

Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias. Universidad de la
República.

Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos

Lic. Martín Fraga Cotelo

Director de Tesis: Dr. Pablo Zunino

Director Académico: Dra. Cecilia Cajarville.

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Tribunal

Dra. Cristina Cabrera

Dra. Silvana Vero

Dra. Claudia Piccini



Octubre 2010



1. RESUMEN	3
<hr/>	
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 LOS RUMIANTES	4
2.2 MICROBIOTA RUMINAL, CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES	5
2.3 MICROBIOTA FIBROLÍTICA	10
2.4 PROBIÓTICOS RUMINALES	12
2.5 ABORDAJES IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL	14
2.6 ESTRATEGIA DEL PRESENTE TRABAJO	16
3. HIPÓTESIS	17
<hr/>	
4. OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
<hr/>	
4.1 ANIMALES Y MUESTREOS	18
4.2 MEDIOS DE CULTIVO, MANIPULACIONES Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	19
4.3 FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)	21
4.4 AISLAMIENTO BACTERIANO	22
4.5 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	23
4.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	24
4.7 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN IN VITRO	24
4.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN LOS FERMENTADORES IN VITRO	26
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
5. RESULTADOS	29
<hr/>	
5.1 RECUENTOS BACTERIANOS	29
5.2 ABUNDANCIA RELATIVA Y ABSOLUTA DE MICROORGANISMOS POR MEDIO DE LA TÉCNICA FISH	29
5.3 AISLAMIENTO BACTERIANO E IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS	31
5.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AISLAMIENTOS	33
5.5 EVALUACIÓN IN VITRO DE LA MODULACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN	33
5.5.1 ELECCIÓN DE CEPAS	34
5.5.2 PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL	35
SUSTRATO: PAJA DE TRIGO	37
SUSTRATO: CELULOSA MICROCRISTALINA	38
SUSTRATO: XILANO DE AVENA	38
5.5.2 CUANTIFICACIÓN DE AGV EN LOS FERMENTADORES	39
SUSTRATO: PAJA DE TRIGO	40
SUSTRATO: CELULOSA MICROCRISTALINA	41
SUSTRATO: XILANO DE AVENA	43

6. DISCUSIÓN	45
6.1 ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA RUMINAL	45
6.1.1 MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE	46
BACTERIAS TOTALES	46
BACTERIAS FIBROLÍTICAS	46
BACTERIAS CONSUMIDORAS DE LACTATO	47
6.1.2 ANÁLISIS DE GRUPOS ESCOGIDOS DE LA MICROBIOTA RUMINAL POR MICROSCOPIA: FISH	48
MICROBIOTA TOTAL	48
MICROBIOTA BACTERIANA	49
BACTERIAS FIBROLÍTICAS	49
BACTERIAS CONSUMIDORAS DE ÁCIDO LÁCTICO	50
6.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS RUMINALES	50
6.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AISLAMIENTOS RUMINALES	53
6.4 MODULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL	53
6.4.1 SUSTRATO: PAJA DE TRIGO	55
6.4.2 SUSTRATO: CELULOSA MICROCRISTALINA	56
6.4.2 SUSTRATO: XILANO DE AVENA	57
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	58
8. AGRADECIMIENTOS	60
9. BIBLIOGRAFÍA	61

1. RESUMEN

En el rumen habita una compleja comunidad microbiana simbiote que incluye bacterias, arqueas, hongos, levaduras y protozoarios. Ésta es responsable de la fermentación de los polisacáridos estructurales de los vegetales (fundamentalmente celulosa y hemicelulosa) y provee al rumiante de ácidos grasos que constituyen su fuente de energía. La biomasa microbiana generada constituye una importante fuente de proteína. Esta comunidad es una fuente de microorganismos probióticos potencialmente capaces de modular y mejorar los procesos fermentativos que se dan en el rumen. Los probióticos son microorganismos que administrados vivos y en cantidades adecuadas tienen efectos beneficiosos sobre huéspedes animales o humanos.

En este trabajo se analizó parcialmente, en primer lugar, la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo. Se analizó la microbiota cultivable en diferentes medios de cultivo y también empleando la técnica *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) con sondas de oligonucleótidos dirigidas a bacterias de importancia en el ambiente ruminal. Además se realizaron aislamientos de microorganismos potencialmente fibrolíticos en un medio con celulosa como principal fuente de carbono y energía y se identificaron por medio de la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. Con el fin de evaluar si los aislamientos tenían características probióticas se analizó la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos indicadores. Por último, se evaluó el efecto modulador de aislamientos seleccionados sobre la fermentación ruminal en un modelo *in vitro*. Para ello se registró la presión del gas generado a distintos tiempos y se calculó el volumen de gas producido; también se registró el pH y la concentración de diferentes ácidos grasos volátiles (AGV). Los datos de volumen en función del tiempo se ajustaron de acuerdo a un modelo matemático para estudiar la cinética de la fermentación.

Se conformó una colección de 46 aislamientos de bacterias relacionados con la función fibrolítica ruminal que mostraron diferentes patrones de inhibición del crecimiento de los indicadores. Se identificaron representantes de *Eubacterium cellulosolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Butyrvibrio fibrisolvens* y *Prevotella* spp. aunque también se encontró que algunos aislamientos estaban relacionados con la familia *Lachnospiraceae* que no presentaban similitud con especies previamente cultivadas. La adición de los aislamientos a los fermentadores *in vitro* tuvo diferentes efectos sobre los parámetros cinéticos de la fermentación así como sobre la concentración final de AGV. Este trabajo representa una aproximación a la evaluación de bacterias nativas ruminales para su empleo en la modulación de la microbiota ruminal.

2. INTRODUCCIÓN

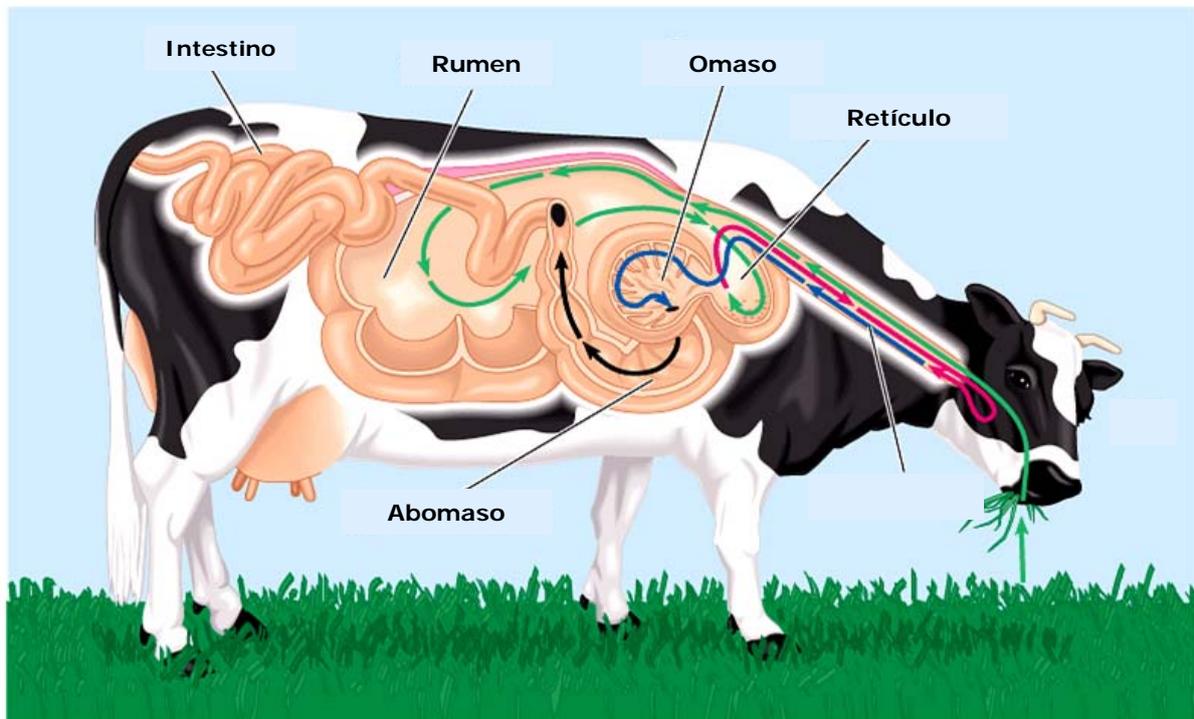
2.1 Los rumiantes

Los rumiantes son animales exclusivamente herbívoros que consumen pasturas y otros vegetales en estado natural y forrajes en los sistemas de cría. La materia orgánica, fuente de energía y carbono en estos alimentos, está representada fundamentalmente por polisacáridos insolubles de los cuales la celulosa es el más abundante. Los rumiantes, como todos los mamíferos, no poseen la maquinaria enzimática para degradar los enlaces glucosídicos β -1,4 de la celulosa. Para poder aprovechar estas fuentes de energía han desarrollado un sistema digestivo especial junto con una compleja comunidad microbiana simbiote encargada de fermentar y aprovechar los polisacáridos insolubles. La fermentación de los carbohidratos se realiza a diferencia de otros mamíferos antes de llegar al "verdadero estómago" en el primer compartimiento del aparato digestivo, el rumen.

Los rumiantes pertenecen al suborden *Ruminantia* del Orden *Artiodactyla* y su distribución es mundial. Poseen un aparato digestivo anterior compuesto por cuatro compartimientos, los tres primeros son considerados pre estómagos mientras que el último de los cuatro es el que posee las características de estómago glandular (Figura 2.1).

El primero y más grande de estos compartimientos es el rumen, el cual tiene una capacidad de aproximadamente 100 L o más en un bovino adulto. El rumen está íntimamente conectado con el siguiente compartimiento, el retículo, por el pliegue rumino-reticular. A estos dos compartimientos generalmente se los considera como un sistema denominado retículo-rumen. Es en estos compartimientos donde la fermentación de la fibra alimenticia es posible y es el lugar de residencia de la microbiota simbiote ruminal. El omaso o librillo constituye el tercero de los compartimientos, se conecta con el retículo por el orificio retículo-omasal y con el abomaso por el orificio omaso-abomasal. Fisiológicamente el abomaso corresponde a las regiones fúndicas y pilóricas del

estómago de los monogástricos. El epitelio posee células productoras de ácido clorhídrico y pepsina en la región fúndica y mucus en la pilórica.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 2.1 Tracto digestivo de los rumiantes

Gracias a los rumiantes y a su domesticación, los humanos pudieron expandir su territorio geográfico, desarrollar una fuente de alimento estable y crear comunidades complejas (Russell et al., 2009). Se estima que en los años 90 el volumen ruminal total teniendo en cuenta ovinos, bovinos y caprinos domésticos, aproximadamente 2000 millones de animales, era cercano a los 100000 millones de litros, siendo así el rumen "el fermentador" comercial más grande del mundo (Weimer, 1992).

2.2 Microbiota ruminal, características y funciones

Los rumiantes han desarrollado una compleja microbiota simbiote que incluye bacterias, protozoarios, hongos y arqueas (van Soest, 1994). Esta comunidad les ha permitido adaptarse al consumo de vegetales y aprovechar los polisacáridos

insolubles como la celulosa y hemicelulosa. Estos sustratos poseen enlaces que no pueden ser hidrolizados por los mamíferos. La fermentación ruminal por parte de la microbiota nativa tiene efectos de consideración sobre los procesos metabólicos de los animales y las funciones de los microorganismos están íntimamente asociadas tanto con desordenes metabólicos de los rumiantes como con su bienestar (Bryant, 1959).

El ambiente ruminal está adaptado a mantener condiciones óptimas para el buen desarrollo de la microbiota allí existente la cual es abundante y diversa. La entrada de alimento y por tanto el suministro de sustrato para los microorganismos es relativamente constante así como la temperatura que se mantiene en el entorno de los 39°C. El flujo de comida, agua y una saliva con propiedades de tampón mantiene el pH del líquido ruminal y la ingesta en valores cercanos a la neutralidad y levemente ácidos (Bryant, 1959). Existe una continua remoción de productos secundarios del crecimiento microbiano, tanto por el consumo de otros microorganismos como por la absorción por parte de la pared ruminal. La constante transferencia y remoción de equivalentes de reducción en forma de H₂ hace posible que la fermentación sea termodinámicamente favorable (Wallace, 1994). El potencial de reducción es mantenido en valores bajos (-0,4 V) y la concentración de oxígeno es prácticamente nula (10⁻²² M) permitiendo así el desarrollo de una microbiota esencialmente anaeróbica estricta.

La actividad metabólica de la comunidad microbiana simbiote es responsable de la digestión del material fibroso que consumen los rumiantes y sus productos finales y desechos son utilizados por el animal como fuente de energía, proteína y vitaminas. En el rumen y debido a la actividad microbiana se generan los precursores proteicos y lipídicos de los principales constituyentes de los productos comerciables del ganado, como la leche y la carne.

Para entender mejor las relaciones microbianas en el rumen es necesario describir y comprender su diversidad y cómo las cantidades y características de los microorganismos pueden ser alteradas por diferentes factores del huésped y de la dieta. La composición de la dieta tiene una gran influencia en la diversidad microbiana del rumen (Larue et al., 2005).

Los carbohidratos solubles son rápidamente metabolizados, mientras que las paredes celulares de los forrajes, a excepción de las pectinas, son fermentadas lentamente por la microbiota fibrolítica. Los productos de la fermentación microbiana de los carbohidratos son fundamentalmente ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta, principalmente acético, propiónico y butírico, CO₂ y CH₄ y, ocasionalmente lactato (van Soest, 1994). Los AGV son rápidamente absorbidos a través del rumen y son responsables del 60 al 70% de la energía metabolizable para un bovino adulto (van Soest, 1994) y son utilizados por el animal para su mantenimiento y producción. Los AGV más abundantes en el fluido ruminal son el acético, propiónico y butírico que representan hasta el 95% de todos los AGV.

El propiónico es el único ácido gluconeogénico y es responsable del 65 al 80% del suministro de glucosa en una vaca en lactación (Reynolds, 2003). El ácido acético es el que más se produce en el rumen llegando a niveles del 70% o más. El ácido butírico juega un rol importante en el rumen; es el ácido que tiene más valor energético molar de los tres AGV más importantes en la fisiología ruminal (Maynard et al., 1979), es el AGV más metabolizado en el epitelio ruminal (Baldwin y Jesse, 1996, Baldwin y McLeod, 2000) y tiene efectos mitóticos en el epitelio durante el desarrollo (Mentschel et al., 2001). Existe una importante correlación entre este ácido el consumo de materia seca y la producción de leche (Seymour et al., 2005).

Así, la mayor parte de los nutrientes que obtiene el rumiante son producidos en el rumen debido al metabolismo microbiano de los carbohidratos, proteínas o nitrógeno no proteico (Jouany y Morgavi, 2007). Además del rol fundamental que poseen los microorganismos en la digestión del alimento, la proteína de origen microbiano es considerada como la fuente principal de proteína para el rumiante, de alto valor biológico y elevada digestibilidad intestinal (Stern et al., 1994b; Hoover y Miller, 1996; Dewhurst et al., 2000).

Al igual que el resto de los mamíferos, los rumiantes, como todos los mamíferos, absorben los aminoácidos provenientes de los compuestos proteicos a nivel de duodeno. La proteína que llega al duodeno de un rumiante es básicamente la suma de la proteína microbiana y la proteína de origen alimenticio que no ha sufrido degradación a nivel ruminal. Mientras que el valor biológico de la proteína de origen alimenticio que llega al duodeno es muy variable, la composición en

aminoácidos de la proteína de origen microbiano es muy estable y de muy alta calidad (Schingoethe et al., 1996). Cuando la eficacia de síntesis es baja, del orden de 20g de Nitrógeno/kg de materia orgánica verdaderamente fermentada en rumen (MOVF), la proteína microbiana puede cubrir cerca del 50% de las necesidades proteicas de una vaca lechera de 600 kg produciendo 25 litros de leche con 4% de grasa. Sin embargo, si la eficacia de síntesis fuera media (30 g N/kg MOVF), la proteína microbiana cubriría el 73 % de las necesidades proteicas del mismo animal, y podría llegar a cubrir un 98 % de las necesidades proteicas si la eficacia fuera elevada (40 g N/kg MOVF, Stern et al., 1994a).

Se estima que la comunidad microbiana ruminal comprende varios cientos de especies bacterianas y al menos 30 de estas son predominantes llegando a cantidades de aproximadamente 10^{11} células bacterianas/mL. También se pueden encontrar unas 40 especies de protozoarios (10^5 - 10^7 /mL) y alrededor de 5 especies de hongos (10^5 /mL) (Hespell, 1987, Miron et al., 2001). Sólo una fracción de la comunidad bacteriana de la mayor parte de los sistemas microbianos es cultivable. Efectivamente, se calcula que entre el 10 y 50 % de la comunidad bacteriana ruminal puede ser cultivada (Kobayashi, 2006). La biota microbiana se encuentra distribuida en tres ambientes diferentes que ofrece el sistema ruminal. Existe una población microbiana adherida al epitelio ruminal (McCowan et al., 1978, Dehority y Grubb, 1981), una fracción de la microbiota se encuentra libre en el fluido ruminal y por último una porción que se encuentra adherida y en íntimo contacto con la partículas alimenticias. Estas tres fracciones son diferentes en composición (Olubobokun y Craig, 1990). En cuanto a hábitats únicamente bacterianos se pueden definir cinco ambientes o formas de vida ruminal: i) Bacterias de vida libre en el fluido ruminal, ii) bacterias asociadas a las partículas de alimento pero de forma débil, iii) bacterias firmemente adheridas al material vegetal, iv) bacterias asociadas con el epitelio del rumen v) bacterias que se asocian a los protozoarios y esporangios fúngicos (Miron et al., 2001).

La población bacteriana adherida al epitelio ruminal es una compleja urdimbre de células unidas entre sí por fibras que a su vez se adhieren al glicocalix de la superficie epitelial (McCowan et al., 1978). Al adherirse al epitelio estos microorganismos tienen acceso continuo a los potenciales sustratos del fluido ruminal debido a las contracciones rítmicas del retículo-rumen además de acceso a los metabolitos que atraviesan el epitelio (McCowan et al., 1978). En estudios

con distintos enfoques se ha observado que las poblaciones microbianas adheridas rondan en valores de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/cm² de pared ruminal y que difieren con las encontradas en el fluido ruminal (Dehority y Grubb, 1981, Mitsumori et al., 2002). Estos microorganismos forman un biofilm protector y presentan una particular actividad ureolítica (Cheng et al., 1979). Recientemente se describió que la microbiota adherida a las paredes del retículo rumen está conformada por un 80% de bacterias que aun no han sido identificadas y puede ser definida como no cultivada aún lo que manifiesta la importancia de los estudios moleculares para estudiar este ecosistema (Lukáš et al., 2010). En general estas poblaciones dependen de la dieta que consumen los animales y se pueden encontrar miembros de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* como predominantes. En animales que consumen pasturas los miembros del *phylum Firmicutes* representan un 50% de la comunidad mientras que los *Bacteroidetes* un 33%. Estas proporciones se invierten en animales que consumen dietas ricas en concentrados (Sadet-Bourgeteau et al., 2010). Se ha detectado *Nitrosomas* asociadas a este epitelio lo que sugeriría un posible rol oxidante de metano y del amonio y se ha confirmado, desde el punto de vista molecular, las diferencias en composición de la biota bacteriana vinculada a la pared ruminal y al contenido (Mitsumori et al., 2002, Lukáš et al., 2010) con el grupo *Bacteroidetes* representando más del 90% de los clones de una librería y el grupo de los Gram positivos de bajo contenido G+C (LGCGPB) con el 5,6% (Cho et al., 2006).

En la fase líquida del contenido ruminal (fluido o líquido ruminal) los microorganismos se encuentran libres y se nutren de proteínas y carbohidratos solubles. Estos microorganismos o bien son planctónicos o son microorganismos que se despegaron de las partículas sólidas o del epitelio. Constituyen entre el 20 y 30% de la biomasa bacteriana (Miron et al., 2001) y están principalmente representados los *Bacteroidetes* (67,5%), LGCGPB en un 30% y *Proteobacteria* (2,5%) según las frecuencias de clones en una biblioteca de DNAr 16S (Cho et al., 2006). Pueden llegar a poblaciones de 10^{10} organismos por mililitro o incluso más. Estas relaciones pueden ser muy variables encontrándose en ocasiones bovinos en los que la mayor parte de esta microbiota está representada por miembros del grupo LGCGPB representando entre el 70 y el 98% de las

secuencias de bibliotecas de clones realizadas en diferentes condiciones alimenticias (Tajima et al., 2000).

Para estudiar esta fracción de la microbiota ruminal se han realizado abordajes tanto clásicos, que involucraron el cultivo, como moleculares. Se ha encontrado una gran diversidad genética en el rumen cuando se ha estudiado por medio de la construcción de bibliotecas de clones (Whitford et al., 1998, Tajima et al., 2000) y queda claro que la composición de la biota bacteriana ruminal está muy influida por la dieta. En el fluido ruminal se pueden encontrar miembros del grupo *Bacteroidetes* y del grupo *Prevotella-Bacteroidetes* como los grupos de microorganismos más representados (Whitford et al., 1998), los que se agrupan con la especie ruminal *Prevotella ruminicola*. Especies como *Selenomonas ruminantium* pueden ser aisladas y cultivadas de fluido ruminal y también puede ser detectadas en bibliotecas de clones (Prins, 1971, Tajima et al., 2000).

Más del 70% de la microbiota ruminal está asociada a la fase sólida del contenido ruminal (Forsberg y Lam, 1977). Estos microorganismos pueden estar fuertemente adheridos a las partículas o pueden estar asociados o atrapados por el material ingerido constituyendo la porción bacteriana que está débilmente asociada a las partículas (Czerwaski, 1986, Miron et al., 2001). Se calcula que la microbiota asociada a las partículas es responsable de entre el 88 y 91% de la actividad fibrolítica (endoglucanasa y xilanasas), del 70% de la actividad amilasa y del 75% de la actividad proteolítica del rumen (Miron et al., 2001) constituyendo ésta la fracción metabólicamente más importante del sistema ruminal. De hecho, las propiedades adhesivas de las bacterias encargadas de la degradación de las fibras son fundamentales para la consecuente fermentación y hace posible toda la cadena fermentadora del rumen.

2.3 Microbiota fibrolítica

Unas pocas especies de bacterias, protozoarios y hongos son los que llevan a cabo la fibrólisis, mientras que una población más abundante y diversa lleva a cabo la degradación de azúcares y almidones (Stewart y Bryant, 1988)

Cuando se desarrollaron los métodos de cultivo para bacterias anaerobias estrictas, Robert Hungate en la década del 50 aisló las bacterias celulolíticas predominantes y las clasificó como *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*. *B. succinogenes* se reclasificó como *Fibrobacter succinogenes* ya que no compartía homología a nivel del 16S con otros bacteroides (Montgomery et al., 1988). Junto a estas bacterias, *Butyrivibrio fibrisolvens* es otra especie que si bien es pobremente celulolítica, juega un rol importante en el proceso de fermentación de la celulosa ya que se encuentra asociada a otras en los llamados consorcios fibrolíticos (Shinkai et al., 2010). Junto a este grupo también se ubican las fibrolíticas *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium fibrisolvens* y *Eubacterium ruminantium* (Stewart y Bryant 1988). En estudios realizados con *primers* específicos fue posible determinar que existe en el rumen una mayor proporción de *R. flavefaciens* frente a *R. albus* y que sus poblaciones no superan el 1% del total del ARN 16S microbiano. Cuando se utilizó un *primer* dirigido al género *Ruminococcus* este valor alcanzó a un 8% por lo que las dos especies clásicas (*R. albus* y *R. flavefaciens*) no serían las únicas presentes en el rumen. *F. succinogenes* representaría el 1% de la población total del ARNr 16S (Stevenson y Weimer, 2007 en Russel et al., 2009). Weimer et al. (1999) realizaron estudios sobre la influencia de la dieta en las poblaciones de las tres especies mencionadas, ellos encontraron que las diferencias entre las dietas eran menores que las explicadas por las variaciones entre los diferentes animales. Los autores también encontraron una correlación positiva entre las poblaciones de *Ruminococcus* y la concentración de ácido butírico, lo que indicaría que estas bacterias establecen relaciones sinérgicas con productores de este ácido (Weimer et al., 1999).

Las bacterias encargadas de la fibrólisis deben adherirse firmemente a las partículas alimenticias para la subsiguiente degradación de la pared celular vegetal del alimento. Esto fue demostrado en ensayos en los que se utilizaron mutantes de importantes bacterias celulolíticas que eran deficientes en esta propiedad. Las bacterias mutantes carecían de adhesinas y no formaban interacciones con el sustrato fibroso viéndose disminuida su capacidad fibrolítica (Gong y Forsberg, 1989, Miron et al., 1998, Miron y Forsberg, 1998, Reddy y Morrison, 1998; Stewart et al., 1990).

La adhesión a las fibras y la digestión de las mismas es mediada por estructuras multienzimáticas unidas a las membranas llamadas celulosomas (Bayer et al.,

2008). El celulosoma producido por *R. flavefaciens* es de los más elaborados que se conocen y posee proteínas que lo mantienen unido a la membrana citoplasmática y a los complejos enzima-sustrato, por lo que la adhesión con la célula bacteriana es muy íntima (Bayer et al., 2008). Aparentemente *R. albus* también expresa celulosomas cuya estructura aun está por esclarecerse (Bayer et al., 2008). La arquitectura de los celulosomas y su ensamblaje es un área de mucho interés en el área de la nanotecnología industrial (Fontes y Gilbert, 2010). El proceso de fibrólisis llevado a cabo por las bacterias del rumen se ve inhibido a pH inferiores a 6 (Russell y Wilson, 1996). Este es un hecho de consideración cuando se evalúa el diseño de dietas de rumiantes. Las dietas ricas en grano que poseen una gran proporción de carbohidratos solubles provocan descensos de pH que se reflejan en una menor ingesta de materia seca como consecuencia de la detención de la fibrólisis (Russell y Wilson, 1996). Esto último es una de las causas de la acidosis bovina, una enfermedad de los rumiantes causada por el crecimiento en exceso de bacterias productoras de ácido láctico como *Streptococcus bovis* (Krause y Oetzel, 2005).

2.4 Probióticos ruminales

La modulación de la microbiota ruminal con el fin de aumentar el rendimiento productivo y prevenir trastornos digestivos en rumiantes ha sido una preocupación central para productores y profesionales vinculados al sector ganadero.

En las últimas décadas se han desarrollado numerosas y variadas estrategias con el objetivo de modular y estimular un desarrollo saludable de la microbiota ruminal, especialmente para prevenir trastornos digestivos como la acidosis o el meteorismo y aumentar la eficiencia alimentaria de los animales (Chiquette et al., 2008; Krause et al., 2003; Wright et al., 2004). Para manipular efectivamente la fermentación ruminal es necesario conocer la diversidad y las inter-relaciones entre los diferentes microorganismos ruminales necesarios para un correcto funcionamiento (Kobayashi, 2006)

Con este fin, tradicionalmente se ha recurrido a la administración de productos y fármacos antimicrobianos, aunque a esta práctica se han asociado en los últimos

años a problemas de salud pública vinculados a la emergencia de cepas bacterianas resistentes y a la generación de residuos en productos y subproductos de origen animal (Martin, 1998).

En los últimos años, la comunidad científica ha manifestado una gran preocupación por el alarmante incremento de la resistencia bacteriana a antibióticos y el riesgo potencial en seres humanos ante la disminución de efectividad en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Torres y Zaragoza, 2000). En Europa, se considera que la eliminación total del uso de antibióticos como promotores del crecimiento parece ser la opción más sensata y realista (Aarestrup et al., 2001).

Ante esta situación, sin embargo, se registran escasas patentes en el campo de las estrategias alternativas de modulación de la biota bacteriana ruminal dedicadas en particular a la prevención de la acidosis. En general se basan en la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* viva o inactivada, la administración de fluido ruminal bajo diversas formas o incluso de inhibidores sintéticos de la alfa-amilasa bacteriana (DeFrain et al., 2005).

En virtud de estas consideraciones, el campo de la producción de probióticos para salud y producción animal aparece como de prometedor desarrollo.

Se denomina probiótico a un monocultivo o un cultivo mixto "vivo" de microorganismos que tienen algún efecto beneficioso sobre animales o humanos al ser consumido en cantidades suficientes (FAO/WHO, 2001). El uso de probióticos, también llamados Direct Feed Microbials (DFM), es una práctica que tiene ya varias décadas 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 y col., 2002). En el ámbito académico existen diversos grupos de trabajo dedicados a investigaciones básicas y al desarrollo de probióticos y prebióticos para rumiantes, aunque aún los resultados no son concluyentes (Montaño y col., 1999, Píknova y col., 2004). Uno de los principales fundamentos que guían estas investigaciones es la modulación de la biota bacteriana ruminal "a favor" de aquellas especies que utilizan el lactato cuya acumulación anormal es clave en el desarrollo de la acidosis (Píknova y col., 2004). Existe también un creciente interés en administrar probióticos fibrolíticos

con el fin de optimizar la degradación de la fibra vegetal (Chiquette et al., 2007; Klieve et al., 2003).

La ventaja del uso de probióticos bacterianos con el fin de modular la biota ruminal es que se emplean bacterias nativas, las que, a diferencia de las bacterias exógenas, pueden presentar una buena capacidad de adaptación y permanencia en el órgano blanco (Vinderola y col., 2004). Además el efecto benéfico no sólo depende la especie sino que distintas cepas de una misma especie pueden variar en sus características a la hora de ser consideradas para su utilización como probióticos.

2.5 Abordajes *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal

Los métodos de evaluación del gas acumulado en fermentadores *in vitro* se desarrollaron para el estudio y la predicción de la fermentación de alimentos para rumiantes (Rymer et al., 2005). En estos ensayos los alimentos o sustratos son incubados con fluido ruminal fresco en presencia de tampones que simularían la acción de la saliva, los sustratos son fermentados por la microbiota ruminal presente en el fluido y se producen gases, ácidos y se genera biomasa microbiana. Al combinar medidas de degradación microbiana las técnicas de producción de gas proveen de una forma de medir las proporciones de alimento fermentado (Rymer et al., 2005).

En los años 70' Wilkins describió un abordaje para estudiar la cinética de la fermentación *in vitro* utilizando transductores de presión para determinar la presión acumulada en frascos cerrados herméticamente (Wilkins, 1974). A partir de los datos de presión se puede calcular el volumen de gas producido y describir los parámetros cinéticos que dirigen la fermentación. El proceso implica las medidas de presión acumulada en los fermentadores (Theodorou et al., 1994) y se han desarrollado metodologías de registro automáticas y semiautomáticas (Pell y Schofield, 1993; Cone et al., 1996; Mauricio et al., 1999; Davies et al., 2000).

Mediante el empleo de diferentes sustratos y soluciones tamponadoras es posible generar situaciones que simulen diferentes estados patológicos de los rumiantes

y probar estrategias de control y tratamiento. Por ejemplo, con abordajes en fermentadores *in vitro* se han generado situaciones similares a las que ocurren en el rumen cuando los animales sufren de acidosis (Tung y Kung, 1993). La acidosis ocurre cuando las condiciones de estabilidad del rumen se ven afectadas por factores diversos como por ejemplo la ingesta de carbohidratos fácilmente fermentables. En estas condiciones la comunidad microbiana se ve indefectiblemente influida. Así, un rápido descenso en el pH ruminal debido a la acumulación de ácidos grasos volátiles, particularmente láctico, provoca un aumento en las proporciones de *S. bovis* y otros microorganismos productores de ácido láctico (Krause y Oetzel, 2005). Esto genera la disminución de otros microorganismos como *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* alcanzando un estado en el cual los microorganismos productores de ácido láctico sobrepasan a los consumidores (Strobel y Russel, 1986). A su vez, la fracción celulolítica de la microbiota se ve afectada viéndose inhibida la degradación de los carbohidratos y por tanto toda la cadena de degradación de la fibra de los forrajes. Ésta constituye la principal patología en los sistemas intensivos y semi-intensivos de producción de leche y carne bovina por la incidencia de la misma y por las repercusiones económicas.

Mediante abordajes *in vitro* es posible evaluar diferentes compuestos que atenúan la caída del pH y es posible evaluar como se ve afectada la cinética de degradación de la fibra alimenticia en situaciones teóricas que serían mortales para animales en ensayos *in vivo*. Estos ensayos permiten la utilización de probióticos de forma segura en sistemas que simulan el rumen como paso previo a abordaje que involucren ensayos *in vivo*. De este modo, se estudió el efecto de la adición de una cepa de *M. elsdenii* en fermentadores *in vitro* con el fin de evaluar el efecto amortiguador en la concentración de ácido láctico en condiciones de acidosis (Kung y Hession, 1995). Con abordajes similares es posible estudiar diferentes situaciones experimentales y evaluar el papel que desempeñan cepas probióticas adicionadas en la dinámica de las poblaciones bacterianas *in vitro* (Perelmuter et al., 2010)

2.6 Estrategia del presente trabajo

En este trabajo se analizó la microbiota ruminal de una vaca a pastoreo mediante el empleo de dos metodologías complementarias entre sí. Por un lado, se analizó la microbiota bacteriana ruminal a través del empleo de medios de cultivo y por otro lado también se realizó la técnica *Fluorescent in situ hybridization* (FISH) utilizando sondas de oligonucleótidos dirigidas a detectar miembros seleccionados de la comunidad bacteriana ruminal. Asimismo, se aislaron e identificaron cepas bacterianas con potencial fibrolítico de un medio que contenía celulosa como fuente principal de carbono y energía. Estas cepas se caracterizaron en función de su identidad, características de crecimiento y perfil de inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Luego se seleccionó un grupo de ellas para evaluar su potencial modulador de la fermentación ruminal en un ensayo en fermentadores *in vitro*.

3. HIPÓTESIS

La biota bacteriana ruminal es fuente de microorganismos fibrolíticos con la capacidad potencial de modular la fermentación ruminal

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar una estrategia de selección de probióticos ruminales con potencial fibrolítico para modular la microbiota y la fermentación ruminal.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar parcialmente la microbiota ruminal de un animal a pastoreo
2. Aislar y caracterizar cepas bacterianas nativas con potencial fibrolítico
3. Evaluar y seleccionar potenciales probióticos de una colección de aislamientos
4. Evaluar *in vitro* la capacidad moduladora de los aislamientos seleccionados sobre la fermentación ruminal

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales y muestreos

Las muestras de contenido y fluido ruminal fueron tomadas de un bovino Holstein a pastoreo provista de cánula permanente en rumen que se encontraba alojada en el Campo Experimental Nº 2 de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° latitud sur, 35° longitud oeste). El animal no estaba en lactación en el momento de la extracción. El cuidado de los animales y la implantación de la cánula ruminal fueron realizadas siguiendo los protocolos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), de la UdelaR, Uruguay. Las actividades que involucraron la manipulación de animales fueron realizadas y supervisadas por profesionales veterinarios de Facultad de Veterinaria. Se extrajeron fracciones del contenido ruminal, manualmente y del fondo del saco ruminal para preparar dos tipos diferentes de muestras que fueron posteriormente analizadas.

Una fracción de 25 g del contenido ruminal sólido (muestra C) fue extraída e inmediatamente sumergida en 250 mL de buffer salino fosfatado (PBS) suplementado con 0,025 g/L de Na₂-Cisteína (PBS-Cys). Inmediatamente la suspensión se procesó en licuadora bajo una corriente de CO₂. Estos procedimientos fueron realizados para disgregar la fase sólida y con el fin de mantener las condiciones reductoras y anaerobias de la muestra. La suspensión resultante fue inmediatamente diluida al décimo en PBS-Cys en viales con atmósfera anaerobia, se realizaron diluciones seriadas al décimo y se procedió según como se describe en el siguiente apartado.

Las muestras de la fracción líquida del contenido, (fluido ruminal, muestras F) se obtuvieron filtrando muestras de contenido a través de un paño de quesería. El líquido obtenido por este medio fue inmediatamente gaseado con CO₂ y se procedió a diluirlo decimalmente como se explicó para las muestras C.

4.2 Medios de cultivo, manipulaciones y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo empleados se detallan en la tabla 4.1, las soluciones tampón y demás soluciones de este trabajo destinadas a su utilización en el cultivo o manipulación de microorganismos ruminales fueron preparadas con agua destilada hervida durante 10 minutos y luego enfriada bajo corriente de CO₂. Todas las botellas contenedoras utilizadas fueron gaseadas con CO₂ por al menos 3 minutos. Para la transferencia de soluciones y de suspensiones bacterianas se utilizaron jeringas estériles previamente enjuagadas con una solución estéril de Na₂S-Cys (0,25 g/L).

Los recuentos bacterianos fueron realizados utilizando la técnica de *rolling tube* propuesta por Hungate (1969) y modificada por Miller y Wolin (1974). Para ello se utilizaron diferentes diluciones de las muestras que se inocularon en botellas de 25 mL provistas de tapones de gomas y precintos de aluminio.

Para el recuento de microorganismos totales, aislamiento y mantenimiento de bacterias aisladas se usó un medio de cultivo que tuvo como base la composición del descrito por Stahl et al. (1988). Este medio de cultivo (MB) fue utilizado como base para diseñar estrategias de recuento y aislamiento de bacterias potencialmente fibrolíticas y consumidoras de ácido láctico de acuerdo a las modificaciones que se especifican en cada caso (tabla 4.1).

La composición del medio MB se detalla en la tabla 4.1. El fluido ruminal clarificado que se adicionó al MB se preparó según Grubb y Dehority, 1976. Para ello el fluido ruminal fresco se filtró por un paño de quesería, luego se centrifugó por 10 min a 1000 x g y el sobrenadante resultante fue nuevamente centrifugado durante 20 min a 25000 x g (Grubb y Dehority, 1976).

Las incubaciones en los diferentes medios se realizaron a 39°C, el recuento de microorganismos anaerobios totales se registró luego de cuatro días de incubación.

Para el recuento de microorganismos potencialmente consumidores de lactato se utilizó el medio base-lactato, una modificación del MB (MB-L, tabla 4.1), al cual no se le agregaron los carbohidratos ni los ácidos grasos volátiles, mientras que contenía 2% de ácido láctico como principal fuente de carbono y energía (Mackie y Heath, 1979). Los recuentos en este medio se registraron luego de seis días de incubación.

Tabla 4.1. Composición de los medios MB, MB-L y MB-C

Ingrediente	Medio base ⁺ (MB)	Medio base- Lactato ^{f+} (MB-L)	Medio base- Celulosa ^{g+} (MB-C)
	Cantidad cada 500 mL		
Solución A ^a	83 mL	83 mL	83 mL
Solución B ^a	83 mL	83 mL	83 mL
Fluido Ruminal clarificado ^b	100 mL	100 mL	100 mL
Extracto de levadura	250 mg	100 mL	100 mL
Triptona	250 mg	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 ^c	0,31 mL		0,31 mL
Solución A de Vitaminas ^d	0,01 mL		0,01 mL
Solución B de Vitaminas ^d	0,05 mL		0,05 mL
Solución C de Vitaminas ^{d*}			
Solución Reductora ^{e*}			
Resazurina	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg
DL-Lactato		10 mL	
Celulosa microcristalina			10 %

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

b Grubb y Dehority, 1976.

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

d Modificado de Scott y Dehority, 1964. Stock Sol A: piridoxina clorhidrato 0,1 mg/mL, riboflavina 0,1 mg/mL, tiamina clorhidrato 0,1 mg/mL, nicotinamina 0,1 mg/mL, Ca-D- pantotenato 0,1 mg/mL y ác. p-aminobenzoico 5x10⁻³mg/mL. Stock Sol B: vitamina B12 0,25 mg/mL. Stock Sol C: ác. fólico 0,5 mg/mL, biotina 0,5 mg/mL. Stock de Sol C esterilizada por filtración.

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

f Modificado de Mackie y Heath, 1979.

g Modificado de Stahl et al., 1988.

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

+ pH ajustado a 6,5 con NaHCO₃

El recuento y aislamiento de microorganismos potencialmente celulolíticos se realizó en el medio base- celulosa (MB-C) cuya composición fue como la del MB,

sin el agregado de los hidratos de carbono (glucosa, almidón, maltosa, celobiosa y xilosa) y con la adición de celulosa microcristalina (Avicel PH101, 10%) con el objetivo que la celulosa fuera la principal fuente de carbono y energía (Tabla 4.1). Las incubaciones se realizaron durante 10 días.

Para el recuento de microorganismos aerobios se utilizó el medio Infusión cerebro-corazón (BHI, Composición por litro: infusión de cerebros de ternera 200 g, infusión de corazón vacuno 250 g, proteasa peptona 10 g, dextrosa 2 g, NaCl 5 g, Na₂HPO₄ 2,5 g; Difco, USA). Se sembraron en superficie diluciones adecuadas y las incubaciones se realizaron a 39°C durante 24 h.

4.3 *Fluorescent in situ hybridization* (FISH)

La microbiota total, cultivable y no cultivable fue cuantificada y caracterizada utilizando la técnica *Fluorescent in situ hybridization* (FISH). Para esto las muestras C y F se fijaron en etanol al 50%, a 4°C durante 24h y luego se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Las muestras fijadas fueron diluidas adecuadamente y luego se filtraron utilizando filtros ISOPORE de 0,2 µm (MILLIPORE, Irlanda). Los filtros fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Las hibridaciones fueron realizadas sobre segmentos de los filtros según Pernthaler et al. (2003a). Las sondas utilizadas se presentan en la tabla 4.2, las condiciones de hibridación fueron optimizadas para cada sonda (Perelmuter et al., 2008). Se utilizó una mezcla equimolar de 3 sondas para la detección de componentes del Dominio *Bacteria* (Amann et al., 1990; Daims et al., 1999) Las sondas estuvieron dirigidas a detectar diferentes grupos y especies bacterianas tradicionalmente asociadas a diferentes miembros de la microbiota ruminal con diferentes funciones. Se utilizaron sondas dirigidas a bacterias consumidoras de lactato: *Selenomonas ruminatum*, *Propionibacterium* spp., *Megaesphaera eldesnii*; bacterias celulolíticas: *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* y una sonda para detectar *Streptococcus* spp. dada su relevancia en la acidosis bovina. A partir de los recuentos en las fracciones de filtro se calcularon los valores de microorganismos por mililitro para las muestras F y por gramo para

las muestras C. Los porcentajes relativos se hicieron a partir de los números absolutos.

Tabla 4.2 Sondas de oligonucleótidos para FISH

Sonda	Secuencia de la sonda (5'-3')	% formamida	Referencias
<i>Selenomonas ruminantium</i> (Srum)	CCCATCTTTGCGGCAGGTTG	40	Perelmuter et al. 2008b
<i>Megasphaera elsdenii</i> (Mega)	ACCCGTTTGCCACTCGAATC	30	Perelmuter et al. 2008b
<i>Ruminococcus albus</i> (Ralb)	TGCGGTTAGAACACAGGC	30	Perelmuter et al. 2008b
<i>Propionibacterium</i> spp. (Prop)	AATTCCATTCTCCCCTACCTTC	35	Perelmuter et al. 2008b
<i>Streptococcus</i> spp. (Strep)	GTAGGCAGGTTACCTACGCG	10	Perelmuter et al. 2008b
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (Rfla)	CCCTCTCTCTAAGGTAGG	10	Perelmuter et al. 2008b
Eubacteria (EUBMIX)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT GCAGCCACCCGTAGGTGT GCTGCCACCCGTAGGTGT	35	Amann et al., 1990

4.4 Aislamiento bacteriano

Con el fin de obtener miembros cultivables de la comunidad microbiana potencialmente fibrolítica del rumen bovino se repicaron colonias aisladas a partir de los viales de MB-C en los que se realizaron los recuentos. Para esto se utilizaron jeringas estériles previamente tratadas con una solución de Na₂S-Cys 0,25 g/L. Cada colonia se inoculó en caldo MB y se registró el crecimiento cada 24 h. Cuando el crecimiento fue evidente se realizó coloración de Gram y se transfirieron aproximadamente 50 µL de caldo en un vial conteniendo MB suplementado con agar para observar el crecimiento de colonias.

En caso de observarse más de un tipo de colonia se realizaron reaislamientos posteriores en MB. Los diferentes aislamientos se conservaron a -80°C en MB-glicerol al 15% en viales con atmósfera anaerobia.

4.5 Identificación bacteriana

La identificación de los aislamientos seleccionados se realizó por medio de la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.

Con este fin, se extrajo ADN genómico empleando el sistema comercial Gene elute bacterial genomic DNA extraction kit (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego se realizaron reacciones de PCR para amplificar los fragmentos de los genes que codifican para el ARNr 16S, empleando los cebadores universales para el Dominio *Bacteria* 27F (5'-AGATTGATCMTGGCTAGGGA-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', Lane, 1991). Las mezclas de PCR consistieron en 2,5 µL de buffer de ADN polimerasa, 0,5 µL de una mezcla de dATP, dCTP, dTTP y dGTP 10 mM de cada uno, 0,3 µL de cada cebador 15 mM, 2 µL de ADN, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM y 0,2 µL de *Taq* polimerasa (Invitrogen, Brasil) en un volumen final de 25 µL. El programa de PCR consistió de un ciclo inicial de 94°C durante 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 a 72°C por 10 min (Fraga et al., 2008). Las reacciones se realizaron en un termociclador (T1, Biometra, Alemania) y los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8 %) teñido con bromuro de etidio (concentración final 1 µg/mL). Los productos de PCR, fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el software BioEdit y luego se compararon con secuencias ya publicadas en dos bases de datos. Se compararon utilizando la herramienta Classifier del Ribosomal Database Project (RDP) para comparar las secuencias con esa base de datos (Wang et al., 2007) y también se utilizó la base de datos del *GenBank* del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando la herramienta BLASTn con el fin de determinar la afiliación de los aislamientos (Altschul et al., 1997).

4.6 Actividad antimicrobiana

Se estudió la actividad antimicrobiana de los aislamientos realizados a partir del medio MB-C. Para esto se desarrolló una metodología basada en ensayos “*spot on the lawn*” (Perelmuter et al., 2008a). Dada la naturaleza anaerobia de los aislamientos los ensayos se realizaron en viales de 25 mL con atmósfera reductora, enriquecida en CO₂ y en el medio MB. Se utilizaron jeringas estériles para inocular una gota de un cultivo en caldo del aislamiento a ensayar en el vial previamente sellado y así realizar una pequeña colonia en la superficie del medio de cultivo. Se realizó una primera incubación a 39 °C durante 24 a 48 h (dependiendo del aislamiento) para permitir el desarrollo de las colonias y la producción de sustancias antimicrobianas. Una vez crecidas, se colocó encima y a través del tapón de goma un cultivo inoculado con un microorganismo indicador (10⁶ UFC/mL). Se empleó *Escherichia coli* para evaluar el efecto sobre una bacteria Gram negativa (Perelmuter et al. 2008a) y *Streptococcus bovis* como patógeno Gram positivo (Perelmuter et al., 2008b). La actividad antimicrobiana frente a *S. bovis* es deseable ya que el crecimiento exacerbado de este microorganismo está relacionado con el proceso patológico acidosis bovina

4.7 Ensayos de fermentación *in vitro*

Para evaluar la capacidad de modular la microbiota ruminal y la habilidad fermentadora de aislamientos seleccionados se realizó un ensayo en fermentadores *in vitro* con tres sustratos diferentes. Se utilizó la metodología propuesta por Theodorou et al. (1994), modificada por Mauricio et al. (1999). Los aislamientos seleccionados (siete) se escogieron en base a distintas características ensayadas y observadas. Se tuvo en cuenta las características de crecimiento, por lo que no se tuvieron en cuenta aquellos aislamientos que no presentaban crecimiento abundante a las 24 h de incubación. Se eligieron aislamientos que, según su identidad, estuvieran relacionados con microorganismos potencialmente fibrolíticos (celulíticos y hemicelulolíticos) y que representaran distintas posibilidades con respecto al ensayo de efecto

antimicrobiano (sin efecto, efecto con ambos indicadores y efecto frente a un sólo indicador).

Se utilizaron frascos de 125 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 0,5 g de uno de los sustratos molidos y secos. Se utilizó paja de trigo molida en molida con criba de 1 mm (Tabla 4.3); celulosa microcristalina (Avicel PH101) y xilano de avena (Sigma).

El día previo al comienzo del ensayo se adicionaron a los frascos 40 mL de una solución buffer (Oeztuerk et al., 2005) que cumplió la función de saliva artificial y 0,1 mL de solución reductora (Na₂S). Se permitió que los sustratos se hidrataran a 4 °C durante aproximadamente 18 h.

Tabla 4.3 Composición química (%en base seca) de la paja molida utilizada en los ensayos *in vitro**

MS	MO	FND	FAD	PB	LAD
87,3	96,0	74,7	45,7	5,63	7,87

*Determinaciones realizadas por el Departamento de Nutrición, Fac. de Veterinaria. MS, Materia seca; MO, Materia orgánica, FND, Fibra neutro detergente; FAD, Fibra ácido detergente; PB, proteína bruta; LAD, lignina ácido detergente

Se extrajo fluido ruminal fresco de una vaca con cánula ruminal permanente que fue inmediatamente sometido a saturación con CO₂ para mantener las condiciones libres de O₂ del fluido. En cada frasco se colocaron 10 mL del fluido ruminal, se saturó la atmósfera con CO₂ e inmediatamente los frascos se taparon con tapón de goma y se cerraron herméticamente con precinto de aluminio. Luego, se inoculó una suspensión de las cepas probióticas a ensayar para alcanzar una concentración de aproximadamente 10⁶ células/mL. Se realizaron blancos que tenían sustrato y no contenían fluido ruminal y controles que contenían los sustratos pero no las cepas probióticas. Las incubaciones se realizaron por triplicado en todos los casos.

Los frascos se incubaron en un baño de agua a 39 °C y a los tiempos 2, 4, 6, 8, 10, 18, 24, 48, 72 y 96 h se midió la presión producida por los gases generados durante la fermentación utilizando un manómetro digital (Cole Parmer Instrument Co.) y aguja hipodérmica de 0,6 mm. Luego de cada medición se procedió a liberar la presión contenida en cada frasco, se los agitó y se siguieron incubando hasta la siguiente medición. En la hora 96 se realizó la última medida de presión de gas, luego se abrieron los frascos, se midió el pH y se extrajo una muestra

para analizar el perfil de AGV, la cual fue conservada en ácido perclórico 0,1M hasta su utilización.

La presión de gas, expresada en psi (P), registrada en los fermentadores fue convertida a volumen de gas (V) mediante la ecuación de predicción obtenida en un experimento previo: $V = 4,40 P + 0,09 P^2$

Al volumen de gas producido en cada frasco se le restó el producido por el promedio de los blancos. Con el fin de obtener una descripción cinética del proceso de fermentación en cada frasco, los datos de volumen de gas calculado se ajustaron de acuerdo a un modelo bicompartimental logístico propuesto por

Schofield et al. (1994) según la expresión:
$$Vol = \frac{V_{fr}}{1 + e^{2+4k_{dr}(L-T)}} + \frac{V_{fl}}{1 + e^{2+4k_{dl}(L-T)}}$$
,

donde Vfr es el Volumen de gas producido por la degradación de la fracción de rápida de fermentación expresado en mL de gas por gramo de sustrato (mL/g), Kdr es la tasa de producción de gas de la fracción rápida expresado en h⁻¹, Vfl: Volumen de gas producido durante la degradación de la fracción de lenta degradación (mL/g), Kdl es la tasa de producción de gas de la fracción lenta (h⁻¹) y L es el tiempo de latencia de producción de gas (fase lag) o de colonización (h). Además se calculó el parámetro volumen total (Vt) como la suma de Vfr y Vfl.

4.8 Perfil de ácidos grasos volátiles en los fermentadores *in vitro*

Con el fin de evaluar el efecto de la inoculación de los aislamientos sobre la concentración de los ácidos carboxílicos láctico, acético, butírico, propiónico, valérico e isovalérico (en adelante ácidos grasos volátiles, AGV) de los fermentadores *in vitro* se analizaron éstos por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Para esto y a la hora 96 del ensayo, tiempo final, se tomó una alícuota de 500 µL del líquido de cada fermentador y se le adicionó un volumen igual de ácido perclórico 0,1 M, las muestras así fijadas se almacenaron inmediatamente a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras se centrifugaron (15000 rpm, 15 min, 5°C) y se inyectaron 100 µL de cada sobrenadante en un equipo HPLC modular Waters, compuesto por una bomba binaria, detector de arreglo de diodos (rango 210 a 500 nm) e inyector

automático. Se utilizó una columna C18 (modelo LUNA, Phenomenex, USA) de 250 x 46 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y un tamaño de poro de 150 Å. La fase móvil fue inyectada con un flujo de 1 mL/min y consistió de un gradiente de acetonitrilo (2% a 90%) y H₃PO₄ 0,5%, pH 2. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Se determinaron los tiempos de retención de los ácidos láctico, acético, butírico, propiónico, valérico e isovalérico por medio de la inyección de estándares (0,5 µg/mL) que también se usaron como referencia para calcular las concentraciones de estos ácidos en las muestras. Los picos de interés en los cromatogramas se integraron a 210 nm (Parrott et al., 2001). Estos procedimientos fueron realizados en el Departamento de Neuroquímica, IIBCE.

Los datos en mg/mL de cada ácido volátil fueron convertidos a concentraciones milimolares empleando la masa molar molecular de cada ácido, se calculó la concentración total de todos los ácidos en cada frasco como la suma de las concentraciones de cada ácido, además se calculó la relación acético/propiónico (A/P).

4.9 Análisis estadístico

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

Para las variables de producción de gas *in vitro* se aplicó un procedimiento GLM utilizando el SAS y aplicando del siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + S_j + (C \times S)_{ij} + e_{ijk},$$

donde μ es la media general, C_i es el efecto fijo de la incorporación de la cepa, S_j es el efecto fijo del sustrato, $(C \times S)_{ij}$ es el efecto fijo de la interacción cepa por sustrato (cepa*sustrato) y e_{ijk} es el error residual.

A partir del análisis de los datos de producción de gas *in vitro*, cuando el efecto de la interacción cepa*sustrato fue significativo ($P \leq 0,05$), se procedió al desdoblamiento del efecto cepa. A dichos efectos se realizó otro GLM utilizando los datos agrupados según cada sustrato (paja de trigo molida, celulosa

microcristalina o xilano de avena) utilizando el paquete estadístico SAS. Se aplicó el modelo

$$Y_{ij} = \mu + C_i + e_{ij}$$

Los datos de concentración de AGV, pH y A/P fueron analizados aplicando un procedimiento GLM del SAS utilizando el mismo modelo, cuando hubo interacción cepa*sustrato se procedió como se hizo con los parámetros de fermentación *in vitro*.

En todos los casos se aceptaron como diferencias significativas valores de $P \leq 0,05$. Las medias de todos los parámetros evaluados fueron comparadas entre sí mediante el test de Tukey como test "a posteriori".

5. RESULTADOS

5.1 Recuentos bacterianos

En este trabajo se realizaron recuentos de bacterias anaerobias y aerobias totales, potenciales consumidoras de ácido láctico y potenciales fibrolíticas. Los resultados se presentan en la tabla 5.1 Las muestras originales provinieron del rumen de una vaca que no estaba en lactación y que estuvo a pastoreo exclusivo durante 20 días antes de la toma de muestras. Los valores entre las muestras de contenido y fluido ruminal fueron similares y se observó que la microbiota bacteriana cultivable en MB-C y en MB-L representó aproximadamente el 10% de la microbiota bacteriana cultivable en condiciones de anaerobiosis. Los microorganismos aerobios mostraron valores aproximadamente 100 veces menores que los observados en anaerobiosis.

Tabla 5.1 Recuentos bacterianos

Grupo*	Fluido ruminal (UFC/mL)	Contenido ruminal (UFC/g)
Aerobios	$(2,10 \pm 0) \times 10^7$	$3,60 \pm 0,70) \times 10^7$
Anaerobios totales en MB	$(2,25 \pm 0,75) \times 10^9$	$(1,80 \pm 0,17) \times 10^9$
MB-C	$(2,60 \pm 0,94) \times 10^8$	$(7,40 \pm 0,75) \times 10^8$
MB-L	$(3,35 \pm 2,03) \times 10^8$	$(2,25 \pm 0,84) \times 10^8$

* MB-C, microorganismos en medio con celulosa como fuente principal de carbono y energía; MB-L, microorganismos en medio con lactato como principal fuente de carbono y energía.

5.2 Abundancia relativa y absoluta de microorganismos por medio de la técnica FISH

Se aplicó la metodología de FISH para cuantificar las distintas poblaciones de la microbiota bacteriana ruminal utilizando sondas para diferentes grupos microbianos de interés en el ambiente ruminal. Esto permitió cuantificar a los microorganismos *in situ* sin la necesidad de cultivo. Los resultados se presentan en la tabla 5.2 para las muestra C y en la tabla 5.3 para las muestras F. Los números absolutos fueron calculados utilizando el área de filtro contado, el área

total del filtro (1256 mm²) y la dilución filtrada. El total de microorganismos (contabilizado mediante la tinción con DAPI) en las muestras C fue $3,3 \times 10^{10}$ células/g y los miembros del Dominio *Bacteria* representaron el 54,6%. En F se contaron $1,47 \times 10^{10}$ células/mL con DAPI y los miembros del Dominio *Bacteria* representaron el 61,1% del total de microorganismos. Los porcentajes que se presentan en ambas tablas fueron realizados en función de la cantidad total de células hibridadas con las sondas dirigidas al Dominio *Bacteria*. En la figura 5.1 se muestra un ejemplo de hibridación con la sonda RFLA donde se ven las bacterias hibridadas adheridas a una partícula de alimento.

Tabla 5.2. Número de células totales y abundancias de algunos grupos bacterianos en contenido ruminal

Grupo Bacteriano	N° de bacterias (células/g)	% en función del total de bacterias
Dominio <i>Bacteria</i>	$1,5 \times 10^{10}$	
Bacterias celulolíticas		
<i>Ruminococcus albus</i>	$1,3 \times 10^8$	0,8
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	$9,4 \times 10^7$	0,6
Bacterias consumidoras de lactato		
<i>Selenomonas ruminantium</i>	$1,9 \times 10^8$	1,3
<i>Propionibacterium spp</i>	$1,6 \times 10^7$	0,1
<i>Megaesphaera elsdenii</i>	$1,3 \times 10^8$	0,8
<i>Streptococcus spp.</i>	$< 1 \times 10^7$	$< 6,6 \times 10^{-2}$

Tabla 5.3: Número de células totales y abundancias de algunos grupos bacterianos en Fluido ruminal

Grupo Bacteriano	N° de bacterias (células/mL)	% en función del total de bacterias
Dominio <i>Bacteria</i>	$6,7 \times 10^9$	
Bacterias celulolíticas		
<i>Ruminococcus albus</i>	$1,2 \times 10^8$	1,8
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	$< 1 \times 10^7$	$< 0,1$
Bacterias consumidoras de lactato		
<i>Selenomonas ruminantium</i>	$1,0 \times 10^8$	1,5
<i>Propionibacterium spp</i>	$3,4 \times 10^7$	0,5
<i>Megaesphaera elsdenii</i>	$1,0 \times 10^8$	1,5
<i>Streptococcus spp.</i>	$< 1 \times 10^7$	$< 0,1$

5.3 Aislamiento bacteriano e identificación de aislamientos

Se conformó una colección de 46 aislamientos que fueron aislados del medio MB-C.

Algunos de estos aislamientos fueron identificados por medio la de amplificación y posterior secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S. La identidad deducida luego de la comparación las bases de datos de la NCBI y el RDP se presentan en la tabla 5.4.

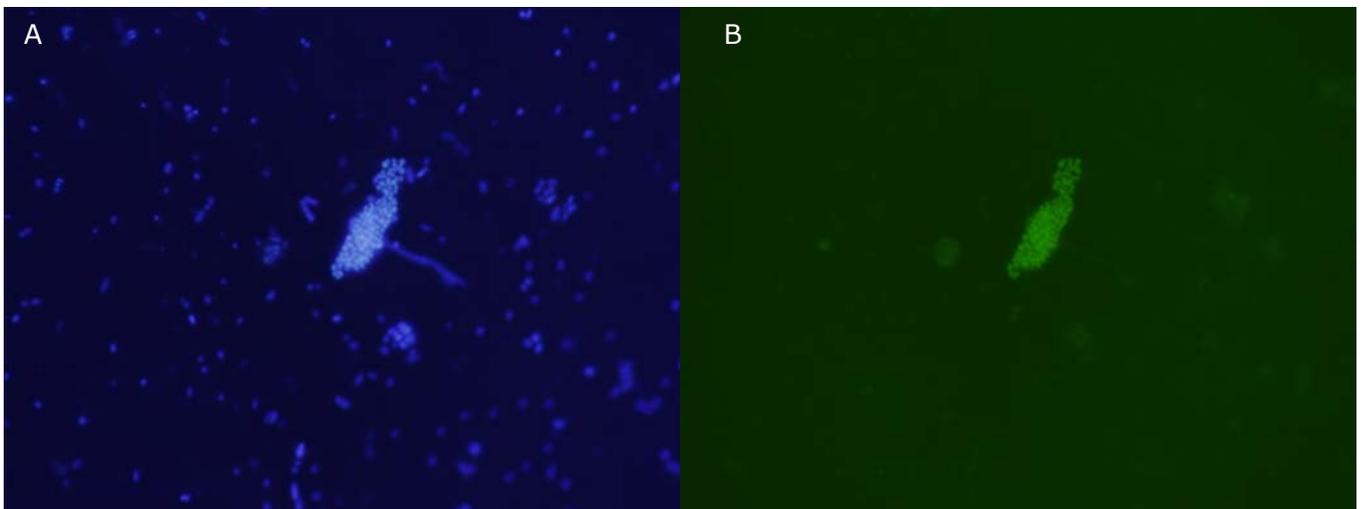


Fig. 5.1 Células marcadas con DAPI (A) e hibridadas con la sonda RFLA (B), nótese que las células hibridadas son las uqe están adheridas a una partícula de alimento.

Algunos de estos aislamientos fueron identificados por medio la de amplificación y posterior secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S. La identidad deducida luego de la comparación con las bases de datos de la NCBI y el RDP se presentan en la tabla 5.4.

Por medio de este abordaje se pudieron aislar miembros de la comunidad microbiana ruminal anaerobia. Todos los aislamientos identificados se relacionan filogenéticamente con grupos de organismos anaerobios estrictos y de anterior descripción en el ambiente ruminal. De los grupos elegidos a priori para cuantificar por FISH sólo se identificaron representantes de *S. ruminantum* en la colección de aislamientos.

Tabla 5.4. Identidad de los aislamientos obtenidos de MB-C deducida al comparar las secuencias obtenidas con la base de datos del *GenBank*

Cepa	Identidad	% de identidad	Número de acceso *
3F20C	<i>Eubacterium cellulosolvans</i>	99	AY178842
3F21C	<i>Lachnospiraceae</i> no descrito ⁺		
3F22C	<i>Lachnospiraceae</i> no descrito ⁺		
3C20C	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	99	EU346757.1
4C50C	<i>P. ruminis</i>	99	AF202262
4C51C	<i>Oribacterium</i> sp ⁺		
4C52C	<i>Succinivibrio dextrinosolvans</i>	98	NR_026476
4C53C	<i>Selenomonas ruminantium</i>	98	AB558164
4C54C	<i>Selenomonas ruminantium</i>	98	AY685144
4C55C	<i>P. ruminis</i>	99	AF202262
4C57C	<i>Lachnospiraceae</i>		
4C59C	<i>P. ruminis</i>		
4C60C	<i>P. ruminis</i>	99	AF202262
4C62C	<i>P.ruminis</i>	99	AF202262
4C63C	<i>Butyrvibrio hungateii</i>	99	AY178635
4C64C	<i>P.ruminis</i>		
4C68C	<i>Streptococcus</i> sp.	99	FJ611790
4C70C	<i>Lachnospiraceae</i> no descrito ⁺		
4C72C	<i>S. ruminantium</i>		AY685144
4F74C	<i>Prevotella</i> spp.		
4C80C	<i>B. fibrisolvans</i>		

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

5.4 Actividad antimicrobiana de los aislamientos

El potencial efecto antimicrobiano de las distintas cepas fue evaluado empleando un microorganismo Gram positivo y uno Gram negativo. Para esto se puso a punto la técnica de "spot on the lawn" para adecuarse a las necesidades de ambiente anaerobio de los aislamientos ruminales. Veintiocho aislamientos representando el 61% del total no presentó efecto frente a *E. coli* ni a *Streptococcus bovis*. Cinco aislamientos presentaron efecto antagonista frente a ambos indicadores mientras que 12 aislamientos mostraron actividad inhibidora frente al indicador Gram positivo *Streptococcus bovis* pero no contra *E. coli*. Un aislamiento presentó actividad antagonista sólo frente a *E. coli*. Los resultados se ilustran en la figura 5.2.

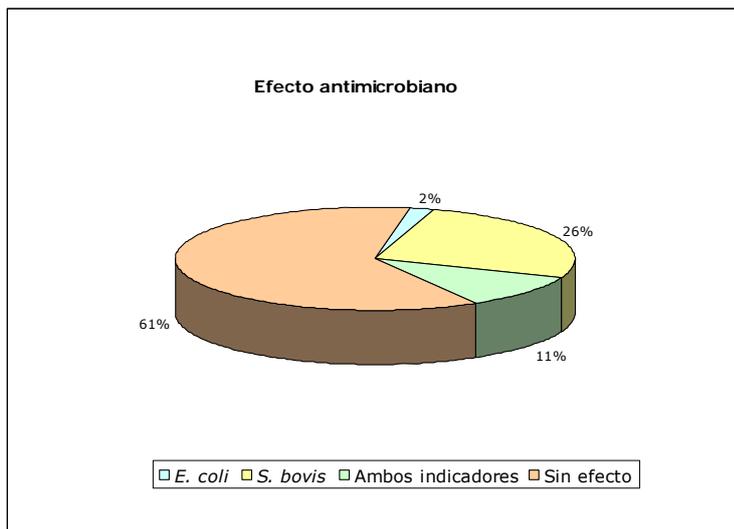


Figura 5.2 Efecto antimicrobiano de las 46 cepas cepas aisladas empleando *E. coli* y *S. bovis*

5.5 Evaluación *in vitro* de la modulación de los parámetros de fermentación

Con el fin de evaluar la capacidad de los aislamientos en modular los parámetros de la cinética de fermentación ruminal e influir en la composición de los productos finales de la fermentación se realizó un ensayo en fermentadores *in*

vitro. Se utilizaron siete cepas y una mezcla de dos de ellas las que fueron incubadas con paja de trigo, celulosa microcristalina y xilano de avena.

5.5.1 Elección de cepas

Las cepas utilizadas en los ensayos *in vitro* se presentan en la Tabla 5.5. Los aislamientos utilizados son potencialmente fibrolíticas o están relacionadas con bacterias que lo son. 3F21C y 3F22C son aislamientos que aún no han sido caracterizados pero que guardan relación filogenética con bacterias fibrolíticas. Las cepas restantes tienen más de 99% de homología con secuencias ya publicadas de *Pseudobutyrvibrio ruminis*.

Se utilizaron tres cepas de *P. ruminis* que presentaron efecto antimicrobiano frente a ambos patógenos y dos que no mostraron efecto frente a los patógenos indicadores. En los otros dos casos una presentaba efecto sólo frente a *E. coli*. Todos los aislamientos presentaron abundante crecimiento en las condiciones de cultivo. Para conformar la mezcla de 2 cepas fueron elegidas las cepas 4C62C y 4C50C dado que la cepa 4C62C presentaba interesantes cualidades de agregación lo que la hacía atractiva como potencial fibrolítica y la cepa 4C50C fue la única de la colección que presentó un halo claro de digestión de celulosa en el medio MB-C cuando fue aislada

Tabla 5.5 Cepas utilizados en el ensayo *in vitro*

Aislamiento	Identidad	Efecto antimicrobiano	
		<i>E. coli</i>	<i>S. bovis</i>
3C20C	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	+	+
4C50C	<i>P. ruminis</i>	-	-
4C55C	<i>P.ruminis</i>	+	+
4C60C	<i>P.ruminis</i>	+	+
3F21C	<i>Lachnospiraceae</i>	-	-
3F22C	<i>Lachnospiraceae</i>	+	-
4C62C	<i>P.ruminis</i>	-	-

5.5.2 Parámetros de la fermentación ruminal

En las figuras 5.2, 5.3 y 5.4 se presentan los datos de volumen de gas en función del tiempo para los tres sustratos. Salvo en cuatro de los frascos los datos se pudieron ajustar al modelo bicompartimental con $p \leq 0,05$. Para cada frasco se obtuvo el valor de los parámetros cinéticos que describen la fermentación (V_t , V_{fr} , V_{fl} , L , K_{dr} y K_{dl}), las comparaciones estadísticas se realizaron teniendo en cuenta a los triplicados.

Luego de analizados los diferentes parámetros de la cinética de fermentación mediante el procedimiento GLM se observó que hubo diferencias significativas entre las distintas cepas en todos los parámetros independientemente del sustrato (p del efecto cepa $\leq 0,05$) y que también hubo efecto del sustrato en todos los casos ($p \leq 0,05$); además para todos los parámetros existió interacción cepa*sustrato ($p \leq 0,05$). Dada la interacción entre cepa y sustrato y para todos los parámetros analizados se desdobló esta interacción analizando el efecto cepa con cada uno de los sustratos.

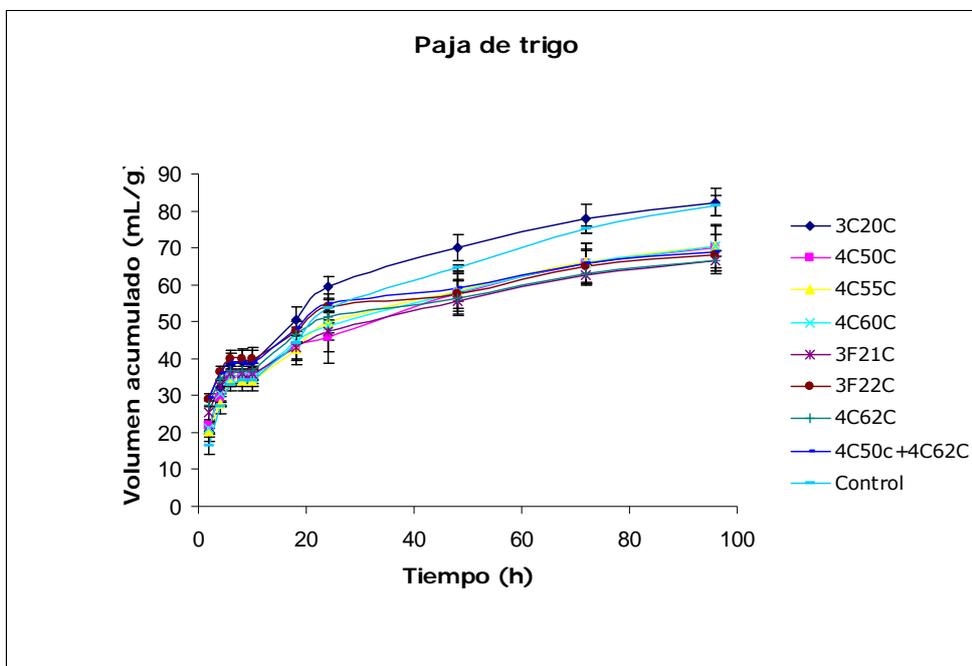


Figura 5.3 Curvas de Volumen acumulado de gas/g de sustrato (paja de trigo) en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

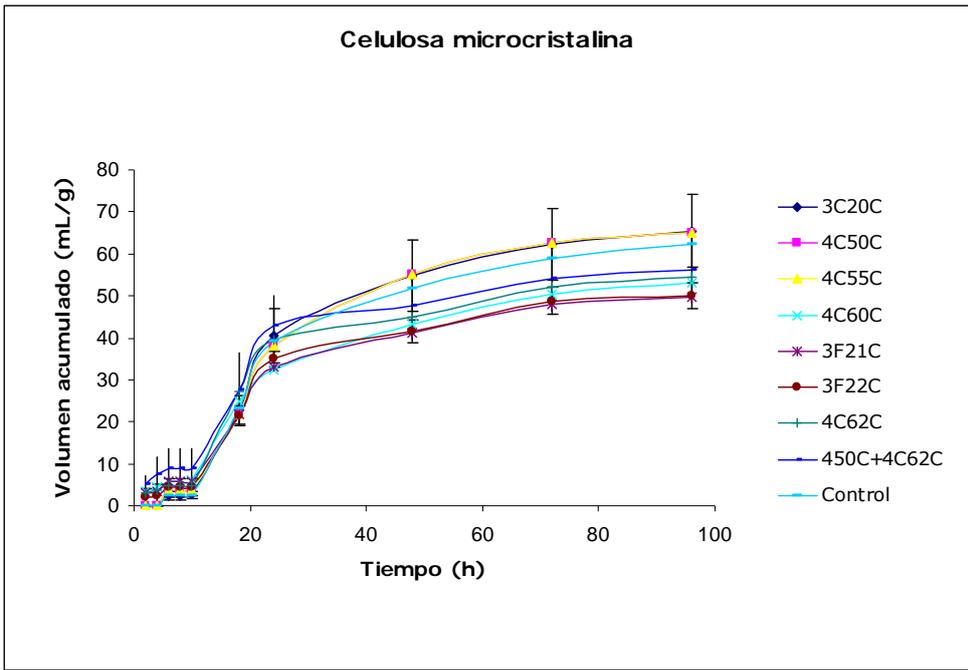


Figura 5.4 Curvas de Volumen/g de celulosa microcristalina en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

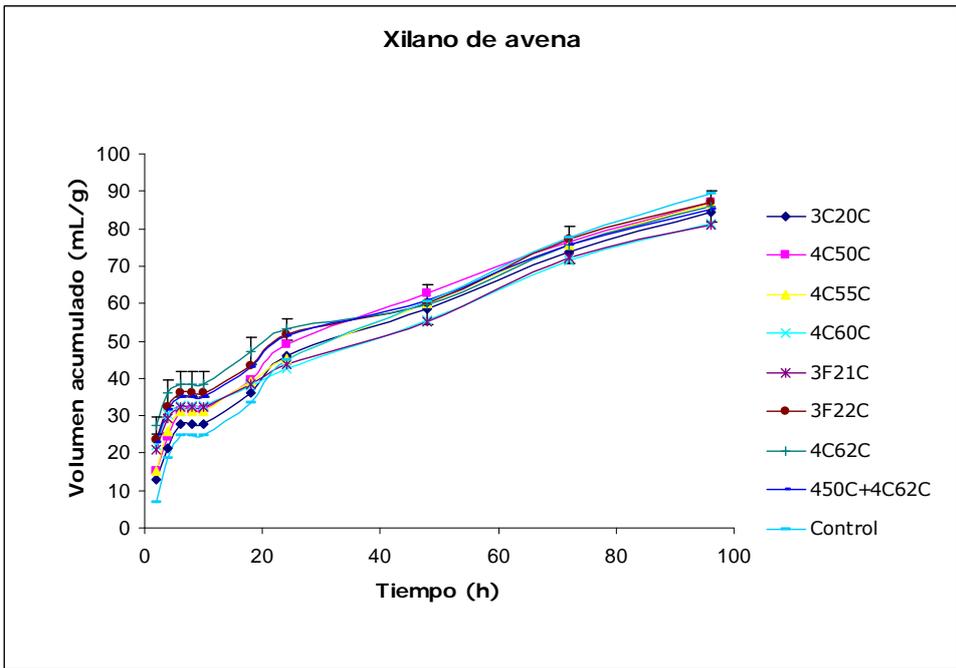


Figura 5.5 Curvas de Volumen/g de xilano en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

Sustrato: paja de trigo

Analizando el desempeño de las cepas en presencia de paja de trigo se pudo observar diferencias en los frascos suplementados con las cepas con respecto al control (Tabla 5.7). Con la combinación de las cepas 4C50C+4C62C se observaron diferencias con respecto al control en el tiempo de latencia (L) y en los volúmenes de gas producido en la fase lenta (Vfl) y rápida de fermentación (Vfr). Si bien se detectaron diferencias significativas analizando el volumen total con el procedimiento GLM, cuando se realizó el test de Tukey no se pudo detectar con qué cepas las hubo.

La cepa 4C62C fue muy eficiente en la producción de gas en la fase rápida (Vfr elevado), fue distinta al control y mostró el valor más alto de todos los tratamientos, esta cepa se agrupó junto a la combinación 4C50C+4C62C y con 3F22C considerando este parámetro.

En todos los tratamientos el volumen de gas producido en la fase lenta de fermentación fue menor que el control siendo significativo con el agregado de 4C55C, 4C60C, 3F21C, 3F22C, 4C62C y la combinación de las dos cepas (Tabla 5.7). En los parámetros Kdr y Kdl no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Tabla 5.7. Parámetros de fermentación, sustrato paja de trigo

	Vfr (mL/g)	Kdr (h ⁻¹)	L (h)	Vfl (mL/g)	Kdl (h ⁻¹)	Vt (mL/g)
Control	32,70 ^{cd}	0,06	-4,10 ^a	50,71 ^a	0,012	83,41
3C20C	39,12 ^{bc}	0,09	-5,35 ^a	43,25 ^{ab}	0,015	82,44
4C50C	31,28 ^d	0,1	-4,86 ^a	40,49 ^{bc}	0,012	71,76
4C55C	32,90 ^{cd}	0,06	-6,72 ^{ab}	38,98 ^{bcd}	0,012	71,88
4C60C	32,87 ^{cd}	0,09	-5,32 ^a	38,92 ^{bcd}	0,013	71,79
3F21C	31,79 ^{cd}	0,07	-7,24 ^{ab}	36,05 ^{bcd}	0,012	67,84
3F22C	40,53 ^b	0,06	-11,53 ^{ab}	34,23 ^{bcd}	0,010	74,75
4C62C	48,42 ^a	0,03	-17,84 ^b	29,69 ^{cd}	0,007	78,11
4C50C+4C62C	45,31 ^{ab}	0,03	-17,53 ^b	30,89 ^{cd}	0,006	76,19
ESM*	2,32	0,03	2,16	1,84	0,002	2,94
P	0,0016	0,8451	0,0054	0,0002	0,1987	0,0429

Se muestran las medias de cada cepa para cada parámetro.*ESM, Error estándar de las medias (27 observaciones). Medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes, $p \leq 0,05$

Sustrato: celulosa microcristalina

El comportamiento de las diferentes cepas al ser incubados con celulosa microcristalina fue distinto que con paja de trigo. Para el caso de la cepa 4C62C el modelo matemático no se pudo aplicar y por tanto los datos no aparecen en la tabla 5.8. El tratamiento con la mezcla de cepas 4C50C+4C62C mostró el mayor volumen total (Vt) y el mayor volumen de gas de la fase lenta (Vfl) de degradación así como la menor tasa de degradación de la fase lenta. Con respecto al parámetro L se observó una disminución con respecto al control por parte de la combinación de cepas aunque esta diferencia no fue significativa. La adición de las cepas 4C60C y 3F21C disminuyó L significativamente ubicándose en valores de aproximadamente la mitad del valor calculado para el control.

Tabla 5.8. Parámetros de fermentación ruminal, sustrato celulosa microcristalina

	Vfr (mL/g)	Kdr (h ⁻¹)	L (h)	Vfl (mL/g)	Kdl (h ⁻¹)	Vt (mL/g)
Control	34,17 ^{ab}	1,48	16,49 ^a	27,85 ^b	0,020 ^a	62,03 ^b
3C20C	39,15 ^a	0,18	15,10 ^{ab}	34,76 ^b	0,022 ^a	37,45 ^b
4C50C	33,14 ^{ab}	0,11	13,37 ^{ab}	31,90 ^b	0,020 ^a	65,04 ^b
4C55C	30,28 ^{ab}	0,13	13,17 ^{ab}	25,16 ^b	0,017 ^a	55,43 ^b
4C60C	28,09 ^b	0,09	8,83 ^b	26,36 ^b	0,015 ^{ab}	54,45 ^b
3F21C	31,58 ^{ab}	0,07	9,94 ^b	26,83 ^b	0,011 ^{ab}	58,41 ^b
3F22C	32,02 ^{ab}	0,10	12,49 ^{ab}	29,36 ^b	0,011 ^{ab}	61,38 ^b
4C50C+4C62C	39,90 ^a	0,08	10,96 ^{ab}	75,80 ^a	0,003 ^b	115,70 ^a
ESM*	1,76	0,58	1,05	4,63	0,002	8,91
P	0,0211	0,0126	0,001	0,0002	0,0017	0,0098

Se muestran las medias de cada cepa para cada parámetro.*ESM, Error estándar de las medias (27 observaciones). Medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes, $p \leq 0,05$

Sustrato: xilano de avena

En la tabla 5.9 se muestran los resultados del análisis de los parámetros cinéticos cuando las cepas fueron inoculadas con xilano de avena. La cepa 4C62C mostró el mayor Vt siendo éste diferente al control. Esta cepa agrupó con respecto a este parámetro junto a la 3F21C, 3F22C y la combinación de cepas aunque estos tres últimos tratamientos no fueron diferentes al control. No se encontraron diferencias significativas al evaluar el volumen de gas producido en la fase lenta de la fermentación, con Vfr se encontraron diferencias al realizar el GLM ($p = 0,0291$) que no pudieron ser resueltas con la prueba de Tukey (Tabla. 5.9).

Tabla 5.9. Parámetros de fermentación ruminal, sustrato xilano de avena

	Vfr (mL/g)	Kdr(h ⁻¹)	L (h)	Vfl (mL/g)	Kdl (h ⁻¹)	Vt (mL/g)
Control	19,88	0,07 ^{bc}	3,63 ^a	67,68	0,011 ^{abc}	87,55 ^b
3C20C	20,75	0,15 ^{abc}	-0,11 ^a	70,44	0,012 ^{ab}	91,19 ^b
4C50C	22,67	0,18 ^{abc}	0,28 ^a	66,40	0,013 ^a	89,06 ^b
4C55C	21,58	0,24 ^a	0,731 ^a	69,58	0,012 ^{ab}	91,16 ^b
4C60C	22,76	0,28 ^a	-0,25 ^a	66,66	0,010 ^{abc}	89,42 ^b
3F21C	28,95	0,20 ^{ab}	-0,97 ^a	67,41	0,011 ^{abc}	96,36 ^{ab}
3F22C	28,00	0,08 ^{bc}	-6,67 ^b	71,68	0,008 ^{abc}	99,68 ^{ab}
4C62C	30,58	0,05 ^c	-9,10 ^b	84,12	0,007 ^c	114,70 ^a
4C50C+4C62C	29,84	0,05 ^c	-7,95 ^b	67,64	0,009 ^{bc}	97,48 ^{ab}
ESM*	2,34	0,03	1,06	5,00	0,001	3,80
P	0,0291	<0,0001	<0,0001	0,3606	0,0021	0,004

Se muestran las medias de cada cepa para cada parámetro.*ESM, Error estándar de las medias (27 observaciones). Medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes, $p \leq 0,05$

Cuando se evaluó la tasa de degradación de la fase rápida con xilano de avena se vieron diferencias en los tratamientos con las cepas 4C55C y 4C60C, en estos casos este parámetro fue significativamente mayor que el control. Por otro lado, el parámetro L fue menor en todos los tratamientos siendo significativamente distinta al control en los tratamientos con 3F22C, 4C62C y con la mezcla 4C50C+4C62C. (Tabla 5.9).

5.5.2 Cuantificación de AGV en los fermentadores

La concentración de AGV se analizó por HPLC a las 96 h de incubación (tiempo final) en el ensayo de fermentadores *in vitro*, también se registraron los valores de pH de los fermentadores.

Luego de analizadas las concentraciones de los AGV, el pH y la relación acético/propiónico (A/P) mediante el procedimiento GLM se observó que hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en todos los parámetros independientemente del sustrato (p del efecto cepa $\leq 0,05$) y que también hubo efecto del sustrato en todos los casos ($p \leq 0,05$); además para todos los parámetros analizados existió interacción cepa*sustrato ($p \leq 0,05$). Dada la interacción entre cepa y sustrato se desdobló esta interacción analizando el efecto cepa con cada uno de los sustratos.

Sustrato: paja de trigo

Las concentraciones de los tres AGV más importantes evaluados se presentan en la tabla 5.10 y la concentración de AGV totales se representa en la Fig. 5.6 . Con las cepas 4C20C, 4C50C y 3F21C se obtuvo una mayor concentración total de ácidos con respecto al control sin verse significativamente afectado el valor final de pH y la relación A/P (tabla 5.10, Fig. 5.6). La menor concentración final de AGV se obtuvo cuando se adicionó la cepa 4C55C. El pH más alto obtenido correspondió al tratamiento con la cepa 4C62C (tabla 5.10).

Tabla 5.10 Concentración de los tres principales AGV (mM), pH y relación acético/propiónico al tiempo final de los fermentadores incubados con paja de trigo como sustrato

	Acético	Butírico	Propiónico	pH	A/P
Control	41,2 ^{ab}	0,2 ^c	13,9 ^a	5,80 ^{ab}	2,97 ^{bc}
3C20C	44,1 ^a	16,6 ^a	15,1 ^a	5,83 ^{ab}	2,92 ^c
4C50C	44,3 ^a	16,2 ^a	15,0 ^a	5,49 ^{bc}	2,94 ^{bc}
4C55C	30,6 ^c	8,0 ^b	9,2 ^b	5,87 ^{ab}	3,33 ^{abc}
4C60C	32,6 ^{bc}	11,9 ^{ab}	9,6 ^b	5,88 ^{ab}	3,40 ^{ab}
3F21C	43,9 ^a	16,9 ^a	14,7 ^a	5,82 ^{ab}	2,98 ^{bc}
3F22C	41,8 ^{ab}	13,3 ^{ab}	12,0 ^{ab}	5,88 ^{ab}	3,49 ^a
4C62C	35,9 ^{abc}	11,6 ^{ab}	12,1 ^{ab}	5,92 ^a	2,99 ^{bc}
4C50C+4C62C	35,5 ^{abc}	11,3 ^{ab}	12,0 ^{ab}	5,37 ^c	2,95 ^{bc}
ESM*	1,87	1,12	0,61	0,08	0,09
P	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,0009	0,0011

Se muestran las medias de la concentración de ácidos, pH y A/P de cada cepa.*ESM, Error estándar de las medias (27 observaciones). Medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes, $p \leq 0,05$

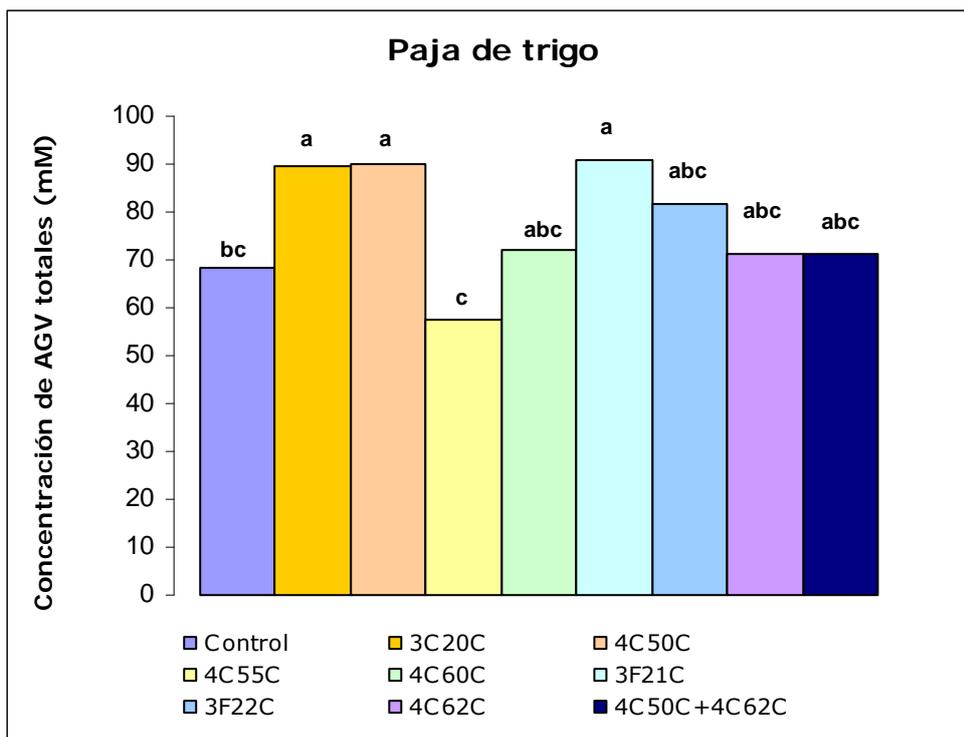


Fig. 5.6. Medias de las concentraciones totales de AGV. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$). ESM: 3,83 mM basado en 27 observaciones.

Considerando las concentraciones de ácido acético con el sustrato paja de trigo la adición de la cepa 4C55C indujo una disminución significativa con respecto al control ($p = 0,03239$, Tabla 5.10). Si bien no hubo diferencias con respecto al control las cepas 3C20C, 4C50C, 3F21C y 3F22C presentaron las concentraciones más altas de este ácido y fueron significativamente diferentes a las de las cepas 4C55C y 4C60C. Todas las cepas influyeron en la concentración final de ácido butírico que fue diferente al control en todos los casos (Tabla 5.10). Por último, la adición de 4C55C y de 4C60C produjo una disminución significativa de la concentración de ácido propiónico.

Sustrato: celulosa microcristalina

En la Tabla 5.11 se muestran los promedios de las concentraciones de los ácidos acético, propiónico y butírico obtenidos cuando se incubaron las diferentes cepas con celulosa microcristalina como sustrato. La concentración total de ácidos fue

significativamente mayor con la adición de las cepas 3C20C, 4C50C, 3F22C y la combinación 4C50C+4C62C (Fig. 5.7). Salvo en este último caso, el agregado del inóculo bacteriano influyó en la disminución del pH final (Tabla 5.11)

La adición de la cepa 4C55C mostró los valores más bajos de ácido acético y propiónico. En cuanto a la relación acético/propiónico hubo diferencias significativas entre el control y las cepas 4C55C, 4C60C y 3F22C. El agregado de las primeras dos se asoció con un aumento en la relación mientras que el suplemento con la cepa 3F22C indujo una disminución con respecto al control.

Tabla 5.11 Concentración de los tres principales AGV (mM), pH y relación acético/propiónico al tiempo final de los fermentadores incubados con celulosa microcristalina como sustrato

	Acético	Butírico	Propiónico	pH	A/P
Control	38,33 ^a	0,09 ^d	8,78 ^b	5,80 ^a	4,37 ^b
3C20C	36,49 ^{ab}	22,54 ^{ab}	8,35 ^{bc}	5,49 ^b	4,37 ^b
4C50C	39,78 ^a	25,01 ^a	9,29 ^b	5,49 ^b	4,28 ^b
4C55C	27,41 ^b	16,61 ^c	5,50 ^d	5,50 ^b	5,00 ^a
4C60C	31,49 ^{ab}	18,79 ^{bc}	6,41 ^{cd}	5,51 ^b	4,93 ^a
3F21C	39,52 ^a	24,82 ^a	9,45 ^b	5,50 ^b	4,18 ^b
3F22C	34,54 ^{ab}	17,30 ^c	12,3 ^a	5,51 ^b	2,81 ^c
4C62C	31,73 ^{ab}	16,23 ^c	7,71 ^{bcd}	5,52 ^b	4,13 ^b
4C50C+4C62C	37,49 ^a	19,89 ^{bc}	9,20 ^b	5,78 ^a	4,08 ^b
ESM*	1,84	0,99	0,45	0,05	0,09
P	0,0016	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001

Se muestran las medias de la concentración de ácidos, pH y A/P de cada cepa.*ESM, Error estándar de las medias (27 observaciones). Medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes, $p \leq 0,05$

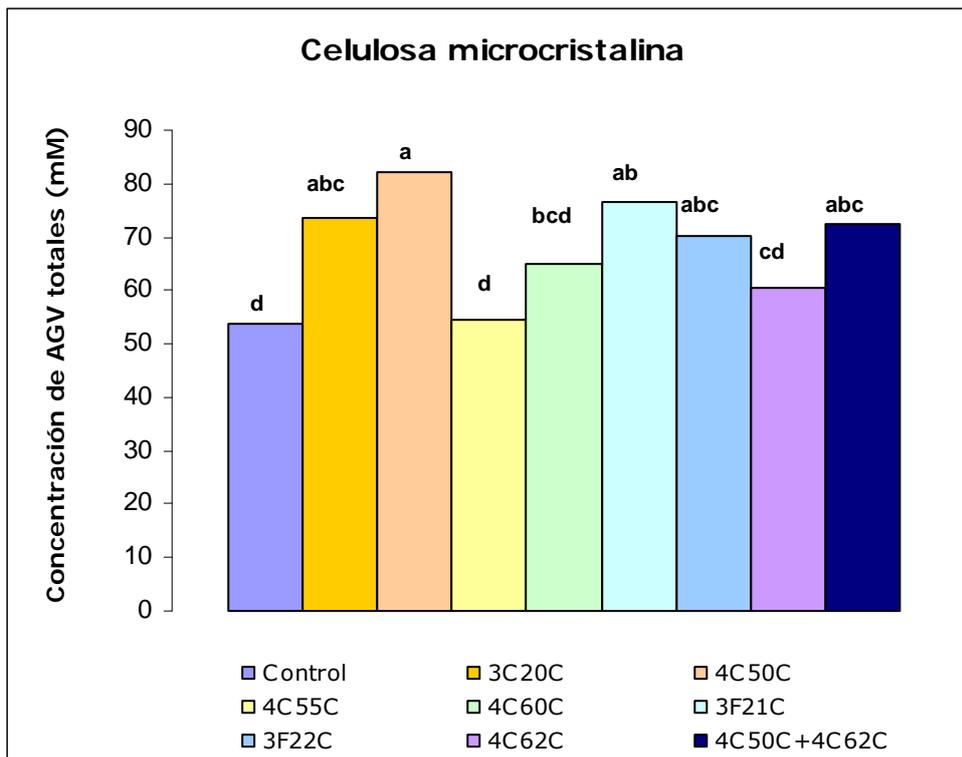


Fig. 5.7. Medias de las concentraciones totales de AGV. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes sí ($p < 0.05$). ESM: 3.04 mM basado en 27 observaciones.

Sustrato: xilano de avena

En los frascos que fueron incubados con xilano de avena no se encontraron diferencias significativas con respecto al control al analizar la concentración total de ácidos (Fig. 5.8) pero si se vio que en todos los casos el pH fue significativamente menor (Tabla 5.12). La cepa 4C55C mostró los valores más bajos de concentración de ácido acético y fue la única que fue diferente al control considerando este ácido (Tabla 5.12). Todas las cepas excepto 4C50C y 4C55C mostraron valores superiores con respecto al control de ácido butírico (Tabla 5.12).

Tabla 5.12. Concentración de los tres principales AGV (mM), pH y relación acético/propiónico al tiempo final de los fermentadores incubados con xilano de avena como sustrato

	Acético	Butírico	Propiónico	pH	A/P
Control	47,03 ^a	0,67 ^c	11,84 ^a	5,80 ^a	3,98 ^b
3C20C	46,64 ^a	29,43 ^a	11,37 ^{ab}	5,49 ^b	4,12 ^b
4C50C	32,43 ^{ab}	11,52 ^{bc}	6,22 ^{bc}	5,49 ^b	5,21 ^a
4C55C	22,11 ^b	13,75 ^{bc}	4,91 ^c	5,14 ^d	4,68 ^{ab}
4C60C	48,15 ^a	30,40 ^a	11,22 ^{ab}	5,14 ^d	4,30 ^b
3F21C	49,64 ^a	31,02 ^a	11,55 ^{ab}	5,18 ^{cd}	4,31 ^b
3F22C	44,34 ^{ab}	22,57 ^{ab}	10,64 ^{ab}	5,14 ^d	4,16 ^b
4C62C	42,74 ^{ab}	22,28 ^{ab}	10,12 ^{abc}	5,16 ^d	4,20 ^b
4C50C+4C62C	41,08 ^{ab}	23,81 ^{ab}	10,42 ^{ab}	5,40 ^{bc}	3,96 ^b
ESM*	4,45	3,04	1,05	0,04	0,15
P	0,0096	<0,0001	0,0022	<0,0001	0,0015

Se muestran las medias de la concentración de ácidos, pH y A/P de cada cepa.*ESM, Error estándar de las medias (27 observaciones). Medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes, $p \leq 0,05$

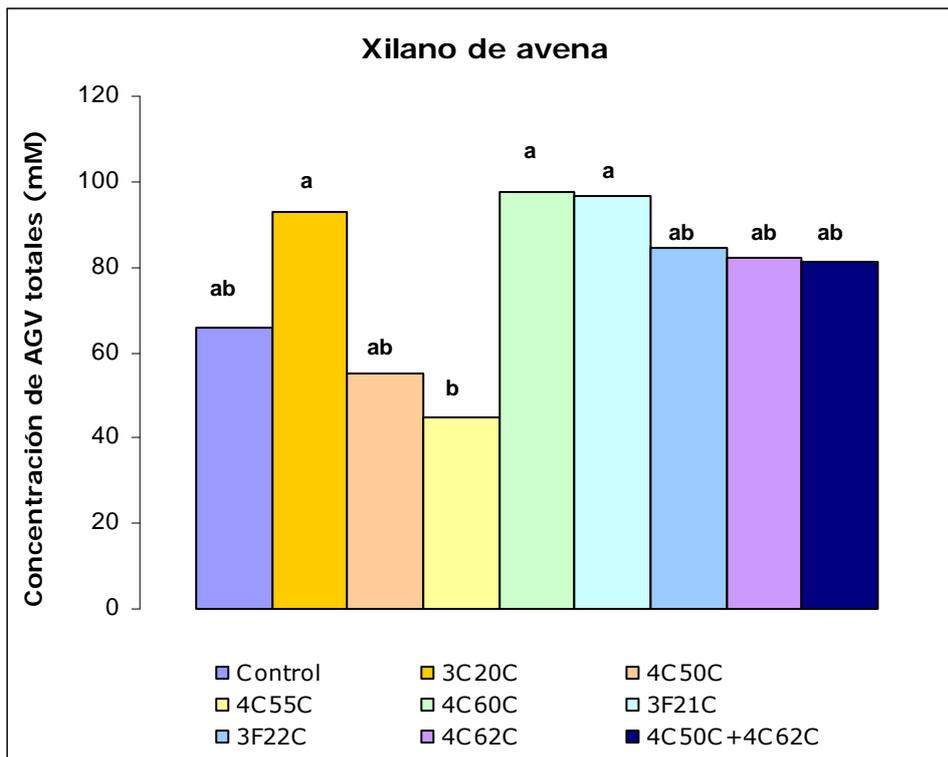


Fig. 5.8. Medias de las concentraciones totales de AGV. Las barras con diferentes letras son significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$). ESM.: 8.97 mM, basado en 27 observaciones.

6. DISCUSIÓN

La microbiota ruminal juega un papel fundamental en la fisiología de los rumiantes. En su conjunto provee de fuentes de energía que condicionan el metabolismo ruminal y proporciona a los rumiantes la fuente más importante de proteína de buena calidad. En condiciones de pastoreo normales la biomasa bacteriana constituye la única fuente de proteína para el rumiante. Entender su complejidad, conocer sus componentes y caracterizarlos es un paso fundamental para poder optimizar los sistemas productivos. En este trabajo se describió la microbiota ruminal de bovinos a pastoreo por métodos basados en el cultivo y se detectaron y cuantificaron organismos seleccionados en base a la técnica de FISH. Con el objetivo de diseñar estrategias dirigidas a modular la fermentación ruminal se aislaron componentes de esta biota y se analizó el comportamiento de algunas cepas bacterianas potencialmente fibrolíticas sobre el resto de la microbiota ruminal en ensayos *in vitro*.

6.1 Análisis de la microbiota ruminal

La biología molecular rompió con la barrera del cultivo y permitió descubrir la existencia de microorganismos previamente desconocidos. Actualmente existe una tendencia a estudiar los sistemas microbianos con abordajes casi exclusivamente moleculares y la microbiota ruminal no escapa a ella. En las bases de datos públicas existe un gran número de secuencias del ADNr 16S de microorganismos ruminales. La mayoría de estas secuencias son homólogas a aquellas correspondientes a bacterias que no han sido cultivadas y que han sido generadas a partir de abordajes moleculares que estudiaron la ecología microbiana ruminal. En consecuencia, al tratar de identificar bacterias por medio de la comparación de secuencias es muy probable enfrentarse a la clasificación "no cultivado". Últimamente, la comunidad científica recomienda hacer esfuerzos para caracterizar las bacterias a través del cultivo de modo de potenciar el conocimiento de la diversidad funcional de las poblaciones bacterianas ruminales (Firkins y Yu, 2006).

6.1.1 Microbiota bacteriana cultivable

Bacterias totales

En este trabajo se pusieron a punto técnicas que permitieron analizar la biota bacteriana ruminal en bovinos a pastoreo en nuestro medio. En el marco de estos estudios se aplicó con éxito la elaboración de medios de cultivo y soluciones en condiciones de anaerobiosis lo que se vio reflejado en el aislamiento de bacterias ruminales anaerobias estrictas (Tabla 5.4).

Los recuentos de bacterias totales tanto en las muestras F (Fluido ruminal) como C (Contenido ruminal) se encuentran en el rango de los esperado y son coherentes con estudios realizados con anterioridad que ubican los recuentos de bacterias ruminales anaerobias en el entorno de 10^9 a 10^{11} UFC por gramo de contenido o mililitro de fluido ruminal (Dehority y Tirabasso, 1989, Guo et al., 2010).

La microbiota bacteriana capaz de crecer en condiciones de aerobiosis en un medio de cultivo rico (microorganismos aerobios o anaerobios facultativos) representó entre el 0,9 y el 2% de la microbiota al compararla con el total bacteriano registrado en condiciones de cultivo anaerobias. Esta relación está en concordancia con reportes anteriores que señalan la pequeña población de microorganismos aerobios en el rumen (Hespell, 1987).

Bacterias fibrolíticas

Con respecto a la biota potencialmente fibrolítica recuperada en el medio MB-C (con celulosa como principal fuente de carbono y energía) se pudo observar que representó el 10% del total de microorganismos anaerobios que pudieron crecer en el medio de crecimiento general (MB). Los recuentos obtenidos se encuentran en el rango de lo esperado. En estudios previos en que se utilizaron métodos de extracción y manipulación de las muestras similares a las de este trabajo, los resultados de la cuantificación de la microbiota fibrolítica por diferentes métodos

de cultivo se ubicaron en el entorno de 10^8 a 10^9 UFC/g de contenido ruminal (Leedle y Butine, 1987, Krause et al., 1999).

Cabe señalar que cuando se realizó la identificación de 21 aislamientos recuperados del medio MB-C, seis de ellos no presentaron afiliación con bacterias potencialmente fibrolíticas como *S. ruminantium*, *S. dextrinosolvens* o *Streptococcus* spp. por lo que la población fibrolítica se pudo ver sobrestimada. Tanto la sobrestimación como la subestimación de poblaciones bacterianas cultivadas son condiciones inherentes a la selectividad del medio de cultivo y condiciones escogidas y ya se ha evidenciado en estudios que combinaron métodos moleculares con métodos dependientes del cultivo en otros ecosistemas (Al-Ahmad et al., 2007, Kämpfer et al., 1996). Se pone de manifiesto aquí que el medio utilizado si bien selecciona bacterias potencialmente fibrolíticas también soporta el crecimiento, en menor escala de bacterias que no lo son.

Bacterias consumidoras de lactato

La acidosis bovina es un problema a nivel mundial en sistemas de producción y cría de ganado, es una patología asociada a la dieta y se caracteriza por disminuciones en el pH ruminal, acumulación de ácido láctico y un predominio de *S. bovis* en el rumen. Esta patología constituye uno de las enfermedades más importantes del rodeo lechero de nuestro país. Se propone que una microbiota saludable para el rumiante debería tener microorganismos capaces de consumir el ácido láctico generado entre sus constituyentes disminuyendo así su concentración y por tanto los efectos perjudiciales sobre el animal. En este trabajo se cuantificó la biota bacteriana potencialmente consumidora de lactato por medios de cultivos y además se evaluó por FISH la presencia de *S. ruminantium*, *M. eldesnii* y *Propionibacterium* spp., especies que cumplen este rol en el ambiente ruminal (Meissner et al., 2010).

Con respecto a las cantidades totales de microorganismos cultivables los recuentos observados en este trabajo son similares a los de los autores que describieron el medio de cultivo utilizado (Mackie y Heath, 1979), en ovinos, bajo tres dietas distintas contabilizaron entre 0,6 y 1×10^8 UFC/g de ingesta. Hay que tener en cuenta que en el caso de los recuentos en ovinos existe una

subestimación en los recuentos bacterianos por la dificultad de obtener muestras representativas dado el tamaño de la cánula ruminal (Firkins y Yu, 2006).

6.1.2 Análisis de grupos escogidos de la microbiota ruminal por microscopía: FISH

Microbiota total

Al realizar el recuento en diferentes medios fue posible cuantificar la microbiota bacteriana ruminal cultivable y realizar los posteriores aislamientos. Sin embargo, se calcula que sólo es posible cultivar entre menos del 0,1 al 10% de las bacterias presentes en diversos ecosistemas (Donachie et al., 2007). En el caso de la fracción cultivable de las bacterias ruminales, este valor se encontraría entre el 10 y el 50% (Kobayashi, 2006). Los recuentos de microorganismos totales contabilizados por microscopía de fluorescencia (correspondientes a tinciones realizadas con DAPI) para las muestras C y F fueron de $3,3 \times 10^{10}$ células/g y $1,47 \times 10^{10}$ células/mL respectivamente.

El DAPI es un compuesto fluorescente que se une fuertemente al ADN y es utilizado para marcar células tanto vivas como fijadas. En consecuencia, los recuentos con DAPI representan al total de microorganismos incluyendo bacterias, arqueas y los eucariotas (hongos, levaduras y protozoarios). Se estima que la metodología empleada para la fijación e hibridación de las células bacterianas tiene aparejado un error en el conteo menor al 5%. Además, se calcula que se cuentan en los filtros una vez hibridados entre el 80 y 90% de las células presentes inicialmente en la muestras naturales (Pernthaler et al., 2003b). Por lo anterior, es posible que se subestimen las poblaciones microbianas totales al utilizar esta metodología pero no se verían afectadas las proporciones de cada microorganismo.

Si se tienen en cuenta los dos abordajes para cuantificar la microbiota bacteriana total utilizados en este trabajo se puede observar que la biota cultivable representó aproximadamente el 10% del total de los microorganismos contabilizados por microscopía de fluorescencia. Con respecto a los números

totales de microorganismos obtenidos mediante la tinción con DAPI los valores de este trabajo concuerdan con descripciones anteriores de la microbiota ruminal en ovejas en las que se reportaron 1.6×10^{10} células/g de digesta (Krause et al., 1999).

Microbiota bacteriana

Las células bacterianas que efectivamente hibridaron con las sondas dirigidas al Dominio *Bacteria* representaron entre el 54,6 y el 61,1% de todas las células marcadas con DAPI. Sharp et al. (1998) describieron que el ARNr bacteriano representaba el 57,7% del total del ARNr (la suma de los Dominios *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*) obtenidos del fluido ruminal mientras que Krause et al. (2000) obtuvieron entre un 60 y 70% de proporción de bacterias con metodologías similares. La representación bacteriana en este trabajo, contabilizado por un método diferente, también es acorde a estos resultados previos.

Bacterias fibrolíticas

Diversos estudios se han focalizado en estudiar la microbiota fibrolítica y detectar especies predominantes que cumplen esa función. Partiendo de un conjunto de trabajos previos, en general está aceptado el importante papel de las especies *R. albus*, *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* en la fibrólisis ruminal (Firkins y Yu, 2006). En este trabajo no se planteó la cuantificación ni detección de *F. succinogenes* pero utilizando sondas fluorescentes dirigidas a *R. albus* y *R. flavefaciens* fue posible detectar y cuantificar representantes de estas especies en las muestras C y *R. albus* en las muestras F (Tablas 5.2 y 5.3). Se pudo observar la íntima relación de estas especies con las partículas de alimento (Fig. 5.1) y quizá por este motivo no fue posible detectar a *R. flavefaciens* en las muestras F (con menor proporción de partículas). Diferentes estudios coinciden en que las proporciones de estos microorganismos en el rumen de ovinos y bovinos se encuentran en el entorno del 1 al 2% de la microbiota bacteriana

(Uyeno et al., 2007, Krause et al., 1999) como también se pudo verificar en este trabajo.

Bacterias consumidoras de ácido láctico

Selenomonas ruminantium, *Megasphaera elsdenii* y especies del género *Propionibacterium* son importantes consumidoras de ácido láctico en el rumen (Meissner et al., 2010). *M. elsdenii* puede llegar a consumir entre el 60 y 95% de todo el ácido láctico disponible en el órgano (Counotte et al., 1981). Según dos técnicas independientes del cultivo, *S. ruminantium* está presente en el rumen en una proporción de entre el 1 y 2% de las bacterias ruminales (Uyeno et al., 2007). Los resultados al realizar la técnica de FISH para los organismos consumidores de lactato en las condiciones de este trabajo estuvieron en proporciones del 1,5% o menores con números absolutos entre $1,6 \times 10^7$ y $1,9 \times 10^8$ células/ml o células/g. *Propionibacterium* spp. fue el grupo que mostró menor cantidad de células hibridadas. Por otra parte, no se detectó la presencia de *S. bovis* en las muestras C y F, el animal utilizado para realizar las muestras se mantuvo en condiciones de pastoreo por lo que en principio no se esperaba encontrar una alta cantidad de bacterias de esta especie en el rumen.

Los resultados obtenidos a partir de la composición de la microbiota ruminal de bovinos a pastoreo con los abordajes realizados en este trabajo están en general de acuerdo a lo observado por otros grupos de investigación. Esto pone de manifiesto la estabilidad de la microbiota ruminal en cuanto a sus componentes generales y refuerza la validez de los abordajes realizados. La caracterización de la microbiota cultivable abre las puertas a la selección de microorganismos que pueden resultar atractivos con la finalidad de su utilización como probióticos nativos.

6.2 Aislamiento e identificación de microorganismos ruminales

Se conformó una colección de 46 aislamientos a partir del medio MB-C. Esta estrategia fue seguida con el fin de seleccionar bacterias con potencial fibrolítico y en particular celulolítico dado que el medio contenía celulosa microcristalina

como principal fuente de carbono y energía. Para todos los aislamientos se estudió la actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y frente a *S. bovis*.

Al comparar las secuencias obtenidas de la colección de aislamientos con las bases de datos de la NCBI y del RDP se pudo observar que todos los aislamientos se relacionaban filogenéticamente con microorganismos del rumen y la mayoría de estos estaban relacionadas con la función fibrolítica ruminal (Tabla 5.4).

Los organismos relacionados con *Butyrivibrio* ("Butyrivibrio-like organisms") pueden llegar a representar entre el 24 al 30% de las bacterias cultivables del rumen (Forster et al., 1996) y pueden ser entonces candidatos para estudios genéticos y de manipulación de las bacterias ruminales (Schoep y Gregg, 2007). En este trabajo se identificaron 9 aislamientos de estos microorganismos, entre ellos representantes de las especies *B. fibrisolvens*, *P. ruminis*, y *Butyrivibrio hungateii*. Estos organismos son importantes miembros del rumen dada su función fibrolítica, y las cantidades que pueden alcanzar en el ambiente ruminal. La denominación de organismos relacionados a *Butyrivibrio* es debido a que muchos aislamientos ruminales productores de ácido butírico son clasificados en base a consideraciones fenotípicas y metabólicas como *B. fibrisolvens* sin tener en cuenta su relación filogenética (Kopečný et al., 2003). En 1996 y en base a consideraciones genotípicas se describió por primera vez el género *Pseudobutyrvibrio* y la especie *P. ruminis* ya que si bien los aislamientos compartían muchas características con *Butyrivibrio* eran lo suficientemente alejados desde el punto de vista filogenético para ser considerados en otro género (van Gylswyk et al., 1996).

A los efectos de la elección de cepas para los ensayos *in vitro* se consideró la definición de organismos similares a *Butyrivibrio*. Según esto, los denominados organismos similares a *Butyrivibrio*, como *P. ruminis*, son anaerobios estrictos, fermentan xilano y producen ácido butírico como principal producto final de la fermentación (Shoep, 2004). Estos organismos han sido descritos como integrantes de los llamados consorcios fibrolíticos del rumen y establecen relaciones simbióticas entre ellos. En estos consorcios no solamente hay miembros fibrolíticos sino que también hay bacterias que ayudan a acelerar los procesos de digestión de la fibra sin atacarla directamente. En un estudio reciente se describieron consorcios naturales y artificiales que se formaban junto

a *F. succinogenes* que incluían a algunas de las bacterias aisladas en este trabajo como *P. ruminis*, *B. fibrisolvens* y *Prevotella* spp (Shinkai et al., 2010).

Un aislamiento tuvo un 99% de homología con secuencias publicadas en las bases de datos de *Eubacterium cellulosolvens*. Este microorganismo fue originariamente aislado del rumen ovino y presenta características fibrolíticas (van Gylswyk y van der Toorn, 1986). La cepa aislada en este trabajo presentó características de crecimiento lento y en ocasiones no fue posible su recuperación en las condiciones de trabajo por lo que no se utilizó en los ensayos *in vitro* posteriores.

Succinivibrio dextrinosolvens es una bacteria ruminal descrita en el ganado ovino y bovino. Es Gram negativa, y funcionalmente desempeña el rol de digerir el almidón y filogenéticamente pertenece a la subdivisión γ de las proteobacterias (Hippe et al., 1999). En este trabajo se identificó un aislamiento de esta especie.

La microbiota ruminal dista mucho de ser descrita en su totalidad y conforme se sigue estudiando se describen nuevas especies anteriormente clasificadas como "no cultivadas" o "no cultivables". En este trabajo tres aislamientos presentaron homología con secuencias depositadas en los bancos de datos como bacterias aun no cultivadas. Las secuencias de los aislamientos 3F21C y 3F22C son idénticas entre sí y se clasificaron en la familia *Lachnospiraceae* del Orden *Clostridiales* (Clase *Clostridia* del *Phylum Firmicutes*). El aislamiento 4C70C presenta una secuencia nucleotídica diferente a la de estos dos aislamientos y también se agrupa con miembros de la familia *Lachnospiraceae*. En esta familia de microorganismos se encuentran géneros de microorganismos importantes en la biota ruminal los cuales ya han sido mencionados como *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*.

La mayor parte de los aislamientos al ser identificados por la secuenciación del gen ADNr 16S presentó homología con especies, géneros o familias que están relacionados con la función fibrolítica ruminal, bien por ser especies fibrolíticas o por formar parte de los consorcios microbianos fibrolíticos. Esto justificaría el abordaje utilizado y constituye la base para el desarrollo de estrategias de aislamiento y selección de bacterias ruminales.

6.3 Actividad antimicrobiana de los aislamientos ruminales

Durante décadas se han utilizado antibióticos para modular la microbiota ruminal con el fin de evitar pérdidas por conceptos de producción de metano y amonio y para evitar el crecimiento exacerbado de *S. bovis* dada su relación con la acidosis bovina. Sin embargo existe un creciente interés y demanda por disminuir el uso de antibióticos en la práctica ganadera (Russell y Rychlik, 2001). La presencia de efecto antimicrobiano en un probiótico para ser utilizado en la esfera ruminal es atractiva y se puede constituir en un atributo interesante (Callaway et al., 2004). Eventualmente podría ayudar a sustituir o disminuir el uso de antimicrobianos en la dieta de los animales. Se analizó el efecto antimicrobiano de todos los aislamientos utilizando la técnica de "spot in the lawn" modificada para poder realizarla en condiciones de anaerobiosis.

Algunos aislamientos que fueron identificados como pertenecientes a la misma especie presentaron perfiles de inhibición diferentes. Esto refuerza el hecho que los atributos deseables desde el punto de vista de los probióticos son cepa específicos. Este hecho ha sido registrado ya en la esfera ruminal para especies del género *Butyrivibrio* (Kalmokoff y Theather, 1997) para las cuales se ha visto que la actividad antimicrobiana está explicada por la producción de bacteriocinas. En el caso de este trabajo, diferentes aislamientos que fueron afiliados con *P. ruminis* presentaron diferentes patrones de inhibición.

6.4 Modulación de la fermentación ruminal

Con el fin de evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas para modular la fermentación ruminal se realizó un ensayo en fermentadores *in vitro* con tres sustratos. La paja de trigo fue utilizada para evaluar el desempeño de los potenciales probióticos en modular la microbiota ruminal frente a un sustrato de difícil degradación y que podría constituir un potencial alimento de animales en condiciones productivas. Si bien se conoce su composición química en términos de MS, MO, FND, FAD, PB y LAD, este es un sustrato complejo y no es posible

conocer todas sus cualidades y características como ser los enlaces entre la hemicelulosa y la celulosa de difícil degradación. Por esto también se analizó el desempeño de los probióticos con sustratos puros, más sencillos en estructura y composición. Se utilizaron xilano de avena y celulosa microcristalina como sustratos puros para evaluar la fermentación y la posible modulación de los probióticos.

Todas las cepas mostraron diferencias en los parámetros analizados (parámetros del modelo de fermentación, AGV y pH) por lo que se puede concluir que la adición de las cepas potencialmente probióticas y en las cantidades utilizadas tuvo efecto sobre la fermentación *in vitro*. Para todos los parámetros analizados y con todas las cepas se registró interacción cepa*sustrato. Esto quiere decir que el comportamiento de las cepas fue diferente dependiendo del sustrato utilizado. Esto último se ve reflejado en los gráficos de volumen acumulado en función del tiempo (Fig. 5.3, 5.4, 5.5) para cada sustrato ya que se puede observar que las características de las curvas son diferentes y además los parámetros cinéticos para cada sustrato fueron distintos. La importancia de lo anterior se verá realizada a la hora de diseñar estrategias de modulación con probióticos. *A priori*, el efecto en el animal también podría estar influido por el alimento o sustrato empleado y dependiendo de las propiedades deseadas se deberán diseñar estrategias de adición que puedan incluso involucrar mezclas de cepas. Por esto se analizaron los diferentes efectos de las cepas para cada sustrato por separado.

Se pudo observar que el parámetro L (fase lag) presentó valores negativos para los sustratos paja de trigo y xilano de avena aunque no así para la celulosa microcristalina. Esto surge del modelo matemático de Schofield et al. (1994) al cual los datos se ajustaron. De todos modos, este modelo bicompartimental es muy utilizado en la evaluaciones de la producción de gas *in vitro* (Tang et al., 2008, Huhtanen et al., 2008). Un modelo alternativo y también utilizado en situaciones similares es el planteado por Krishnamoorthy et al. (1991) que describe la cinética de fermentación con tres parámetros, L, una tasa de conversión y un volumen total. Los datos de volumen acumulado y tiempo de este trabajo se intentaron ajustar a este modelo pero los coeficientes de regresión indicaban que el mismo no era aplicable.

6.4.1 Sustrato: paja de trigo

Los comportamientos de los tratamientos fueron muy diversos en cuanto a los valores de los parámetros de fermentación y en cuanto a la composición en AGV a tiempo final. Cuando se empleó paja de trigo como sustrato el agregado de las cepas marcó una tendencia a disminuir el volumen de gas total y a aumentar la concentración total de AGV. Si se observa el tratamiento control, sin agregado de cepa, se puede observar que presenta un V_{fr} de los más bajos, el mayor de los V_{fl} y la más baja concentración de AGV. Esto permite suponer que el agregado de las cepas produjo que la fermentación fuera dirigida a la producción de AGV en detrimento de la producción de gases de desecho como metano, dióxido de carbono o hidrógeno. Posiblemente la adición de los potenciales probióticos induce la retención de hidrógeno metabólico, fijándolos en los AGV y haciendo más eficiente la fermentación. La liberación de hidrógeno al medio o su transferencia al metano es una de las formas de pérdida de energía de los rumiantes ya que estos gases se pierden en la eructación. Se estima que las pérdidas de energía por emisión de metano oscila entre el 3 y 15% de la energía ingerida (van Never y Demeyer, 1988 en Calsamiglia et al., 2005). Un sistema óptimo retiene la energía en los AGV; se considera que la eficiencia de retención de energía es máxima para el ácido propiónico, intermedia para el butírico y mínima para el acético (Calsamiglia et al., 2005). Este hecho es de consideración si se piensa que una de las mayores pérdidas de eficiencia en los sistemas productivos está en la producción de gases. Lamentablemente no se cuenta con datos de composición de la fase gaseosa de los fermentadores lo que permitiría corroborar este supuesto.

Todas las cepas produjeron un aumento significativo de ácido butírico al compararlas con el control en el que la concentración de este ácido se ubicó en niveles por debajo de 1mM. Esto explicaría en parte la disminución en la producción de gas, el aumento en la concentración total de AGV y reforzaría la hipótesis que el agregado de las cepas influiría en una mejor retención de la energía metabólica. Con la cepa 3F21C se registró la mayor cantidad de ácido butírico mientras que las concentraciones de los ácidos acético y propiónico fueron iguales al control (se mantuvo relación A/P). Esto refuerza el hecho que el agregado de las cepas dirigió la fermentación hacia los AGV y no hacia la producción de gas y específicamente hacia la producción de ácido butírico.

Como se indicó anteriormente el ácido butírico juega un rol importante en el rumen; es el ácido que tiene más valor energético molar de los tres AGV más importantes en la fisiología ruminal (Maynard et al., 1979). Existe una importante correlación entre este ácido el consumo de materia seca y la producción de leche (Seymour et al., 2005). El hecho que la adición de las cepas potencialmente probióticas aumente este ácido es de sumo interés para el diseño de estrategias de modulación de la fermentación ruminal con el objetivo de aumentar la producción en el ganado bovino.

6.4.2 Sustrato: celulosa microcristalina

Con celulosa microcristalina el comportamiento de las cepas fue distinto que con la paja de trigo y con xilano de avena. Al ajustar al modelo de Schofield et al. (1994) los valores para L para este sustrato no fueron negativos. Los diferentes tratamientos mostraron o bien una tendencia a disminuir L o lo disminuyó significativamente. Los valores de L inferiores fueron registrados con las cepas 4C60C y 3F21C que mostraron valores de aproximadamente el 50% de reducción con respecto al control. El resto de los tratamientos también se ubicó en valores menores que el control considerando este parámetro pero estas diferencias no fueron significativas. El parámetro L describe la fase lag de la fermentación y se relaciona con la capacidad de colonizar los sustratos y dar comienzo a la fermentación por lo que una disminución con respecto al control es un valor positivo para el diseño de probióticos. Esto implica que la adición de estas cepas induce un comienzo de la fermentación más rápido.

La cepa *P. ruminis* 4C50C, que mostró halo de digestión de celulosa cuando fue aislada, junto con la cepa incluida en la familia *Lachnospireceae* 3F21C presentaron las mayores concentraciones de AGV al final del experimento y los niveles más altos de ácido butírico sin variar la relación A/P. En conjunto, la adición de las cepas con este sustrato parecería también como en el caso de la paja de trigo desviar la fermentación hacia la producción de AGV en vez de hacia la producción de gases optimizando así el aprovechamiento de la energía del sustrato.

La mezcla 4C50C y 4C62C mostró un volumen total que casi duplica a la del control, presentó los valores más altos de V_{fr} y V_{fl} y las concentraciones de los diferentes ácidos fue mayor en este caso que para el control.

6.4.2 Sustrato: xilano de avena

Con xilano de avena no se encontraron diferencias significativas al considerar el volumen de las fases rápido y lento de la fermentación en forma individual pero si hubo diferencias al considerar el volumen total. La cepa 4C62C mostró el volumen total mayor pero no así la concentración de AGV totales. A diferencia del comportamiento con los otros dos sustratos en que el volumen de gas producido fue menor que el del control, con xilano de avena la adición de las cepas mostró o bien una tendencia a aumentar o similar al control. A diferencia del comportamiento general con paja de trigo y celulosa microcristalina como sustrato (que se registraba un menor volumen total y aumento de la concentración de AGV) el aumento del volumen de gas total con este sustrato también estuvo acompañado de un aumento en la concentración final de AGV. Con xilano de avena también se vio que el aumento en el total de ácidos con respecto al control puede ser explicado por un aumento en la concentración de ácido butírico. Las relaciones A/P fueron más diversas con este sustrato con valores altos como el inducido por la cepa 4C50C que alcanzó una relación de 5,21 explicable por la disminución en la concentración de ácido propiónico, el volumen total de esta cepa se ubicó entre los más altos.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se cuantificó la microbiota ruminal de bovinos a pastoreo y se realizaron aislamientos de bacterias con potencial fibrolítico con el fin de evaluar su potencial para modular la microbiota ruminal. Hasta la fecha de escritura de esta Tesis el autor no ha encontrado en la literatura publicaciones realizadas en nuestro país que aborden la caracterización de la microbiota ruminal de animales en pastoreo. Este trabajo representaría la primera aproximación a la caracterización de la microbiota ruminal de animales del rodeo uruguayo en base a técnicas dependientes e independientes de cultivo.

Los aspectos fundamentales a considerar como objetivos para modular la fermentación ruminal son aumentar la degradación tanto de la fibra, incrementar la producción de AGV, estimular la producción de propionato, inhibir la producción de metano y controlar la concentración de lactato y el pH ruminal.

En este trabajo se demostró la posibilidad de modular la microbiota ruminal *in vitro* por medio de la utilización de cepas nativas con potencial fibrolítico. Estas cepas en general estimularon la síntesis de AGV y particularmente la de ácido butírico. Las concentraciones de ácido láctico siempre se encontraron en valores inferiores a 1mM y si bien el pH alcanzó valores bajos esto fue registrado a las 96 h y en un sistema cerrado como los fermentadores. Resta evaluar cómo será el comportamiento de estas cepas en sistemas continuos *in vitro* e *in vivo*.

Si bien no se puede inferir la existencia de un mejor probiótico en esta colección de cepas sí es posible especular que la administración de estas cepas tendrá efectos benéficos *in vivo* como la producción de AGV en detrimento de la producción de gas haciendo al alimento más aprovechable energéticamente. Esta menor producción de gas podría tener un impacto muy importante si se comprueba que se disminuye la producción de metano que además de constituir una pérdida de energía para el sistema ganadero también es un problema ambiental ya que el metano es uno de los gases de efecto invernadero. En la actualidad se están desarrollando numerosos esfuerzos para disminuir este tipo de emisiones en el sector agropecuario.

La estimulación de la producción de ácido butírico tendría efectos muy beneficiosos para los animales y efectos positivos en la producción como ser una mayor producción de leche y un mayor consumo de materia seca. Si bien no se

podría a priori recomendar ni descartar ninguna de las cepas para su uso como probiótico, las cepas *P. ruminis* 3C20C y la cepa de la familia *Lachnospiraceae* 3F21C presentaron las concentraciones finales más elevadas de ácido butírico con los tres sustratos por lo que estas podrían ser candidatas a seguir estudios para dilucidar los mecanismos de desviación del metabolismo hacia la producción de este ácido y para probar sus efectos *in vivo*. La cepa 3F21C es una de las clasificadas como desconocidas por lo que exhibe además interés desde el punto de vista de la sistemática bacteriana.

Este trabajo abre puertas a nuevas líneas de investigación en el país basadas en la búsqueda y selección de potenciales probióticos para modular la fermentación ruminal. Los resultados son alentadores en base a las modificaciones de los patrones de fermentación ruminal logradas con el agregado de las cepas *in vitro*. Se justifica entonces continuar con este tipo de abordajes y el empleo de estas cepas y de otras en diseños experimentales *in vivo* que, en conjunto con actores del ámbito académico y productivo, podrá por un lado ayudar a comprender aún más las relaciones metabólicas ruminales y por otro propender a una mejora de las relaciones ambientales, económicas y productivas en la cría de ganado bovino.

8. AGRADECIMIENTOS

A Pablo Zunino y Cecilia Cajarville.

A Cristina Cabrera, Silvana Vero y Claudia Piccini por haber aceptado la tarea de corregir este trabajo.

Al Programa de Desarrollo Tecnológico que posibilitó la realización de parte de este trabajo.

Al Departamento de Microbiología del IIBCE.

Al Departamento de Nutrición y al de Bovinos de Facultad de Veterinaria.

A Karen, por ser la mejor compañera.

A Vanessa.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio.

A Mirtha y Heber que de algún modo despertaron en mí la curiosidad.

A la familia que construimos. A **Emilia** a **Fede**.

Gracias.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS. 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.

Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. 2007. The *in vivo* dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol* 56:681-687.

Alonso C. 2001. Biodegradación anaerobia de residuos sólidos de curtiembre. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay.

Altschul S, Madden T, Schäfer A, Zhang J, Miller W, Lipman D. 1997. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919-1925.

Baldwin VI RL, Jesse BW, 1996. Propionate modulation of ruminal ketogenesis. *J Anim Sci* 74:1694-1700.

Baldwin VI RL, McLeod KR. 2000. Effects of diet forage: concentrate ratio and metabolizable energy intake on isolated rumen epithelial cell metabolism *in vitro*. *J Anim Sci* 78:771-783.

Bayer EA, Lamed R, White BA, Flint HJ. 2008. From cellulosomes to cellulosomes. *Chem Rec* 8:364-377.

Bryant MP. 1959. Bacterial species of the rumen. *Bacteriol Rev* 23:125-159.

Callaway TR, Anderson RC, Edrington TS, Genovese KJ, Harvey RB, Poole TL, Nisbet DJ. 2004. Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. *Anim Health Res Rev* 5:35-47.

Calsamiglia S, Castillejos L, Busquet M. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno. Madrid, 7 y 8 de Noviembre de 2005. XXI CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA. http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/05CAP_VIII.pdf

Cheng RP, McCowan RP, Costerton JW. 1979 Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *Am J Clin Nutr* 32:139-148.

Chiquette J, Talbot G, Markwell F, Nili N, Forster RJ. 2007. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus flavefaciens* NJ along with a probiotic mixture in forage or concentrate-fed dairy cows: Effect on ruminal fermentation, cellulolytic populations and in sacco digestibility. *Can J Anim Sci* 87:237-249.

Chiquette J, Allison MJ, Rasmussen MA. 2008. *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *J Dairy Sci* 91:3536-43.

Cho SJ, Cho, KM, Shin EC, Lim WJ, Hong SY, Choi BR, Kang JM, Lee SM, Kim, YH, Kim H, Yun HD. 2006. 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *J Microbiol Biotechnol* 16:92-101.

Cone JW, van Gelder AH, Visscher GJW, Oudshoorn L. 1996 Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim Feed Sci Technol* 61:113-128.

Counotte GHM, Prins RA, Janssen RHAM, deBie MJA. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 42:649-655.

Cross ML. 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.

Czerwaski JW. 1986. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. En: L. P. Milligan, W. L. Grovum and A. Dobson (Ed.) *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. 158-172. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ

Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. 1999 The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22:434-444.

Davies Z, Mason D, Brooks AE, Griffith GW, Merry RJ, Theodorou MK. 2000. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Anim. Feed Sci Technol* 83:205-22.

DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Tricarico JM. 2005. Effects of dietary alpha-amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. *J Dairy Sci* 88:4405-13.

Dehority B, Grubb J. 1981. Bacterial population adherent to the epithelium on the roof of the sorsal rumen of the sheep. *Appl Environ Microbiol* 41:1424-1427.

Dehority BA, Tirabasso PA. 1989. Lyophilization of rumen fluid for use in culture media. *Appl Environ Microbiol* 55:3237-3239.

Dewhurst RJ, Davues DR, Merry RJ. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 85:1-21.

Donachie SP, Foster JS, Brown MV. 2007. Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME* 1:97–99.

FAO /WHO. 2001. Joint FAO /WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food; Córdoba, Argentina.

Firkins JL, Yu Z. 2006 Characterisation and quantification of the microbial populations in the rumen. En: Sejrsen K, Hvelplund, T, Nielsen, MO (Eds.) Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 19-54.

Fontes CMGA, Gilbert HJ. 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cellwall complex carbohydrates. *Annu Rev Biochem* 79:655–681.

Forsberg CW, Lam K. 1977. Use of the adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl Environ Microb* 33:528–537.

Forster RJ, Theater RM, Gong J, Deng SJ. 1996. 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol* 23:218-222.

Fraga M, Perelmuter K, Delucchi L, Cidade E, Zunino P. 2008. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.

Gong J, Forsberg CW. 1989. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* S85 and adherence defective mutants to cellulose. *Appl Environ Microbiol* 55:3039–3044.

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

Guo TJ, Wang JQ, Bu DP, Liu KL, Wang JP, Li D, Luan SY, Huo XK. 2010. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using real time PCR in steers treated with virginiamycin. *Czech J Anim Sci* 55:276–285.

Hespell RB. 1987. Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. *Proc Nutr Soc* 46:407-413.

Hippe H, Hagelstein A, Kramer I, Swiderski J, Stackebrandt E. 1999. Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propinivibrio dicarboxilicus*, *Anaerobiospirillum thomasi*, *Succinimonas amylolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvens* and proposal of *Succinivibrionaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:779-782.

Hoover WH, Miller TK. 1996. Contributions of microbial protein to amino acid supply. En: *Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Rochester, NY, USA:199-206.

Huhtanen P, Seppala A, Ots M, Ahvenjarvi S, Rinne M. 2008. *In vitro* gas production profiles to estimate extent and effective first-order rate of neutral detergent fiber digestion in the rumen. *J Anim Sci* 86:651-659.

Hungate RE. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* 14:1–49.

Hungate RE. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117-132. En J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 3B. Academic Press Inc., New York.

Jan G, Belzacq AS, 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.

Jouany JP, Morgavi DP. 2007. Use of 'natural` products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1:1443-1466.

Kämpfer P, Erhart R, Beimfohr C, Böhringer J, Wagner M, Amann R. 1996. Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecol* 32:101-121.

Kalmokoff ML, Theather RM. 1997. Isolation and characterization of a bacteriocin (Butyriovibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyriovibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol* 63:394-402.

Klieve AV, Hennessy D, Ouwerkerk D, Forster RJ, Mackie RI, Attwood GT. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyriovibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J Appl Microbiol* 95:621-30.

Kobayashi Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim Sci J* 77:375-385.

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

Krause DO, Dalrymple BP, Smith WJ, Mackie RI, McSweeney CS. 1999. 16s rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiology* 145:1797-1807.

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev* 27:663-93.

Krause KM, Oetzel GR. 2005. Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 88:3633-3639.

Krishnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke KH. 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. J Anim Physiol Anim Nutr 65:28-35.

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

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En:Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp. 115–175. E. Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley.

Larue R, Yu Z., Parisi VA, Egan AR, Morrison M. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. Environ Microbiol. 7:530-43.

Leedle JAZ, Butine TJ. 1987. Enumeration of cellulolytic anaerobic bacteria from the bovine rumen: comparison of three methods. Curr Microbiol 15:77-79.

Lukáš F, Šimůnek J, Mrázek J, Kopečný J. 2010. PCR-DGGE Analysis of bacterial population attached to the bovine rumen wall. Folia Microbiol 55:345–348.

Mackie RI, Heath S. 1979. Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen sheep. Appl Environ Microbiol 38:416-421.

Macy JM, Farrand JR, Montgomery L. 1982. Cellulolytic and non-cellulolytic bacteria in rat gastrointestinal tracts. Appl Environ Microbiol 44:1428-1434.

Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim Feed Sci Technol 79:321-330.

Martin SA. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: A Review. J Anim Sci. 76:3123-3132.

Maynard LA, Loosli JK, Hintz HF, Warner RG. 1979. Animal Nutrition, seventh ed. McGraw Hill Publishing, New York.

McCowan RP, Cheng KJ, Bailey CBM, Costerton JW. 1978. Adhesion of bacteria to the epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Appl Environ Microbiol* 35:149-155.

Meissner HH, Henning PH, Horn CH, Leeuw K-J, Hagg FM, Fouché G. 2010. Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. *South African J Anim Sci* 40:79-100.

Mentschel J, Leiser R, Mulling C, Pfarrer C, Claus R. 2001. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Arch. Tierernahr.* 55:85–102.

Miller T, Wolin MJ. 1974. A serum bottle modification of the Hungate Technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985-987.

Miron J, Forsberg CI. 1998. Features of *Fibrobacter intestinalis* DR7 mutant which is impaired with its ability to adhere to cellulose. *Anaerobe* 4:35–43.

Miron J, Morag E, Bayer EA, Lamed R, Ben-Ghedalia D. 1998. An adhesion defective mutant of *Ruminococcus albus* SY3 is impaired in its capability to degrade cellulose. *J Appl Microbiol* 84:249–254.

Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci* 84:1294–1309.

Mitsumori M, Ajisaka N, Tajima K, Kajikawa H, Kurihara K. 2002. Detection of Proteobacteria from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers. *Lett Appl Microbiol* 35:251–255.

Montaño MF, Chai W, Zinn-Ware TE, Zinn RA. 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J Anim Sci* 77:780-84.

Montgomery L, Flesher B, Stahl D. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 38:430–436.

Oeztuerk H, Schroeder B, Beyerbach M, Breves G. 2005. Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. J Dairy Sci 88:2594-600.

Olubobokun JA, Craig WM. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. J Anim Sci 68:3360-3370.

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

Pell AN, Schofield P. 1993. Computerised monitoring gas production to measure forage digestion *in vitro*. J Dairy Sci 76:1063–1073.

Perelmuter K, Fraga M, Zunino P. 2008a. *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. Appl Microbiol 104:1718-1725.

Perelmuter K, Fraga M, Valencia M, Pérez A, Zunino P. 2008b. Microbiota ruminal: cuantificación, caracterización y aislamiento de potenciales organismos probióticos para prevenir la acidosis bovina. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría.

Perelmuter K, Fraga M, Rodríguez ML, Abecia L, Soto E, Yáñez D, Zunino P. 2010. Effects of potential probiotics strains on ruminal bacteria composition in an *in vitro* acidosis model. Rowett-INRA Conference Gut Microbiology; new insights into gut microbial ecosystems, Aberdeen, Escocia.

Pernthaler J, Glöckner F, Schönhuber W, Amann R. 2003a. Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. <http://www.arb-home.de>

Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R. 2003b. Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69:2631-2637.

Piknova M, Filova M, Javorsky P, Pristas P. 2004. Different restriction and modification phenotypes in ruminal lactate-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 236:91-95.

Prins RA. 1971. Isolation, culture and fermentation characteristics of *Selenomonas ruminantium* var. *Bryanti* var. N. From the rumen of sheep. *J Bacteriol* 105:820-825.

Reynolds CK. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J Dairy Sci* 86:1201-1217

Russell JB, Rychlik JL. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292:1119-1122.

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

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

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

Sadet-Bourgeteau S, Martin C, Morgavi DP. 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Vet Microbiol* IN PRESS.

Schingoethe DJ, Brouk MJ., Lightfield KD, Baer RJ. 1996. Lactational responses of dairy cows fed unsaturated fat from extruded soybeans or sunflower seeds. J Dairy Sci 79:1244-1249.

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

Scott HW, Dehority BA. 1964. Vitamin requirements of several cellulolytic bacteria. J Bacteriol. 89:1169-1175.

Seymour WM, Campbell DR, Johnson ZB. 2005. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. Anim Feed Sci Technol 119:155-169.

Sharp R, Ziemer CJ, Stern MD, Stahl DA. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. FEMS Microbial Ecol 26:71-78.

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

Shoep TD. 2004. Isolation and characterization of *Pseudobutyrvibrio ruminis* gene promoters. Tesis para la obtención de PhD, Murdoch University, Australia.

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

Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, Montgomery L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl Environ Microbiol 54:1079-1084.

Stern MD, Calsamiglia S, Endres MI. 1994a. Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. En: Nuevos sistemas de

valoración de alimentos y programas alimenticios para especies domésticas. Ed. FEDNA, Madrid.

Stern MD, Varga GA, Clark JH, Firkins JL, Huber JT, Palmquist DL. 1994b. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 77:2762-2786.

Stewart CS, Duncan SH, Flint HJ. 1990. The properties of forms of *Ruminococcus flavefaciens* which differ in their ability to degrade cotton cellulose. *FEMS Microbiol Lett* 72:47-50.

Stewart CS, Bryant MP. 1988. The rumen bacteria. En: Hobson PN(Ed.) *The Rumen Microbial Ecosystem*. p 21. Elsevier, Barking, Essex, UK.

Strobel HJ, Russell JB. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J Dairy Sci* 69:2941-2947.

Tang SX, Tayo GO, Tan ZL, Sun ZH, Shen LX, Zhou CS, Xiao XJ, Ren GP, Han XF, Shen SB. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. *J Anim Sci* 86:1164-1172.

Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI, Benno Y. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 48:185-197.

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

Tung RS, Kung L. 1993. *In vitro* effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. J Dairy Sci 76:1083-1090.

Uyeno Y, Sekiguchi Y, Tajima K, Takenaka A, Kurihara M, Kamagata Y. 2007. Evaluation of group-specific, 16S rRNA-targeted scissor probes for quantitative detection of predominant bacterial populations in dairy cattle rumen. J Appl Microbiol 103:1995-2005.

van Gylswyk NO, van der Toorn. 1986. Description and designation of a neotype strain of *Eubacterium cellulosolvens* (*Cillobacterium cellulosolvens* Bryant, Small, Bouma and Robinson) Holdeman and Moore. In Int J Sys Bacteriol 36:275-277.

van Gylswyk NO, Hippe H, Rainey FA. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype. Int J Sys Bacteriol 46:559-563.

van Soest PJ. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press.

Vinderola CG, Medici M, Perdigon G. 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. J Appl Microbiol 96:230-243.

Wallace R. 1994. Ruminal Microbiology, Biotechnology, and Ruminant Nutrition: Progress and Problems. J Anim Sci 72:2992-300

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol 73:5261-5267.

Weimer PJ. 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. Crit Rev Biotechnol 12:189-223.

Weimer PJ, Waghorn GC, Odt L, Mertens DR. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81:122-134.

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

Wilkins J. 1974. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl Microbiol* 27:135-140.

Wright AD, Kennedy P, O'Neill CJ, Toovey AF, Popovski S, Rea SM, Pimm CL, Klein L. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* 28:3976-85.