	5,501 ^{B*}
3F22C	78,602 ^{BA}	33,515 ^{BAC}	0,080 ^B	45,087 ^A	0,010 ^{BDC*}	-1,868 ^{B*}	5,511 ^{B*}
4C62C	87,811 ^{BA}	36,405 ^A	2,002 ^A	51,406 ^A	0,008 ^{DC*}	-3,406 ^{B*}	5,532 ^{B*}
4C50C+4C62C	109,873 ^{A*}	35,934 ^{BA}	0,060 ^B	73,939 ^A	0,006 ^{D*}	-3,097 ^{B*}	5,519 ^{B*}
Sustrato							
paja	81,170 ^{BA}	36,387 ^A	0,068 ^B	44,783 ^B	0,011 ^B	-8,529 ^C	
avicel	66,506 ^B	33,034 ^A	0,935 ^A	33,472 ^B	0,014 ^A	12,899 ^A	
xilano	94,167 ^A	24,953 ^B	0,165 ^B	69,214 ^A	0,011 ^B	-1,393 ^B	
P efecto							
cepa	0.0293#	0.0014#	0.0108#	0.2167	<0.0001#	<0.0001#	
sustrato	0.0004#	<0.0001#	0.0152#	<0.0001#	0.0002#	<0.0001#	

Referencias: Superíndice con letras mayúscula Test Tukey y * Test Dunnett. #GLM<0,05. Unidad de Vt, Vfr y Vfl (mL/gr de sustrato incubado), Kdr y Kd (h-1) y L(h). Por medio de los superíndices se muestran los resultados del análisis estadístico entre las distintas muestras mediante el procedimiento GLM (General Linear Models) de SAS®, las diferencias se consideraron significativas cuando P< 0.05. Medias con letras distintas presentan diferencias significativas.

En primera instancia se utilizó el test estadístico Dunett con el fin de comparar la producción de gas asociada a los tratamientos con respecto al control.

Cuando se analizaron los datos del volumen de gas producido en la fase rápida, (usualmente relacionado con la fermentación de los sustratos fácilmente fermentecibles), con respecto al control, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos.

Resultados similares se observaron al considerar el volumen producido en la fase lenta de producción de gas.

Con respecto al volumen total, definido como la suma del volumen producido en ambas fases, solo se observaron diferencias significativas con respecto al control en aquellos fermentadores que fueron sometidos al tratamiento con la mezcla de dos de las cepas con potencial probiótico (4C50C+4C62C).

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

A fin de poder cotejar las similitudes y diferencias a nivel cuantitativo entre las distintas muestras se empleó el test Tukey, el cual permite realizar una comparación de medias entre todos los tratamientos.

En este caso, el volumen de gas producido en la fase rápida (V_{fr}), en aquellos fermentadores suplementados con la cepa 4C62C, tendió a ser mayor con respecto a las demás tratamientos. Mientras que el caso contrario se observó en aquellos fermentadores inoculados con la cepa 4C60C.

Cuando se analizó el volumen de la fase lenta (V_{fl}) no se observaron diferencias significativas con respecto a ninguno de los tratamientos, por lo que en todos los fermentadores se produjeron volúmenes de gas similares independientemente de la adición de la cepa. Sin embargo, los fermentadores tratados con la mezcla de las cepas (4C50C+4C62C) produjeron un volumen total (V_t) de gas que tendió a ser mayor para casi todos los tratamientos y el control, siendo esta diferencia significativa con 4C55C, 4C60C y 3F21C (Tabla 6.2).

En la figura 6.6 se observa el volumen de gas total producido por el metabolismo microbiano, en comparación con el volumen de gas producido por la degradación de la fracción soluble (V_{fr}) y el volumen de gas producido durante la degradación de la fracción no soluble (V_{fl}) por la inoculación de las cepas potencialmente probióticas.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

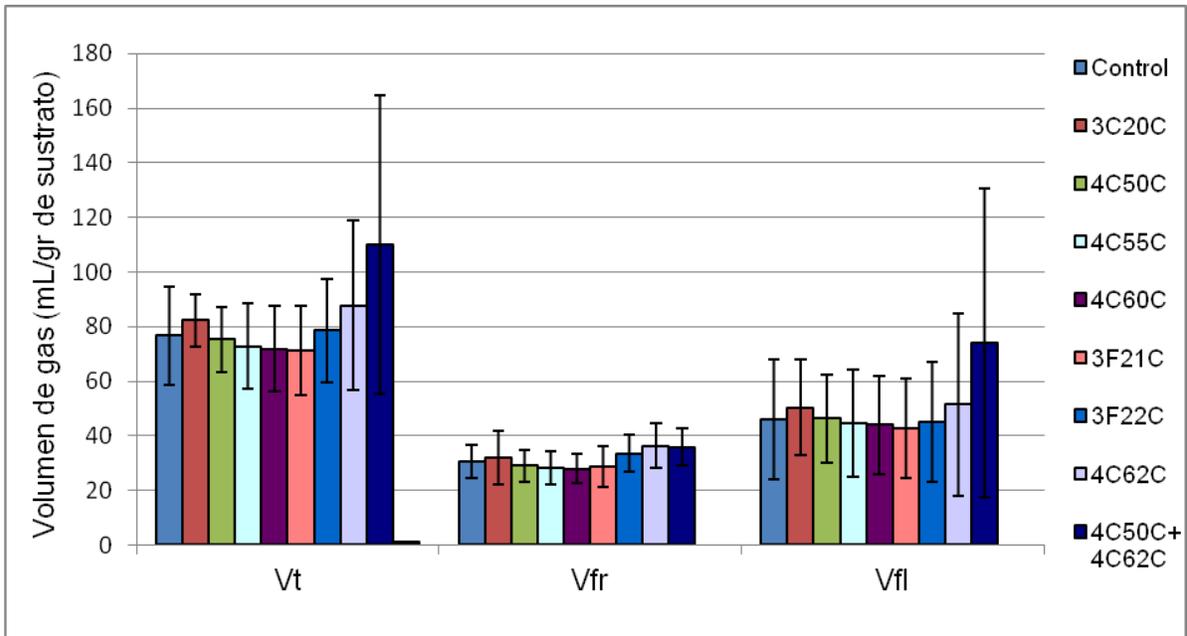


Figura 6.6. Comparación del volumen total de gas y en cada fase para el control y cada tratamiento. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

En las figuras 6. 7 a 6. 9 se presentan los valores de media obtenidos para la constante de velocidad de la fase rápida o tasa de degradación de la fracción soluble (Kdr), constante de velocidad de la fase lenta o la tasa de degradación de la fracción no soluble (Kdl) y la fase de latencia (L), respectivamente.

Al analizar las constantes de velocidad para cada fase de la fermentación (figuras 6. 7 y 6. 8), se observó que la Kdr es mayor significativamente en aquellos fermentadores inoculados con la cepa 4C62C con respecto a los demás tratamientos, aunque su valor no es significativamente distinto al del control. Por otra parte la Kdl correspondiente a los fermentadores inoculados con las cepas 3F21C, 3F22C, 4C62C y la mezcla de las cepas (4C50C+4C62C), mostró valores significativamente menores en comparación al control. Mientras que cuando fue utilizado el test Tukey para el análisis, las cepas 3C20C y 4C50C presentaron las Kdl mayores con respecto a los demás valores aunque no alcanzaron a ser distintos al control ni a ser estas diferencias de orden importante. El menor valor y significativamente distinto al control, fue dado por aquellos fermentadores que contuvieran la mezcla de cepas.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Ambas constantes de velocidad alcanzaron su valor más alto cuando se utilizó la celulosa microcristalina como sustrato para la fermentación y con los restantes sustratos el efecto fue similar en ambos (ver figura 6.11).

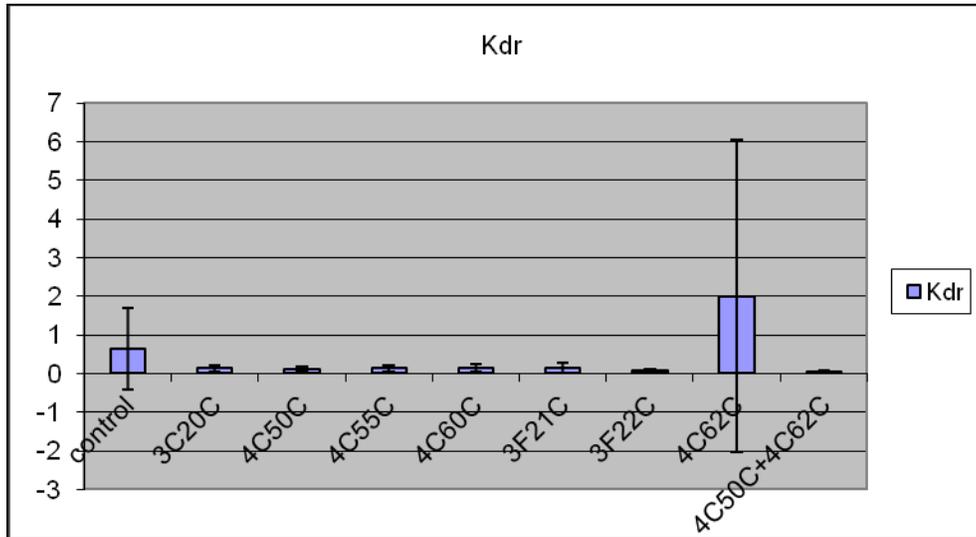


Figura 6.7. Constante de velocidad de la fase rápida (kdr) para cada una de las cepas adicionadas y el control. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

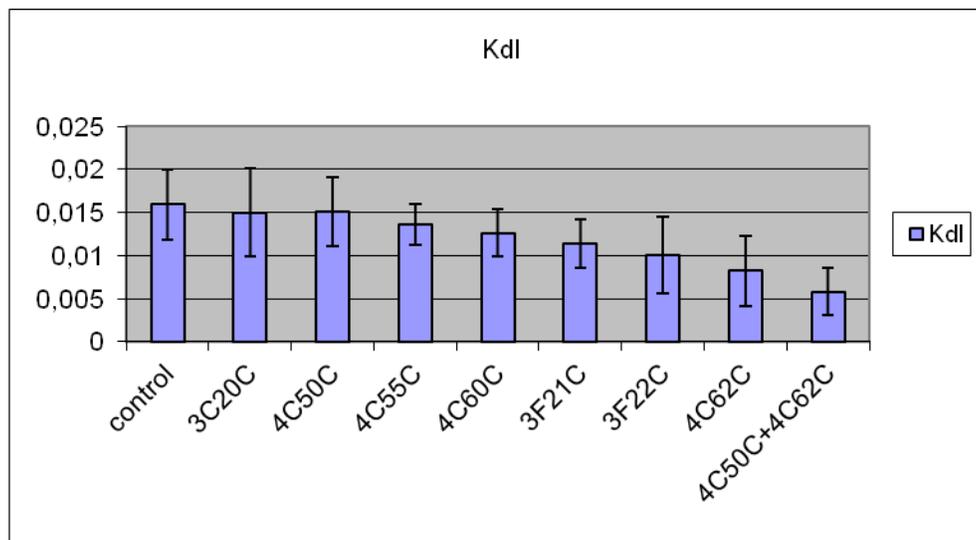


Figura 6.8. Constante de velocidad de la fase lenta (kdl) para cada una de las cepas adicionadas y el control. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

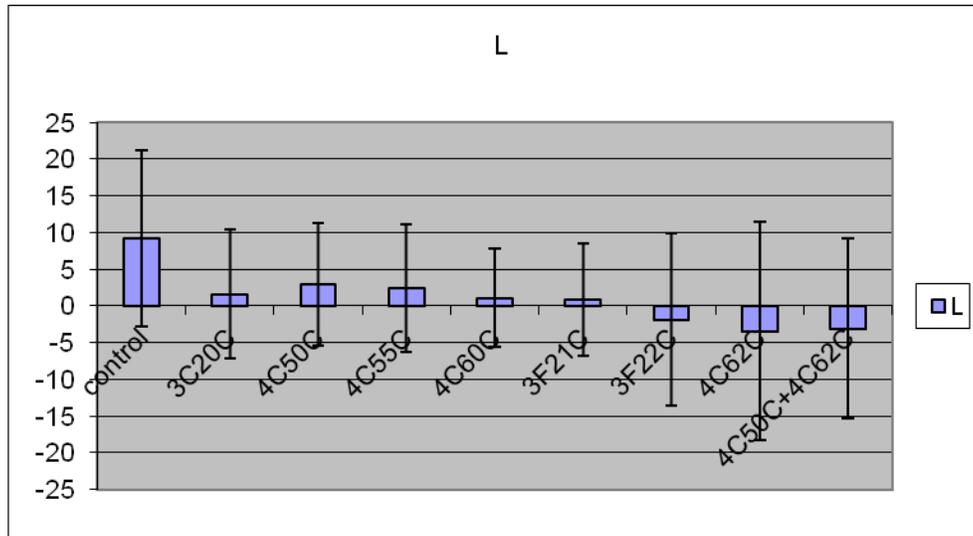


Figura 6.9. Fase Lag o de latencia para el control y cada cepa adicionada. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

Por otro lado, se determinaron los valores obtenidos para la fase lag o de latencia en la producción de gas (L) entendida como el tiempo empleado por las bacterias para adherirse al nuevo sustrato y dar comienzo a la fermentación. Los distintos tratamientos presentaron una disminución significativa en su valor de latencia con respecto al control, aunque sin diferencias entre ellos, salvo una tendencia más marcada a disminuir el L para los fermentadores inoculados con la cepa 3F21C. En la figura 6.12 se observa el efecto de cada uno de los sustratos utilizados sobre el parámetro L, el cual alcanza valores positivos solo con la degradación de la celulosa microcristalina.

Las figuras 6,10 a 6,12 muestran cada uno de los parámetros de cinética de gas evaluados bajo la influencia de cada uno de los sustratos utilizados para la fermentación microbiana.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

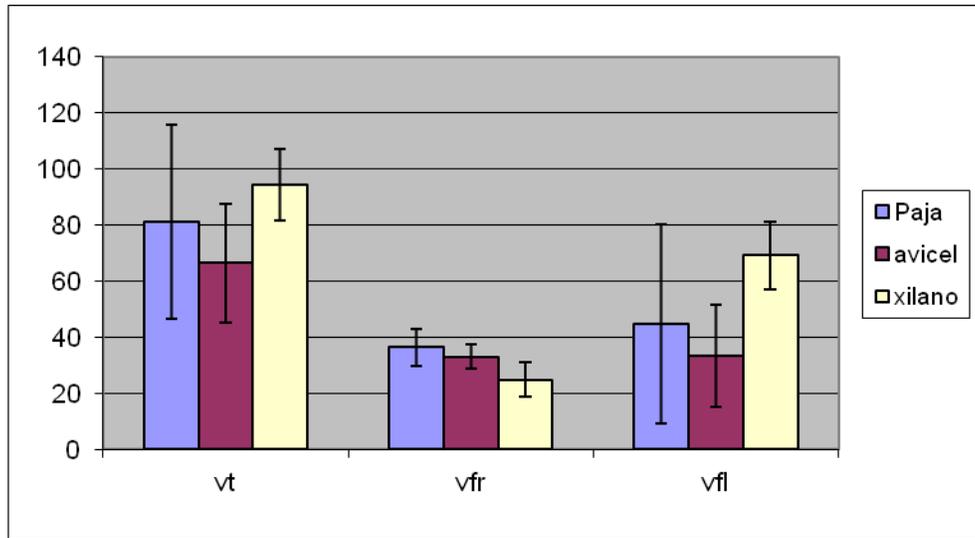


Figura 6.10. Volumen total de gas, volumen de gas producido por la degradación de la fracción de rápida fermentación y volumen de gas producido por la degradación de la fracción de lenta fermentación, debido al efecto de cada sustrato utilizado para la incubación. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

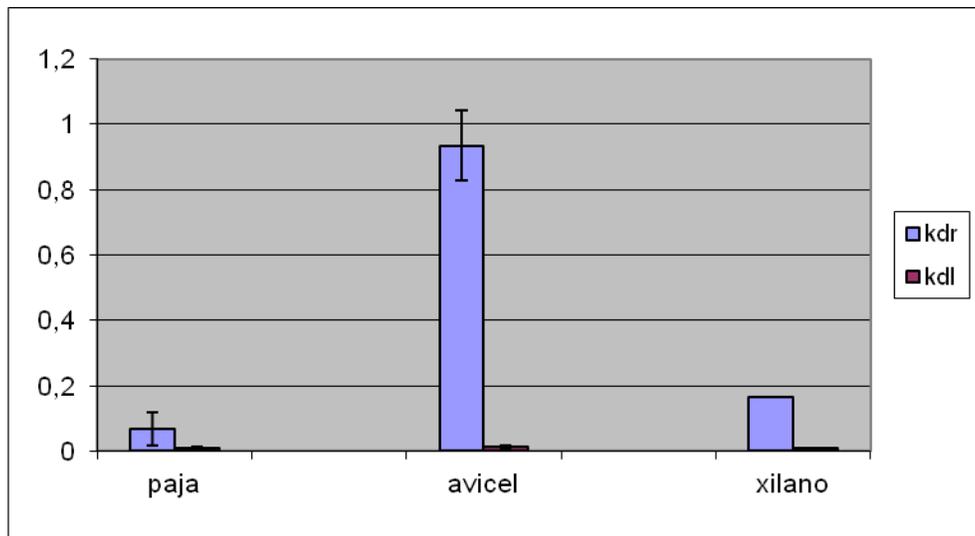


Figura 6.11. Constantes de velocidad de la fase rápida y fase lenta debido al efecto de cada sustrato utilizado. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

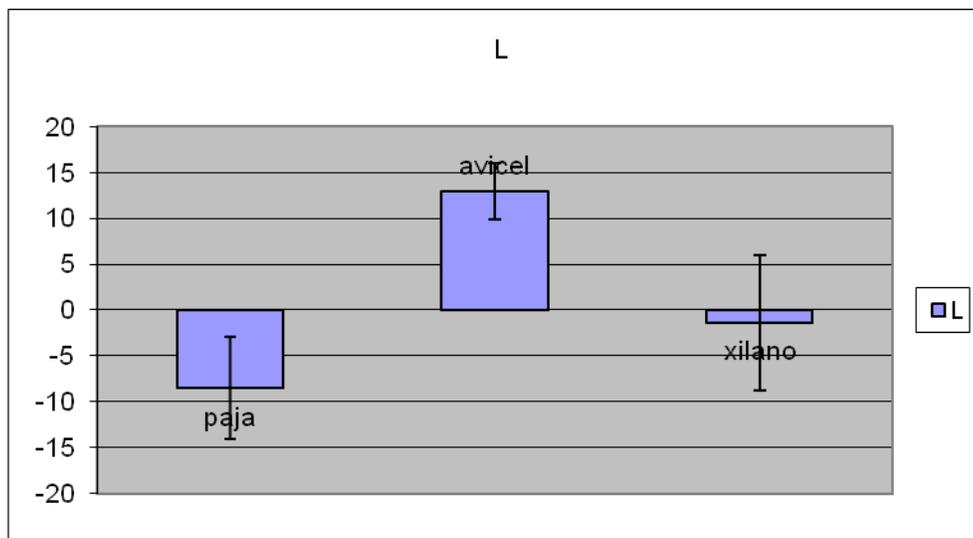


Figura 6.12. Fase de retardo para cada uno de los sustratos utilizados durante la incubación. Se muestran el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el potencial probiótico de bacterias ruminales nativas de bovinos en condiciones de pastoreo. Dichas bacterias fueron cultivadas y aisladas en medios apropiados para el crecimiento de bacterias fibrolíticas, modificados a partir de otros descritos con anterioridad para el cultivo de bacterias ruminales (Stahl et al., 1988), identificadas a nivel molecular y caracterizadas con el fin de evaluar un posible papel como probióticos (Ghorbani et al., 2002; Krehbiel et al., 2003; Brashears et al., 2003; Peterson et al., 2007; Callaway et al., 2008, Gaggia et al., 2011). Luego se analizó el efecto de estas cepas en la modulación de la microbiota ruminal en fermentadores *in vitro* empleando tres sustratos distintos.

La paja de trigo se empleó para evaluar el desempeño de las cepas en presencia de un sustrato complejo y plausible de ser utilizado en la alimentación del ganado bovino, mientras que la celulosa microcristalina y el xilano de avena se emplearon como sustratos puros, de estructura más homogénea. La celulosa microcristalina comercial se considera prácticamente pura ya que el tratamiento con ácido diluido utilizado en su preparación remueve tanto la hemicelulosa como las regiones amorfas más extensas de la fibra de celulosa. Esto tiene implicancias en la tasa de hidrólisis y de utilización, ya que la utilización de la biomasa celulósica es más compleja que la de la celulosa pura no solamente debido a su compleja composición sino también a la diversa arquitectura de las células vegetales (Lynd et al., 2001).

7.1. Cultivo e identificación de las cepas ruminales potencialmente probióticas

Las cepas utilizadas fueron seleccionadas por su capacidad para crecer en un medio de cultivo conteniendo celulosa microcristalina (Avicel) como su principal fuente de carbono y energía. Esta estrategia ya había resultado exitosa en el laboratorio al permitir aislar bacterias ruminales con acción fibrolítica.

La identificación a nivel molecular mediante PCR y análisis de similitud de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen que codifica para el ARN16S con la base de datos del *GenBank* (NCBI) permitió la afiliación de cinco de estos aislamientos con la especie bacteriana de *Pseudobutyrvibrio ruminis*. Esta especie fue previamente clasificada como *Butyrvibrio fibrisolvens*; son organismos tipo *Butyrvibrio* presentes en el rumen y tracto

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

gastrointestinal de algunos animales, representando el 24 al 30% de bacterias cultivables provenientes del rumen (Shoep et al., 2007). Los otros dos aislamientos nombrados como 3F21C y 3F22C no fueron afiliados con ninguna especie bacteriana descrita hasta el momento. Estos organismos son miembros de la Familia Lachnospiraceae la cual incluye especies del tipo *Butyrivibrio*.

7.2. Producción de gas "in vitro"

Para evaluar el potencial probiótico se utilizó el método de producción de gas *in vitro* como sistema de simulación de la digestión ruminal. Esta técnica es muy utilizada ya que permite estudiar la cinética del proceso fermentativo, valorar la calidad de los alimentos para rumiantes, es de baja demanda de mano de obra, es de menor costo por unidad de muestra estudiadas comparada con las evaluaciones *in vivo* y es relativamente sencilla y rápida (Wawrzkievicz y Danelón, 2004).

En estos sistemas se realiza la medición de la producción acumulada de gas como indicador del metabolismo del carbono (Mauricio et al., 1999). Esta aproximación presenta la ventaja de que el producto final que se mide es resultado directo del metabolismo microbiano y que la formación de productos finales de la fermentación (CO₂, CH₄ y AGV) pueden ser monitoreado a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descrita con precisión (Bruni y Chilbroste, 2001). La técnica de producción de gas *in vitro* mide la cantidad de gas liberado como producto de la fermentación de un sustrato, la producción de CO₂ resultante proviene de dos fuentes: directo de los pasos metabólicos como la descarboxilación oxidativa del piruvato y de las reacciones de los productos finales de la fermentación (AGV) con el bicarbonato del buffer (producción de gas indirecta) (Beuvink y Spoeltra, 1992).

Las curvas de producción de gas presentaron una forma sigmoidal y en ellas se pudieron distinguir tres fases: una inicial de lenta producción de gas, exponencial de rápida producción de gas y asintótica donde existe una lenta y casi nula producción de gas.

Los perfiles de producción de gas pueden ser descritos por un modelo trifásico, donde los componentes solubles son rápidamente fermentados después de la incubación, subsecuentemente, un cambio gradual ocurre hacia la fermentación de las partes insolubles, las cuales necesitan ser hidratadas y colonizadas por los microorganismos

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

ruminales antes de ser fermentadas y por último, el gas se produce por el reciclaje de la población microbiana y no por la fermentación del alimento (Cone et al 1997; Posada y Noguera, 2005).

A partir de los datos obtenidos de la producción de gas se eligió la función matemática que mejor se ajustó a esta dinámica y se obtuvieron distintos parámetros de la cinética de gases (Schofield et al 1994), los cuales fueron analizados estadísticamente.

De dicho análisis se desprende que el volumen de gas total producido como resultado del metabolismo microbiano fue mayor en aquellos fermentadores que fueron suplementados con la mezcla de las dos cepas (4C50C+4C62C), en particular cuando los sustratos utilizados para la incubación fueron el xilano de avena y la paja de trigo.

Al analizar el volumen de gas generado en las distintas fases no se observaron diferencias significativas en los tratamientos con respecto al control. En el caso del Vfr se observó una tendencia a aumentar el volumen de gas cuando la cepa adicionada fue 4C62C al compararse con los restantes tratamientos, mientras que para el Vfl no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos independientemente de la adición de las cepas potencialmente probióticas utilizada.

Sin embargo, Vfr fue menor cuando se incubaron los fermentadores con xilano de avena, mientras que lo opuesto sucedió para el Vfl con este mismo sustrato; en esta última fase el volumen fue el único parámetro de la cinética de gases que no presentó efecto alguno por la adición de las cepas ensayadas. Estos resultados sugieren que las cepas bacterianas suplementadas pueden presentar diferentes acciones en los contextos que proveen los distintos sustratos, lo que puede tener importantes implicancias en el desarrollo de probióticos para rumiantes (Ripamonti et al., 2011).

Aunque el volumen de gas en ambas fases no se vio afectado por la adición de las cepas ensayadas, se observaron diferencias en cuanto a tasa con la cual se degradaron cada una de las fracciones del sustrato. En la fase rápida, aquellos fermentadores suplementados con la cepa 4C62C fueron más rápidos en fermentar la fracción soluble del sustrato, mientras que en la fase lenta lo fueron las cepas 3C20C y 4C50C; estas diferencias no fueron significativas con respecto al control pero si entre los distintos tratamientos.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

La fase lag disminuyó en los distintos tratamientos en comparación al control, lo que implica que la adición de las cepas ensayadas favorece un inicio de la fermentación más rápido, lo cual resulta atractivo para el diseño de productos probióticos. Aquellos tratamientos incubados con celulosa microcristalina fueron los únicos que mostraron valores de L positivos. Los valores de la fase de latencia negativos obtenidos con la incubación de los sustratos paja de trigo molida y xilano de avena, se deben a que estos sustratos fermentaron inmediatamente y al uso del modelo matemático propuesto por Schofield y colaboradores en 1994, para describir la cinética de producción de gas. Este es un modelo bicompartimental logístico que supone que la producción de gas es proporcional al tamaño de la población microbiana y al sustrato digerible. En el inicio del proceso fermentativo la población microbiana constituye el factor limitante, contrariamente al final de la fermentación es la disponibilidad de sustrato lo que limita la tasa de producción de gas (Schofield et al., 1994).

Cuando se analizó el efecto de la adición de las cepas potencialmente probióticas, se observaron diferencias significativas en casi todos los parámetros evaluados, menos sobre el volumen de gas producido en la fase lenta. De acuerdo a estos resultados se podría afirmar que la inoculación de las cepas ensayadas tuvo efecto sobre la fermentación *in vitro* llevada a cabo en el interior de los fermentadores. También se observó un efecto sustrato sobre todos los parámetros analizados, por lo que estos influyeron directamente en la producción de gas.

A la hora de diseñar un probiótico como eventual producto biotecnológico, habría que tener en cuenta el administrar un determinado sustrato, como parte de la formulación del alimento ofrecido al animal, de forma conjunta con la suplementación de cepas bacterianas benéficas o mezcla de las mismas como se observó en este trabajo.

7.3. Valores de pH

Todos los tratamientos presentaron valores de pH a las 96 horas de incubación significativamente menores con respecto al control.

El mantenimiento del pH ruminal a valores normales es de gran importancia, ya que una disminución marcada del mismo puede aparejar desequilibrios como la acidosis, el cual es un trastorno alimenticio asociado a un exceso de producción de ácido láctico en el rumen

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

que puede observarse en los rumiantes luego de la ingestión de grandes cantidades de alimentos ricos en hidratos de carbono fácilmente fermentables (Owens et al., 1998).

De todos modos hay que tener en cuenta que la medición se llevo a cabo luego de las 96 horas de inicio de la incubación de los fermentadores y estos son sistemas cerrados, por lo que en estos casos se debe tener cautela al relacionar resultados en estos sistemas con situaciones *in vivo*.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La compleja microbiota presente en el ambiente ruminal juega un rol fundamental en la fisiología del hospedero, lo que plantea la necesidad de un mejor entendimiento de esta interacción.

La utilización de probióticos como aditivos microbianos para intentar potenciar el rendimiento productivo, optimizar la fermentación ruminal, mejorar la utilización de los nutrientes y prevenir trastornos digestivos en la salud del animal (NRC, 2001) aparece como una estrategia promisoría para así modular la microbiota presente en el ambiente ruminal.

De los resultados obtenidos podemos concluir que el inóculo utilizado en los fermentadores a esa determinada concentración fue capaz de generar cambios en los patrones de fermentación *in vitro*, lo que se evidencia por las diferencias observadas en los distintos parámetros analizados. El volumen de gas aumentó de forma significativa con la adición de la mezcla de dos cepas, más cuando el sustrato utilizado para la incubación fue el xilano de avena y en menor grado la paja de trigo.

Más allá de las limitaciones impuestas por la técnica de producción de gases *in vitro*, esta aproximación resultó ser una herramienta útil para describir y comparar la cinética de la fermentación de distintos sustratos modulada por la suplementación de bacterias ruminales.

Estudios futuros sobre la concentración de los AGV mediante HPLC, aportaran información relevante para la evaluación del efecto modulador de las cepas ensayadas. Además se podría analizar su potencial influencia en la cantidad de metano formado durante la fermentación *in vitro*, debido a su importancia como gases con efecto invernadero. También resultaría interesante evaluar cambios en las comunidades bacterianas presentes en el líquido ruminal, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular como PCR en tiempo real o DGGE entre otras, como respuesta a la incorporación de las cepas potencialmente probióticas utilizadas en esta tesis. Este tipo de aproximaciones nos permitirían obtener una visión más amplia de cómo las cepas ensayadas producen cambios en la cinética de la fermentación llevada a cabo en el interior de los fermentadores.

9. AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de tesis el Dr. Pablo Zunino por su enorme generosidad y paciencia infinita.

A mis compañeros de trabajo Martín Fraga y Karen Perelmuter por hacerme parte de su grupo y por compartir conmigo su experiencia en este proyecto.

A todos los compañeros de laboratorio por enseñarme a trabajar en equipo y de forma solidaria.

Esta tesis está dedicada en especial a mis padres por darme todo en esta vida sin esperar nada a cambio, por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanas divinas por ser mis mejores aliadas, por estar siempre para mí y por ser lo más lindo que tengo junto a Joaquín.

Por último y no menos importante a mí esposo por haberme apoyado en el proceso, por tener fe en mí, por no dejarme claudicar, por ser el amor de mi vida y más. Gracias.

10. BIBLOGRAFIA

Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Emborg, H. D., Pedersen, K., Hendriksen, R. S. 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.

Agarwal, N., Kamra, D. N., Chaudhary, L. C., Agarwal, I., Sahoo, A., Pathak, N. N. 2002. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 329–336.

Alonso, C. 2001. Biodegradación Anaerobia de Residuos Sólidos de Curtiembres. Tesis para la obtención del título de Magister en Biotecnología. Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.

Amann, R. L., LIN C., Key, R., Montgomery, L., Stahl, D. A. 1992. Diversity among *Fibrobacter* isolates: towards a phylogenetic classification. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:23–31.

Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M. D. 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 88: E9-E21.

Bagnara, C., Gaudin, C., Bélaich, J. P. 1987. Physiological Properties of *Cellulomonas fermentas*, a Mesophilic Cellulolytic Bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:170-176.

Bayer, E. A., Lamed R., White B. A., Flints, H. J. 2008. From Cellulosomes to Cellulosomics. *The Chemical Record.* 8:364–377.

Beuvink, J.M. W., Spoeltra, S.F. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganism *in vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:505-509.

Brashears M. M, Galyean M. L, Loneragan G. H, Mann J. E, Killinger-Mann K. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot.* 66:748-754.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Brashears, M. M., D. Jaroni, J. Trimble. 2003. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. J. Food Prot. 66:355-363.

Britos A., Curbelo A., Pomiés N., Caramelli A., Antúnez M., Cajarville C. 2008. Implementación de la técnica de producción de gas *in vitro* semiautomatizada en Uruguay: predicción del volumen de gas. Resúmenes de las XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.

Brock, F. M., Forsberg, C. W., Buchanan Smith, J. G. 1982. Proteolytic Activity of Rumen Microorganisms and Effects of Proteinase Inhibitors. Applied and Environmental Microbiology. 44: 561-569.

Bruni, M. A., Chilbroste, P. 2001. Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 9(1): 43-51.

Bryant, M. P. Bacterial Species of the Rumen. 1959. Bacteriol. Rev. 23:125:159.

Callaway, T. R., Carr, M. A., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Nisbet, D. J. 2008. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and Cattle: A Review After 10 Years. Current Issues in Intestinal Microbiology. 11:67-80.

Chiquette, J. 2009. The Role of Probiotic in Promoting Dairy Production. WCDS Advances in Dairy Technology 21: 143-157.

Chiquette, J., Allison M. J., Rasmussen, M. A. 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(9):3536-3543.

Church, D. C. 1993. El Rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia, Zaragoza.

Cirio, A., Tebot, I. 2000. Fisiología Metabólica de los Rumiantes Fac. Veterinaria, Montevideo.

Cone, J. W., Van Gelder, A. H., Driehuis, F. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. Animal Feed Science and Technology. 66, (1-4):31-45.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Counotte, G. H. M., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., De Bie, M. J. A. Role of *Megasphaera elsdenii* in the Fermentation of DL-[2-¹³C]lactate in the Rumen of Dairy Cattle. 1981 App. Environ. Microbiol. 42(4): 649-655.

Cross, M. L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 34:245-53.

Decreto N° 98/2011 de 2 de marzo de 2011: prohibición de uso de raciones con antibióticos como promotores del crecimiento. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay.

Dehority, B. A. 1991. Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. Proceedings of the Nutrition Society. 50: 149-159.

FAO /WHO. 2001. Joint FAO /WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food; Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>.

Flint, H. J. 1997. The rumen microbial ecosystem-some recent developments. Trends Microbiol. 5:483-488.

Fukuda, S., Suzuki, Y., Murai, M., Asanuma, N., Hino, T. 2006. Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. J. Appl. Microbiol. 100:784-794.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Microbiol. 66:365-378.

Froni, L. 2006. Microbiología Básica, Ambiental y Agrícola. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República.

Gaggía, F., Gioia, D., Baffoni L., Biavati, B. 2011. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. Trends in Food Science & Technology, doi:10.1016/j.tifs.2011.03.003.

Gaggía, F., Mattarelli, P., Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology. 141:515-528.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., Leedle, J.A. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial. J. Anim. Sci. 80:1977–1986.

Grubb, J. A., Dehority, B. A. 1976. Variation in Colony Counts of Total Viable Anaerobic Rumen Bacteria as Influenced by Media and Cultural Methods. App. Environ. Microbiol.31(2):262-267.

Gupta, R. S. 2004. The phylogeny and signature sequences characteristics of Fibrobacteres, Chlorobi and Bacteroidetes. Critical Reviews Microbiology 30: 123–143.

Gustafson, R. H., Bowen, R. E.1997. A review Antibiotic use in animal agriculture. J. Appl. Microbiol. 83: 531-541.

Hawke, J. C., Silcock, W. R. 1968. Lipolysis and Hydrogenation in the Rumen. Biochem. J. 112:131-132.

Hobson, P. N. 1988. The Rumen microbial ecosystem. Elsevier Applied Science, London y New York.

Hobson, P. N. y Stewart, C. S.1997. Rumen Microbial Ecosystem (en línea). London, Chapman and Hall. <http://books.google.com.ar/books>.

Hungate, R .E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York.

Jan, G., Belzacq, A.S., Haouzi, D., Rouault, A., Metivier, D., Kroemer, G., Brenner, C. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. Cell Death Differ. 9:179-88.

Klaenhammer, T. R., Kullen, M.J. 1999. Selection and design of probiotics. Int J Food Microbiol. 50:45-57.

Klive, A. V., Hennessy, D., Forster, R. J. Mackie, R. I. , Attwood, G. T.2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE34 and *Butyrivibro fibrisolvens* YE44 in the rumen of cattle. Journal of Applied Microbiology 95:621-630.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Kobayashi, Y., Shinkai, T., Koike, S. 2008. Ecological and Physiological Characterization Shows that *Fibrobacter succinogenes* Is Important in Rumen Fiber Digestion – Review. *Folia Microbiol.* 53 (3): 195–200.

Krause, D. O. Denman, S. E. Roderick, M. M., Rae, A. L., Attwood, G. T., McSweeney C. S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 663-693.

Krause, K. M., Oetzel, G. R. 2005. Inducing Subacute Ruminal Acidosis in Lactating Dairy J. *Dairy Sci.* 88: 3633-3639.

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

Kumar, S., Kumar Puniya, A., Puniya, M., Singh Dagar, S., Kumar Sirohi, S., Singh, K., Griffith, G. W. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-009-0041-3.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 1993. *Principios de bioquímica*, segunda edición. Editorial Omega, Barcelona.

López, S., McInstosh, F. M., Wallace, R. J., Newbold, C. J. 1999. Effect of Adding Acetogenic Bacteria on Methane Production by Mixed Rumen Microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:1-9.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., VanZyl, W. H., Pretorius, I. S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-577.

MacKenzie, D. D. S. 1967. Production and Utilization of Lactic Acid by the Ruminant. A Review. *J. Dairy Sci.* 50:1772-1786.

Macy, J. M., Farrand, J. R., Montgomery, L. 1982. Cellulolytic and Non-Cellulolytic Bacteria in Rat Gastrointestinal Tracts. *App. Environ. Microbiol.* 44(6):1428-1434.

Martin, S. A., Nisbet, D.J. 1992. Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. *J Dairy Sci* 75:1736-1744.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S. Owen, E., Channa, K.S. Theodorou, M.K. 1991. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim Feed Sci Technol. 79: 321-330.

McDonald, P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D., Morgan, C. A. 2006. Nutrición Animal, sexta edición. Editorial Acribia, Zaragoza.

Miron, J. Ben-Ghedalia, D. Morrison M. 2001 Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. J. Dairy Sci. 84:1294–1309.

Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., Morgavi, D.P. 2007 Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: Effect of a yeast additive. J. Appl. Microbiol. 103:2676–2685.

Moss, A. R., Jounary, J. P., Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Ann. Zootech. INRA, EDP Sciences .49: 231–253.

Nagaraja, T. G., Titgemeyer, E. C. 2007. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. J. Dairy Sci. E17-E38.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised edition. National Academy of Sciences, Washington, DC.

Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J., Gill, D. R. Acidosis in Cattle: A Review. 1998. J. Anim. Sci. 76:275-286.

Patterson, J. A., Burkholder, K. M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poult Sci. 82:627-631.

Payne, J. M. 1981. Enfermedades metabólicas de los animales zootécnicos. Editorial Acribia. Zaragoza.

Perelmuter, K., Fraga, M., Valencia, M. J., Perez, A., Zunino, P. 2008. Microbiota ruminal: cuantificación, caracterización y aislamiento de potenciales organismos prebióticos para

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

prevenir la acidosis bovina. Resúmenes de las XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú.

Perelmuter, K., Fraga, M., Valencia, M. J., Cajarville, C., Zunino, P. 2009. Evaluación del potencial prebiótico de cepas nativas de rumen en un modelo de acidosis in Vitro. Resúmenes de las XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú.

Peterson, R. E., Klopfenstein, T. J., Erickson, G. E., Folmer, J., Hinkley, S., Moxley, R. A., Smith D. R., 2007. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *E. coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance of beef feedlot cattle. *J. Food Protection* 70: 287-291.

Porter, K., Feig, Y., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25(5): 943-948.

Posada, S. L., Noguera, R. R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development* 17(36).

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. 1999. Microbiología. McGrawHill. Interamericana.

Reid G. 1999. Minireview- The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(9):3763-3766.

Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E., Domeneghini, C. 2011. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*. 17:97-105.

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

Russell, J. B., Wilson, D. B. 1996. Why Are Ruminant Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH?. *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.

Sawanon, S., Kobayashi, Y. 2006. Synergistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: evidence in defined cultures. *Anim. Sci. J.* 77: 208–214.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Schoep, T. D., Gregg, K. 2007. Isolation and characterization of putative *Pseudobutyrvibrio ruminis* promoters. *Microbiology* 153: 3071-3080.

Schofield, P., Pitt, R. E., Pell, A. N. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*. 72: 2980 - 2991.

Scott, A. M., Nisbeti, D. J. 1992. Symposium Direct-Fed Microbials And Rumen Fermentation. Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.

Scott, H. W., Dehority, B. A. 1965. Vitamin Requirements of Several Cellulolytic Bacteria. *J. Bacteriol.* 89(5):1169-1175.

Skillman, L. C., Toovey, A. F., Williams, A. J., Wright, A. D .G .2006. Development and Validation of a Real-Time PCR Method To Quantify Rumen Protozoa and Examination of Variability between *Entodinium* Populations in Sheep Offered a Hay-Based Diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1): 200–206.

Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., Montgomery, L. 1988. Use of Phylogenetically Based Hybridization Probes for Studies of Ruminant Microbial Ecology. *App. Environ. Microbiol.* 54(5):1079-1084.

Stevenson, D. M., Weimer, P. J. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:165-174.

Teather, R. M. 1982. Maintenance of Laboratory Strains of Obligately Anaerobic Rumen Bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 44 (2): 499-501.

Tkalcic, S., Zhao, T., Harmon, B. G., Doyle, M. P., Brown, A., Zhao, P., 2003. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 66, 184–1189.

Torres, C., Zarazaga, M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales, ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*. 16:109-112.

Van Gylswyk, N. O., Hippe, H., Rainey, F. A. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a Butyrate-Producing Bacterium from the Rumen That Closely Resembles

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.

Butyrivibrio fibrisolvens in Phenotype. International Journal of Systematic Bacteriology. 46(2): 599- 563.

Van Soest, J. P. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. . 2nd ed. Ithaca, New York. USA. Cornell University press.

Wawrzkievicz, M, Danelón, J.L.2004. Mejoramiento de la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar alimentos para rumiantes. Nuevo recipiente de incubación. Rev.Arg.Prod.Anim. 24 (3): 187-197.

Weimer, P. J.1996. Why Don't Bacteria Digest Cellulose Faster? J.Dairy Sci 79:1496-1502.

Welch, R. P. Tsai, K. P. Harper, E. G Chang J. S., Calza R. E. 1996. The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188: effects on physiology. Applied Microbiology and Biotechnology. 45: 811-816.

Williams, B. A., Bosch M. W., Boer, H., Verstegen M. W. A., Tamminga S. 2005. An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124:445-462.

Williams, P. E., Tait, C. A. Innes, G. M., Newbold C. J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Anim. Sci. 69(7):3016-3026.

Wolin, M. J. 1979. A Theoretical Rumen Fermentation Balance. Department of Dairy Science, University of Illinois, Urbana.1452-1459.

Wright, A. D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L., Smith, K., D. 2004. Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. App. Environ. Microbiol. 32(3): 1263-1270.

Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes.