

Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes del cultivo



Characterization of the ruminal bacterial microbiota of a grazing bovine through classical and cultivation-independent techniques

Fraga M¹, Perelmuter K¹, Valencia M J¹,
Cajarville C², Zunino P^{1*}

Recibido: 05/07/2012
Aprobado: 27/08/2012

RESUMEN

La microbiota simbiote ruminal ha conferido a los rumiantes la ventaja evolutiva de poder aprovechar la fibra vegetal a través de su metabolismo fermentativo. La fermentación de la fibra en el rumen provee de fuentes de energía mientras que la biomasa microbiana aporta la principal fuente de proteínas. La comunidad bacteriana ruminal comprende varios cientos de especies bacterianas y está distribuida en la fase sólida del contenido ruminal, en el fluido ruminal y en una menor medida asociada al epitelio. Sólo una fracción de la microbiota ruminal, mayoritariamente anaerobia, puede ser cultivada y el advenimiento de los métodos moleculares ha permitido conocer la diversidad microbiana sin la necesidad de cultivo. Los objetivos de este trabajo

SUMMARY

Ruminal microbiota has conferred ruminants the ability to utilize cellulose present in vegetal material. Fiber breakdown provides energy sources to ruminants and the microbial biomass represents the main protein source for grazing animal. Rumen bacterial community is composed by hundreds of species and is distributed in the particulate solid phase, in ruminal fluid and to a lesser extent associated to the ruminal epithelium. Only a small portion of the mainly-anaerobic ruminal microbiota can normally be cultured. Molecular methods have shed light in the study of microbial diversity without cultivation. The objectives of this work were to characterize the cultivable and non-cultivable ruminal bacterial community associated with solid and fluid rumen

¹: Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

² Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Lasplacas 1550, CP 11600, Montevideo, Uruguay

*: Autor para correspondencia, e-mail: pmzunino@gmail.com

fueron caracterizar la microbiota bacteriana ruminal cultivable y no cultivable asociada a las fracciones sólida y líquida del contenido ruminal de un bovino a pastoreo y aislar y clasificar bacterias capaces de crecer en un medio de cultivo con celulosa como principal fuente de carbono y energía. Para evaluar la microbiota cultivable se utilizaron medios de cultivo artificiales mientras que el análisis de la comunidad microbiana total se realizó por medio de la técnica de *Fluorescent in situ hybridization* (FISH). Se identificaron 16 aislamientos incluyendo miembros de los géneros *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Succinivibrio* y *Selenomonas* además de otros 4 que representan nuevas especies y géneros bacterianos. Este trabajo representa una primera aproximación en el país dirigida a aislar e identificar microorganismos ruminales por medio de técnicas bacteriológicas y moleculares.

PALABRAS CLAVE:

Microbiota bacteriana ruminal, FISH, pastoreo

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes han desarrollado una compleja microbiota simbiote que incluye bacterias, protozoarios, hongos y arqueas (Van Soest, 1994), la cual les ha permitido adaptarse al consumo de vegetales y la digestión del material fibroso. Para entender mejor las relaciones microbianas y los

content fractions of a grazing bovine and to isolate and identify bacteria that are able to grow onto a culture media with pure cellulose as the main energy and carbon sources. Sixteen isolates were identified including members of *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Succinivibrio* and *Selenomonas* genera. Four bacterial isolates were representatives of new genera and species. As far as we are concerned, this is the first local approach focused on the identification and characterization of ruminal native microorganisms using classic bacteriology and molecular techniques. .

KEYWORDS:

Ruminal bacterial community, FISH, grazing animals

procesos metabólicos en el rumen es necesario describir y comprender la diversidad de la comunidad así como la influencia de diferentes factores del huésped y de la dieta en su composición (Larue y col., 2005).

La fermentación de la fibra produce ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales constituyen la principal fuente de energía para los rumiantes, biomasa microbiana que es utilizada como fuente de proteína así como CO_2 y CH_4 , los que se pierden en el ambiente (Van Soest, 1994).

Se estima que la comunidad microbiana ruminal comprende varios cientos de especies bacterianas. La mayoría de estas son anaerobias estrictas o

facultativas y al menos 30 son las predominantes con cantidades de aproximadamente 10^{11} células bacterianas/mL de fluido ruminal (Hespell, 1987; Miron y col., 2001).

Existe una población microbiana adherida al epitelio ruminal (McCowan y col., 1978; Dehority y Grubb, 1981), otra que se encuentra libre en el fluido y por último una porción adherida y en íntimo contacto con la partículas alimenticias. Estas tres fracciones son diferentes en composición (Olubobokun y col., 1990).

En la fase líquida (fluido o líquido ruminal) los microorganismos se encuentran libres y se nutren de proteínas y carbohidratos solubles. Constituyen entre el 20 y 30% de la biomasa bacteriana (Miron y col., 2001). Más del 70% de la microbiota ruminal está asociada a la fase sólida del contenido ruminal (Forsberg y Lam, 1977) y se calcula que es responsable de entre el 88 y 91% de la actividad fibrolítica, del 70% de la actividad amilasa y del 75% de la actividad proteolítica del rumen (Miron y col., 2001) constituyendo ésta la fracción metabólicamente más importante del sistema ruminal.

Sólo una fracción de la comunidad bacteriana de la mayor parte de los sistemas microbianos es cultivable. En el caso del rumen se estima que entre el 10 y 50 % de la comunidad bacteriana total puede ser cultivada en medios artificiales (Kobayashi, 2006). Los métodos moleculares han

permitido estudiar la microbiota ruminal en forma independiente del cultivo. Los distintos abordajes pueden incluir la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, PCR cuantitativo y *Fluorescent in situ hybridization* (FISH), entre otros. En la técnica de FISH se utilizan sondas de ADN marcadas con fluoróforos que hibridan con regiones específicas del ARNr 16S, lo que permite detectar y cuantificar células bacterianas de interés.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la microbiota bacteriana del contenido ruminal de un bovino a pastoreo y el aislamiento e identificación filogenética de miembros de la comunidad potencialmente fibrolítica así como bacterias utilizadoras de ácido láctico. De acuerdo al objetivo planteado se realizaron recuentos en diferentes medios de cultivo, se analizaron grupos seleccionados de microorganismos por medio de la técnica de FISH y se aislaron e identificaron molecularmente miembros de la comunidad microbiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestreos

Para los muestreos de contenido ruminal se utilizó una vaca Holando con una cánula permanente en el rumen alojada en el Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° latitud sur, 35° longitud oeste).

El régimen alimenticio del animal consistió en pastoreo de una pradera en estado vegetativo, mezcla de ryegrass (*Lolium multiflorum*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*). La composición de la misma fue de 17% proteína bruta, 35% fibra ácido detergente y con un rendimiento de 2000kg de MS/ha. Las manipulaciones fueron realizadas siguiendo protocolos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A) de la UdelaR, Uruguay.

Una fracción de 25 g del contenido ruminal (muestra C, correspondiente a sólidos y fluido) fue extraída manualmente del fondo del saco ruminal e inmediatamente diluida en 250 mL de buffer salino fosfatado (PBS) suplementado con 0,025 g/L de Na₂-Cisteína (PBS-Cys). Luego, la muestra se procesó en licuadora bajo una corriente de CO₂. La suspensión resultante fue diluida al décimo en PBS-Cys en viales con atmósfera enriquecida en CO₂, se realizaron diluciones seriadas al décimo y se procedió de acuerdo a lo descrito en el siguiente apartado.

Las muestras de la fracción líquida del contenido (fluido ruminal, muestras F) se obtuvieron filtrando porciones de contenido ruminal 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 en el caso de las muestras C.

Aislamiento y condiciones de cultivo de bacterias ruminales

Dado el carácter anaerobio de la microbiota ruminal, en la preparación de medios de cultivo y soluciones se utilizó siempre 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 desplazar el oxígeno.

Los recuentos de bacterias anaerobias fueron realizados utilizando la técnica de *roll tube* propuesta por Hungate (1969) y modificada por Miller y Wolin (1974). Para el recuento de microorganismos anaerobios totales, aislamiento y mantenimiento de bacterias aisladas se usó un medio de cultivo (MB) que tuvo como base la composición del descrito por Stahl y col. (1988). Este medio de cultivo fue utilizado para diseñar estrategias de recuento y aislamiento de bacterias con potencial fibrolítico de acuerdo a las modificaciones que se especifican. La composición por litro del medio de cultivo MB fue: 166 mL de solución de sales A (composición 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; Macy y col. 1982); 166 mL de K₂HPO₄, 2,7 g/L, 200 mL de fluido ruminal clarificado (1000 x g, 10 min y luego 25000 x g, 20 min, Grubb y Dehority, 1976), extracto de levadura, 500 mg; triptona, 500 mg; glucosa, maltosa, almidón, celobiosa y xilosa 1 g de cada uno, 0,62

mL de mezcla de ácidos grasos volátiles (ác. acético, 5,8 mM; ác. propiónico, 1,6 mM; ác. butírico, 8,6 x 10⁻¹ mM, n-valérico, 1,8 x 10⁻¹ mM; isovalérico, 1,8 x 10⁻¹ mM; (Macy y col., 1982), 0,02 mL de solución de vitaminas (composición en mg/mL: piridoxina clorhidrato, 0,1; riboflavina, 0,1; tiamina clorhidrato, 0,1; nicotinamida, 0,1; Ca-D-pantotenato, 0,1 y ác. p-aminobenzoico, 5x10⁻³), 0,1 mL de vitamina B12 (0,25 mg/mL), solución de vitaminas termolábiles (ác. fólico, 0,5 mg/mL; biotina, 0,5 g/mL, filtrado (0.2 nm) y agregada luego del autoclavado, 0,1 mL cada 5 mL de medio), resarzurina 1 mg, Na₂S-Cys 0,25 g/L, el pH fue ajustado a 6,5 con NaHCO₃, cuando se requirió medio sólido se adicionó agar bacteriológico, 1,5 %.

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

El recuento y aislamiento de microorganismos potencialmente fibrolíticos se realizó en el medio base-celulosa (MB-Cel) cuya composición fue como la del MB, sin el agregado de los hidratos de carbono y con la adición de celulosa microcristalina (Avicel PH101, 10%) con el objetivo de hacer de la celulosa la principal fuente de carbono y energía. La incubación se realizó durante 10 días.

Para el recuento de microorganismos aerobios se utilizó el caldo Infusión cerebro-corazón (BHI, Difco, USA) suplementado con agar bacteriológico,

1,5%. Se sembraron en superficie diluciones seriadas y las incubaciones se realizaron a 39 °C durante 24 h.

Aislamiento e identificación bacteriana

Con el fin de aislar e identificar miembros cultivables de la comunidad microbiana potencialmente fibrolítica del rumen bovino se repicaron al azar colonias aisladas a partir de los viales de MB-CEL en los que se realizaron los recuentos. Para esto se utilizaron jeringas estériles previamente reducidas con una solución de Na₂S-Cys 0,25 g/L. Cada colonia se inoculó en caldo MB y se registró el crecimiento y se verificó la pureza de los aislamientos. Los aislamientos se conservaron a -80°C en MB-glicerol al 15% en viales con atmósfera anaerobia.

Se seleccionaron al azar 16 aislamientos de la colección para su posterior estudio filogenético y asignación de identidad. Para esto se extrajo ADN genómico empleando el sistema comercial *GeneElute bacterial genomic DNA extraction kit* (Sigma, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que se usó en reacciones de PCR para amplificar un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S. Se emplearon los cebadores universales para el Dominio Bacteria 27F (5'-AGATTGATCMTGGCTAGGGA-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') de acuerdo a las condiciones de reacción descritas por Fraga y col. (2008). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc., Seúl, Corea del Sur. Las secuencias se ensamblaron

y editaron mediante el programa Bioedit, se compararon con la base de datos del *Ribosomal Data Base Project* (RDP) utilizando la herramienta Classifier (Wang y col., 2007), con esta herramienta es posible afiliar a los aislamientos hasta el nivel de género. Con el fin de conocer los parientes más cercanos a los aislamientos analizados se realizaron árboles filogenéticos utilizando el método de Maximum Likelihood (ML) empleando el programa MEGA versión 5.05 (Tamura y col., 2011).

Detección y cuantificación de grupos bacterianos por FISH

Miembros de la microbiota total, cultivable y no cultivable, fueron cuantificados utilizando la técnica de FISH. Para esto, porciones de 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 y filtradas (ISOPORE, 0,2 µm; MILLIPORE, Irlanda).

Las hibridaciones fueron realizadas sobre segmentos de los filtros según Pernthaler y col. (2003). Las sondas utilizadas se presentan en el Cuadro 1, las condiciones de hibridación fueron optimizadas para cada sonda (Perelmuter y col., 2008). Con el fin de cuantificar las bacterias totales y poder calcular la abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos elegidos se utilizó una mezcla equimolar de 3 sondas (EUBMIX, Cuadro 1) para la detección de componentes del Dominio *Bacteria* (Amann y col., 1990; Daims y col., 1999). Se utilizaron sondas dirigidas a: las bacterias celulolíticas *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* (sondas Ralb y Rfla respectivamente, Cuadro 1);

Cuadro 1. Sondas de oligonucleótidos para FISH y condiciones de hibridación

Sonda	Secuencia de las sondas (5'-3')*	% formamida
<i>Selenomonas ruminantium</i> (Srum)	CCCATCTTTGCGGCAGGTTG	40
<i>Megasphaera elsdenii</i> (Mega)	ACCCGTTTGCCACTCGAATC	30
<i>Ruminococcus albus</i> (Ralb)	TGCGGTTAGAACACAGGC	30
<i>Propionibacterium</i> spp. (Prop)	AATTCCATTCTCCCCTACCTTC	35
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (Rfla)	CCCTCTCTCTAAGGTAGG	10
Eubacteria (EUBMIX)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35
	GCAGCCACCCGTAGGTGT	
	GCTGCCACCCGTAGGTGT	

* Las sondas estaban marcadas en el extremo 5' con FITC.

bacterias consumidoras de lactato, importantes para evitar una posible acumulación de este ácido: *Selenomonas ruminantium*, *Propionibacterium* spp., *Megasphaera elsdenii* (sondas Srum, Mega y Prop respectivamente, Cuadro 1). 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 calculados. Para calcular el total de células, arqueas, bacterias, los filtros se tiñeron con DAPI, un fluorocromo que tiñe el ADN en forma inespecífica.

RESULTADOS

Recuentos bacterianos

En este trabajo se realizaron recuentos de bacterias anaerobias y aerobias totales así como fibrolíticas potenciales ya que conforman un grupo importante de bacterias ruminales por la función que cumplen en la digestión de la fibra. Los resultados de los recuentos se presentan en el Cuadro 2. Los valores

entre las muestras de contenido y fluido ruminal fueron similares y se observó que la microbiota bacteriana cultivable en MB-CEL representó aproximadamente el 10% de la microbiota bacteriana cultivable en condiciones de anaerobiosis. Los recuentos de bacterias aerobias totales resultaron aproximadamente 100 veces menores que los obtenidos en condiciones de anaerobiosis.

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

La metodología de FISH se aplicó con el fin de evaluar la microbiota bacteriana sin la necesidad de cultivo, utilizando sondas para diferentes grupos microbianos de interés en el ambiente ruminal. 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% (sondas EUBMIX, Cuadro 3).

En F se contabilizaron $1,47 \times 10^{10}$ células/mL con DAPI y los miembros del Dominio *Bacteria*

Cuadro 2. Recuentos de bacterias cultivables en Fluido (F) y contenido ruminal (C)

Grupo	F (UFC/mL)	C (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-CEL*	$(2,60 \pm 0,94) \times 10^8$	$(7,40 \pm 0,75) \times 10^8$

* MB-CEL, microorganismos en medio con celulosa como fuente principal de carbono y energía.

Cuadro 3. Número de células totales y abundancias de grupos bacterianos seleccionados en las muestras de contenido (C) y fluido ruminal (F)

Grupo Bacteriano	C		F	
	células/g	%*	células/mL	%
Dominio Bacteria	1,5x10 ¹⁰		6,7x10 ⁹	
Celulolíticas				
Ruminococcus albus	1,3x10 ⁸	0,8	1,2x10 ⁸	1,8
Ruminococcus flavefaciens	9,4x10 ⁷	0,6	<1 x 10 ⁷	<0,1
Consumidoras de lactato				
Selenomonas ruminantium	1,9x10 ⁸	1,3	1,0x10 ⁸	1,5
Propionibacterium spp	1,6x10 ⁷	0,1	3,4x10 ⁷	0,5
Megasphaera elsdenii	1,3x10 ⁸	0,8	1,0x10 ⁸	1,5

*Las abundancias se calcularon como el porcentaje de células hibridadas con las sondas específicas en función del total de células hibridadas con la sonda para el Dominio Bacteria

representaron el 61,1% del total de microorganismos. Se pudo observar que *R. albus* y *R. flavefaciens* representaron menos del 2% de la población bacteriana en ambas muestras y *R. flavefaciens* no pudo ser detectado en las muestras F (Cuadro 3). En las muestras C *Selenomonas ruminantium*, *Propionibacterium* spp. y *Megasphaera elsdenii* (utilizadoras del ácido láctico) sumadas mostraron una abundancia cercana al 2% con un predominio de *S. ruminantium* mientras que en F estos grupos bacterianos estuvieron más representados con una abundancia del 3.5%.

Identificación de los aislamientos

Se identificaron 16 aislamientos de bacterias cultivadas en MB-CEL. La filogenia de estos

organismos basada en la secuencia del gen ARNr 16S se presenta en la Figura 1. Con la herramienta *Classifier* del RDP se pudo afiliar a los aislamientos hasta el nivel de género. 3F24C, 4C50C, 4C60C, 4C19C y 4C20C fueron representantes del género *Pseudobutyrvibrio* mientras que cinco aislamientos pertenecieron al género *Butyrvibrio* (4C80C, 4C63C, 4C79C, 4C58C y 4C59C). 4C53C perteneció al género *Selenomonas* y 4C52C fue identificado como un representante del género *Succinivibrio*. Cuatro aislamientos pertenecieron a la familia *Lachnospireaceae*, 4F76C pudo ser clasificado como representante del género *Oribacterium* mientras que 3F22C, 4F21C y 4C56C resultaron ser representantes de un nuevo género bacteriano. De acuerdo a la filogenia propuesta por el árbol ML

estos aislamientos están cercanamente emparentados con el género *Pseudobutyrvibrio*.

El aislamiento 4C80C agrupó con la especie fibrolítica *Butyrvibrio fibrisolvens* mientras que 4C58C, 4C59C, 4C63C y 4C79C agruparon con *Butyrvibrio hungatei*. Dos aislamientos aparecen como muy distantes evolutivamente con respecto al resto y no se incluyeron en el árbol filogenético, 4C53C perteneció al género *Selenomonas* y por homología en la secuencia del ARNr 16S pudo ser clasificada como *S. ruminantium* mientras que 4C52C es un representante de la especie *Succinivibrio dextrinosolvens*.

DISCUSIÓN

Actualmente existe una tendencia a estudiar los sistemas microbianos con abordajes casi exclusivamente moleculares y la microbiota ruminal no escapa a ella. La biología molecular rompió con la barrera del cultivo y permitió descubrir la existencia de microorganismos previamente desconocidos. Sin embargo también se deben hacer esfuerzos para caracterizar las bacterias a través del cultivo con el fin de potenciar el conocimiento de la diversidad funcional de las poblaciones bacterianas ruminales (Firkins y col., 2006).

El presente trabajo describe aspectos relativos a la microbiota ruminal de un animal en condiciones de pastoreo a través de un abordaje que involucró

el cultivo y el aislamiento de microorganismos ruminales así como también un abordaje molecular. Si bien no fue posible establecer asociaciones entre la composición de la microbiota y otras condiciones (ej. alimentación) el presente estudio posibilitó analizar mediante abordajes clásicos y modernos una comunidad bacteriana compleja y con un gran potencial biotecnológico en el medio. Los resultados de los recuentos de bacterias anaerobias totales en este caso en particular tanto en las muestras F (Fluido ruminal) como C (Contenido ruminal) concuerdan con estudios realizados en otros países y 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 y col., 2010).

La microbiota bacteriana capaz de crecer en condiciones de aerobiosis (microorganismos aerobios o anaerobios facultativos) fue aproximadamente 100 veces menor que la que creció en condiciones anaerobias, relación que permite visualizar el carácter anaerobio de la microbiota ruminal (Hespell, 1987).

Con respecto a la microbiota potencialmente fibrolítica recuperada en el medio MB-CEL (con celulosa como principal fuente de carbono y energía) se pudo observar que representó aproximadamente el 10% del total de microorganismos anaerobios que pudieron crecer en el medio de crecimiento general (MB). En estudios previos en los que se

utilizaron métodos similares a los empleados en 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 y col., 1999). A partir de los viales que presentaron crecimiento con medio MB-CEL se realizaron aislamientos para clasificar miembros cultivables de la microbiota con potencial fibrolítico. Se aislaron e identificaron microorganismos semejantes a *Butyrivibrio* (“*Butyrivibrio*-like organisms”) que pueden llegar a representar del 24 al 30% de las bacterias cultivables del rumen (Forster y col., 1996), incluyendo representantes de las especies *B. fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, y *Butyrivibrio hungatei*. Estos organismos son importantes miembros del ecosistema ruminal, han sido descritos como integrantes de los llamados consorcios fibrolíticos del rumen y establecen relaciones simbióticas entre ellos. En estos consorcios no hay solamente 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 entre otras a *P. ruminis* y *B. fibrisolvens* (Shinkai y col., 2010). La denominación de organismos semejantes a *Butyrivibrio* se debe 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 y col., 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 incluidos en otro género (van Gylswyk y col., 1996; Figura 1).

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 g de las proteobacterias (Hippe y col., 1999). En este trabajo, la cepa identificada como 4C52C se clasificó en esta especie. Este aislamiento así como 4C53C no son microorganismos asociados a las fibrólisis, este último fue clasificado como *Selenomonas ruminantium*.

Cuatro aislamientos no presentaron homología con secuencias de especies bacterianas depositadas en los bancos de datos y representarían nuevas especies e incluso géneros. Las secuencias del ARNr 16S de 3F21C, 3F22C, 4C56C son muy similares entre sí y se incluyeron en la familia *Lachnospiraceae* del Orden *Clostridiales* (Clase *Clostridia* del Phylum *Firmicutes*); organismos similares han sido aislados también en un trabajo reciente pero aún no han sido descritos (Kenters y col., 2011). En esta

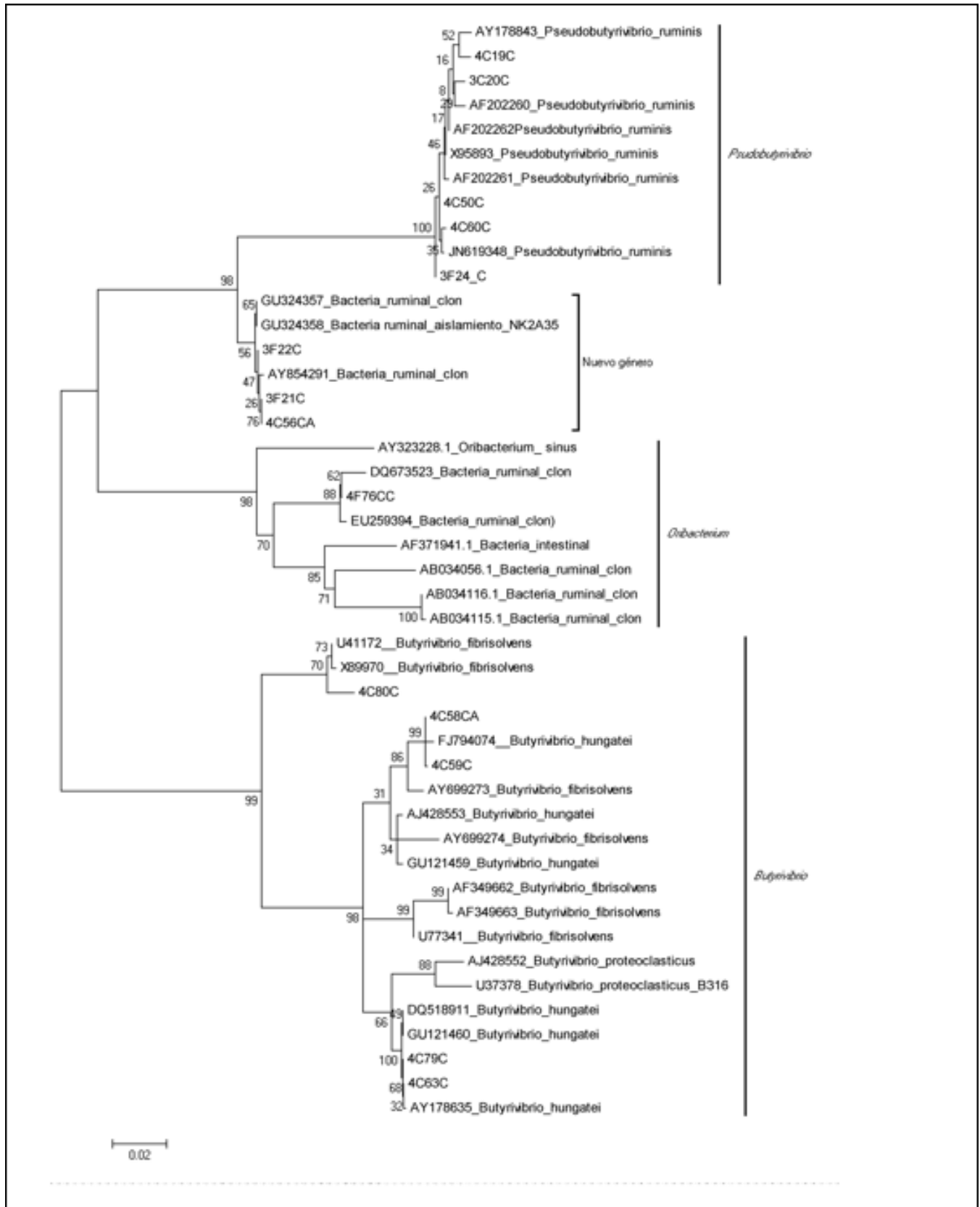


Figura I. Análisis filogenético por el Método de Maximum Likelihood (ML)

La historia evolutiva de los aislamientos fue inferida por el método ML basado en el modelo de Kimura con 2 parámetros (Kimura 1980). Se muestra el árbol consenso luego de realizadas 500 réplicas y el % en los nodos (Felsenstein 1985). El árbol está representado a escala y la longitud de las ramas representa las sustituciones por sitios, la escala (0.02 sustituciones por sitio) se muestra abajo a la izquierda. Para cada secuencia utilizada en los alineamientos se muestra el número de acceso, género y especie si corresponde.

familia de microorganismos se encuentran géneros de microorganismos importantes en la microbiota ruminal los cuales ya han sido mencionados como *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* (Figura. 1). Por último, el aislamiento 4C76CC también fue clasificado como representante de la familia *Lachnospiracea* y es un representante del género *Oribacterium* que actualmente consta de una sola especie descrita (Carlier y col., 2004).

Todos los aislamientos presentaron homología con especies, géneros o familias pertenecientes al ambiente ruminal y la mayor parte de ellas 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.

Al realizar el recuento en diferentes medios fue posible cuantificar la microbiota bacteriana ruminal cultivable y realizar los aislamientos posteriores. Al comparar los resultados de la microbiota total que pudo ser cultivada y la que se calculó a partir de los recuentos microscópicos se pudo comprobar que sólo una fracción de aproximadamente el 10% pudo ser cultivada, hecho que ocurre con la mayor parte de los ecosistemas microbianos (Kobayashi, 2006; Donachie y col., 2007).

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 y col. (1998) describieron que el ARNr bacteriano representaba el 57,7% del total del ARNr (la suma de los Dominios *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*). La representación bacteriana en este trabajo, contabilizado por un método diferente, fue similar a estos resultados previos.

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* en la fibrólisis ruminal (Firkins y col., 2006). 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 (Cuadro 3). 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 y col., 2007; Krause y col., 1999).

Selenomonas ruminantium, *Megasphaera elsdenii* y especies del género *Propionibacterium* son importantes consumidoras de ácido láctico en el rumen (Meissner y col., 2010). *M. elsdenii* puede llegar a consumir entre el 60 y 95% de todo el ácido láctico disponible en el órgano (Counotte y col., 1981). Según dos técnicas independientes del

cultivo se ha indicado que *S. ruminantium* está presente en el rumen en una proporción de entre el 1 y 2% de las bacterias ruminales (Uyeno y col., 2007). Los resultados obtenidos por FISH para los organismos consumidores de lactato 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.

El presente estudio describe por primera vez la aplicación de técnicas moleculares independientes del cultivo a la caracterización de la microbiota bacteriana ruminal en nuestro medio. Por otra parte, la caracterización de bacterias ruminales cultivables en nuestro medio abre las puertas a la selección local de microorganismos que pueden resultar atractivos desde el punto de vista productivo y biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Claudia Piccini por la lectura crítica del manuscrito y la asistencia en los análisis filogenéticos y a la Dra. Cecilia Alonso por la asistencia en el diseño de las sondas para FISH. Este trabajo fue parcialmente financiado con fondos de los proyectos PDT 78/07 y FCE 2493.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Carlier JP, K'ouas G, Bonne I, Lozniewski A, Mory F. (2004). *Oribacterium sinus* gen. nov., sp.nov., within the family 'Lachnospiraceae' (phylum Firmicutes). *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1611-1615.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Dehority BA, Tirabasso PA. (1989). Lyophilization of rumen fluid for use in culture

- media. *Appl Environ Microbiol* 55:3237-3239.
7. Donachie SP, Foster JS, Brown MV. (2007). Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME* 1:97-99.
 8. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
 9. Firkins JL, Yu Z. (2006). Characterisation and quantification of the microbial populations in the rumen. En: Sejrsen K, Hvelplund, T, Nielsen, MO. Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Wageningen Wageningen Academic Publishers pp. 19-54.
 10. 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.
 11. Forster RJ, Teather 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Hespell RB. (1987). Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. *Proc Nutr Soc* 46:407-413.
 16. Hippe H, Hagelstein A, Kramer I, Swiderski J, Stackebrandt E. (1999). Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propionivibrio dicarboxilicus*, *Anaerobiospirillum thomasi*, *Succinimonas amyolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvens* and proposal of *Succinivibrionaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:779-782.
 17. Hungate RE. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes En: Norris JR, Ribbons DW. *Methods in microbiology*, vol. 3B. New York, Academic Press Inc. pp. 117-132.
 18. Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen P. (2011). Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *J Microbiol Methods* 84:52-60.
 19. Kimura M. (1980). A simple method for

- estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol Evol* 16:111-120.
20. Kobayashi Y. (2006). Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim Sci J* 77:375-385.
21. Kopečný J, Zorec M, Mrázek J, Kobayashi Y, Marinšek-Logar R. (2003). *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:201-209.
22. 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.
23. 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.
24. Leedle JAZ, Butine TJ. (1987). Enumeration of cellulolytic anaerobic bacteria from the bovine rumen: comparison of three methods. *Curr Microbiol* 15:77-79.
25. Macy JM, Farrand JR, Montgomery L. (1982). Cellulolytic and non-cellulolytic bacteria in rat gastrointestinal tracts. *Appl Environ Microbiol* 44:1428-1434.
26. Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. (2001). Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci* 84:1294-1309.
27. McCowan RP, Cheng KJ, Bailey CBM, Costerton JW. (1978). Adhesion of bacteria to the epithelial cell surfaces within the reticulorumen of cattle. *Appl Environ Microbiol* 35:149-155.
28. 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. *S Afr J Anim Sci* 40:79-100.
29. Miller T, Wolin MJ. (1974). A serum bottle modification of the Hungate Technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985-987.
30. Olubobokun JA, Craig WM. (1990). Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J Anim Sci* 68:3360-3370.
31. Perelmuter K, Fraga M, Valencia M, Pérez A, Zunino P. (2008). Microbiota ruminal: cuantificación, caracterización y aislamiento de potenciales organismos probióticos para prevenir la acidosis bovina. *Jornadas Uruguayas de Buiatría. XXXVI, Paysandú, Uruguay*, pp. 208-209.

32. Pernthaler J, Glöckner F, Schönhuber W, Amann R. (2003). Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. http://download.arb-home.de/documentation/FISH_chapter_reviewed.pdf (Acceso 28 de agosto de 2012)
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
37. 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.
38. 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.
39. Van Soest PJ. (1994). The nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, NY, Cornell University Press 476 p.
40. 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.