

Tesis de Doctorado  
PEDECIBA-Biología, Sub-área Microbiología

# Modulación de la microbiota y la fermentación ruminal con microorganismos ruminales nativos

**Martín Fraga**

Departamento de Microbiología  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

**Orientador: Pablo Zunino**

**Coorientadora: Cecilia Cajaville**

Noviembre, 2015.



<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
2.1. LOS RUMIANTES: CARACTERÍSTICAS, IMPORTANCIA .....	4
2.2. AMBIENTE Y MICROBIOTA RUMINAL: CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES.....	6
2.3. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA RUMINAL.....	8
2.4. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ACTUALES Y SUS CONSECUENCIAS.....	10
2.5. MODULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL, PROBIÓTICOS.....	11
2.6. ESTRATEGIA DEL PRESENTE TRABAJO.....	17
<b>3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	19
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA .....	21
4.2. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> ...	22
4.3. MEDIOS DE CULTIVO .....	23
4.4. ANIMALES .....	25
4.5. ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> .....	26
4.6. ANÁLISIS DE GAS ACUMULADO, MODELIZACIÓN MATEMÁTICA .....	28
4.7. PERFIL DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE LOS ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	29
4.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METANO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.....	30
4.9. EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO .....	31
4.10. CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS METANÓGENOS POR PCR EN TIEMPO REAL .....	32
4.11. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS: SECUENCIACIÓN MASIVA .....	33
4.12. ENSAYO DE ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS .....	35
4.12.1. Evaluación de la actividad del inóculo.....	36
4.12.2. Ambiente ruminal.....	37
4.12.3. Cuantificación de AGV.....	38
4.12.4. Nitrógeno amoniacal.....	39
4.12.5. Consumo y digestibilidad.....	39
4.12.6. Análisis químicos.....	40
4.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	40
<b>5. SECCIÓN 1. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS RUMINALES NATIVAS.....</b>	<b>42</b>
5.1. INTRODUCCIÓN.....	42
5.2. RESULTADOS.....	43
5.2.1. Identificación de los aislamientos.....	43
5.3. DISCUSIÓN.....	47
<b>6. SECCIÓN 2: EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS RUMINALES NATIVAS .....</b>	<b>51</b>
6.1. INTRODUCCIÓN.....	51
6.2. RESULTADOS.....	54
6.2.1. Dinámica de la fermentación ruminal .....	54
6.2.2. Ácidos grasos volátiles.....	56

6.2.3. Determinación de metano y microorganismos metanógenos .....	59
6.2.4. Evaluación de la microbiota ruminal en los fermentadores.....	60
<b>6.3. DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>7. SECCIÓN 3. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE</b>	
<b><i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> 50C.....</b>	<b>67</b>
7.1. INTRODUCCIÓN.....	67
7.2. RESULTADOS .....	70
7.2.1. Evaluación de la actividad del inóculo.....	70
7.2.2. Ambiente ruminal.....	72
7.2.3. Consumo y digestibilidad .....	77
7.2.4. Estructura de la comunidad microbiana .....	78
7.3. DISCUSIÓN.....	81
<b>8. SECCIÓN 4. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE <i>Prevotella</i></b>	
<b><i>bryantii</i> 3C5 .....</b>	<b>85</b>
8.1. INTRODUCCIÓN.....	85
8.2. RESULTADOS .....	87
8.2.1. Evaluación de la actividad del inóculo.....	87
8.2.2. Ambiente ruminal.....	89
8.2.3. Consumo y digestibilidad .....	93
8.2.4. Estructura de la comunidad microbiana .....	94
8.3. DISCUSIÓN.....	97
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>101</b>
<b>10. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>104</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>106</b>
<b>12. ANEXO ARTÍCULOS: FRAGA et al. 2013; FRAGA et al. 2015 .....</b>	<b>124</b>

## 1. RESUMEN

En los sistemas de producción actuales, en particular intensivos y semi-intensivos, se pueden producir desbalances en el delicado equilibrio entre la microbiota ruminal y el hospedero. La fermentación de la fibra y los resultados productivos pueden alterarse. Para resolver este problema, la modulación de la microbiota y la fermentación ruminal han captado el interés de criadores de ganado y veterinarios. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial de cepas ruminales nativas para modular la microbiota y la fermentación ruminal. Posteriormente se identificaron bacterias ruminales nativas. En una etapa posterior, se evaluó el potencial modulador de la microbiota y de la fermentación ruminal en un abordaje *in vitro* utilizando un grupo de cepas identificadas. Se pudo observar un efecto modulador, puesto en evidencia en base a diferencias en los perfiles de ácidos grasos volátiles, principal fuente de energía para los rumiantes, así como en cambios de la dinámica de fermentación. La cepa de *Pseudobutyrvibrio ruminis* (Pr 50C) mostró efectos interesantes como una mayor concentración de ácido butírico al compararla con los controles. Por último, se realizaron dos ensayos *in vivo* de administración de potenciales probióticos utilizando Pr 50C y una cepa de *Prevotella bryantii* (Pb 3C5). La administración de ambas cepas indujo cambios en el ambiente ruminal sin modificar la producción potencial de metano, la dinámica de producción de gas del fluido ruminal de los animales ni la estructura general de la microbiota ruminal. Se observaron cambios en los perfiles de producción de ácidos volátiles y de amoníaco ruminal. La administración de nuevas cepas o incluso combinaciones de cepas servirá para diseñar estrategias de modulación dirigidas a obtener resultados productivos específicos.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Los rumiantes: características, importancia**

Los rumiantes son animales herbívoros que consumen pasturas y forrajes en diversos sistemas de cría. La materia orgánica consumida por ellos en forma de fibra vegetal corresponde mayoritariamente a celulosa y hemicelulosa y no es digerible por enzimas propias del animal.

Para obtener carbono y energía a partir de los vegetales, los rumiantes han desarrollado un sistema digestivo particular en el cual habita una compleja comunidad microbiana que digiere la fibra consumida. Es así que en el rumen, compartimento digestivo que aloja a esta microbiota, se generan los precursores proteicos y lipídicos de los principales constituyentes de los productos comerciables del ganado, como la leche y la carne.

El aparato digestivo de estos animales tiene características peculiares que lo diferencian del resto de los animales. El aparato digestivo anterior está compuesto por cuatro compartimientos, de los cuales los tres primeros son considerados pre-estómagos mientras que el último de los cuatro es el que posee las características de estómago glandular similar al estómago de los animales monogástricos.

El primero y más grande de estos compartimentos 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 compartimentos generalmente se los considera como un sistema denominado retículo-rumen. Es en estos compartimentos 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 compartimentos, se conecta con el retículo por el orificio retículo-omasal y con el abomaso por el orificio omaso-abomasal. Finalmente, el abomaso se corresponde con el estómago glandular de los monogástricos. Una característica distintiva es que en él se secreta lisozima, enzima que ayuda a degradar a las células bacterianas que ingresan al órgano.

Gracias a los rumiantes, a su domesticación y explotación, los seres humanos pudieron expandir su territorio geográfico, desarrollar una fuente de alimentación estable y dar lugar a 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 100.000 millones de litros, siendo así el rumen "el fermentador comercial" más grande del mundo (Weimer, 1992).

En nuestro país, la producción asociada a la cría y comercialización de animales rumiantes representa uno de los rubros económicos más importantes. En el año agrícola 2012/2013 se registraron 11,5 millones de cabezas de ganado vacuno de biotipo cárnico, 782000 cabezas de ganado

lechero y 8.2 millones de ovinos (MGAP, 2014). Estos números ilustran la importancia de esta actividad para nuestro territorio que sólo en exportaciones cárnicas reportó ingresos por 1500 millones de dólares en 2012 (INAC, 2013).

## **2.2. Ambiente y 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 es la que ha hecho posible la adaptación al consumo de alimentos ricos en fibra 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 por tanto efectos en los procesos metabólicos de estos animales y las funciones de los microorganismos están íntimamente asociadas tanto con desordenes metabólicos de los rumiantes así como con su bienestar (Bryant, 1959).

El ambiente ruminal mantiene condiciones óptimas para el desarrollo de la microbiota, la cual es abundante y diversa. El ingreso 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 alimento, agua y una saliva con propiedades de tampón, mantiene el pH del líquido ruminal y la ingesta en valores cercanos a la

neutralidad levemente ácidos (Bryant, 1959). Existe una continua remoción de productos secundarios del crecimiento microbiano tanto por el consumo de otros microorganismos así como por la absorción por parte de la pared ruminal. La constante transferencia y remoción de equivalentes de reducción en forma de  $H_2$  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  $O_2$  es prácticamente nula ( $10^{-22}$  M), permitiendo así el desarrollo de una microbiota que en su mayoría es anaerobia estricta dadas las condiciones anóxicas existentes. Las poblaciones aerotolerantes ruminales se encuentran adheridas a las paredes del órgano así como en los estratos superiores del contenido ruminal.

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. 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. La degradación coordinada de la fibra, en que el sustrato de un microorganismo es el producto de otro (Dehority, 1991; Mackie, 2002) transforma a los carbohidratos insolubles en sustratos digeribles en dos formas, por un lado en proteína microbiana y por el otro en ácidos grasos volátiles (AGV; Mizrahi, 2013).

Los componentes insolubles como la celulosa y hemicelulosa son convertidos en componentes celulares de los microorganismos que son

luego digeridos como proteína microbiana en el abomaso. La proteína microbiana digerida constituye entre el 50 y el 80% del total de proteína absorbida por el animal (Storm y Ørskov, 1983; Mizrahi, 2013). 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., 1994; Hoover y Miller, 1996; Dewhurst et al., 2000).

Entre los AGV principales, que representan más del 90% de la concentración total, están los ácidos acético, propiónico y butírico. Los AGV son rápidamente absorbidos a través del rumen y constituyen la mayor parte de la energía metabolizable para un bovino adulto y son utilizados por el animal para su mantenimiento y producción. El ácido propiónico es utilizado como precursor en la gluconeogénesis y los ácidos acético y butírico se utilizan en la síntesis de lípidos (Mizrahi, 2013). Además de estos AGV, la fermentación produce  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  y ocasionalmente lactato (van Soest, 1994). 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).

### **2.3. Composición de la microbiota ruminal**

La microbiota ruminal ha captado el interés científico por décadas (Mizrahi, 2013). Como en el caso de la mayor parte de los ecosistemas microbianos, inicialmente se emplearon abordajes clásicos para su análisis que

involucraban el cultivo de microorganismos. Con el avance de las técnicas moleculares la microbiota ruminal se ha ido explorando con mayor profundidad y hoy en día la aplicación de metodologías de secuenciación masiva permite analizar miles de secuencias de una sola muestra (Pitta et al., 2014).

En el rumen coexisten los tres dominios de la vida, Bacteria, Archaea y Eukarya, siendo las bacterias los microorganismos más representados con poblaciones que alcanzan  $1 \times 10^{11}$ /mL (Kumar et al., 2012). Si bien algunos estudios presentan resultados encontrados, la microbiota ruminal está dominada por los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Pitta et al., 2010; Jami y Mizrahi, 2012, Kumar et al., 2012; Pitta et al., 2014). Estas proporciones se han magnificado en los últimos años con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación masiva y se adjudican a estos filos proporciones de más del 60 % y del 10 a 20 %, respectivamente (Li et al., 2012; McCann et al., 2014; Pitta et al., 2014). El género más representado del filo *Bacteroidetes* y por tanto de la comunidad ruminal de bovinos es *Prevotella* (Pitta et al., 2010; McCann et al., 2014; Pitta et al., 2014) con reportes de animales que sobrepasan el 80 % del total de las secuencias (Pitta et al., 2014). En general el resto de los géneros bacterianos, que cumplen diversas funciones de importancia en el rumen están en proporciones muy bajas. Las bacterias celulolíticas, por ejemplo, no sobrepasan el 1 % del total de microorganismos, lo que ha sido demostrado tanto por metodologías dependientes del cultivo como por métodos moleculares (Kumar et al., 2012; Fraga et al., 2013).

## 2.4. Sistemas de producción actuales y sus consecuencias

La utilización de la tierra para la explotación ganadera ha ido disminuyendo a lo largo de las últimas décadas dejando lugar a explotaciones agrícolas más redituables para los productores. Sin embargo, la demanda de productos lácteos y derivados, así como de carne (ovina y bovina), se han incrementado. Esto ha tenido consecuencias en los sistemas de producción bovina que han llevado a intensificarla cada vez más. De este modo, los animales son expuestos a situaciones de estrés debido al hacinamiento y cambios en la dieta.

Estos cambios en los sistemas productivos, que tienden a la intensificación, incluyen manejos nutricionales, como la utilización de concentrados de hidratos de carbono para obtener mejores resultados (a expensas de una menor oferta de forraje), implican la aparición de desórdenes metabólicos como la acidosis o, incluso, el aumento en la frecuencia de ciertas enfermedades infecciosas como la tuberculosis bovina que se transmite entre animales en estrecho contacto (Okafor et al., 2011).

El uso de concentrados energéticos, con gran porcentaje de carbohidratos fácilmente fermentables, es una estrategia de manejo que ha surgido para poder acompañar y sostener las grandes exigencias productivas a las que se somete al ganado. Los carbohidratos que ingresan al rumen son degradados rápidamente transformándose en AGV. En estas condiciones la comunidad microbiana se ve indefectiblemente influida. Así, un rápido descenso en el pH ruminal debido a la acumulación de AGV y de ácido láctico, provoca un aumento en las proporciones de *Streptococcus 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 de este ácido (Strobel y Russel, 1986). A su vez, la fracción celulolítica de la microbiota se ve afectada viéndose inhibida la degradación de los carbohidratos insolubles, como la celulosa, 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.

Entre las estrategias dirigidas a incrementar los rendimientos productivos en sistemas intensivos y semi-intensivos, la modulación de la fermentación ruminal ha sido un tema que ha captado el interés de productores y científicos.

## **2.5. Modulación de la fermentación ruminal, probióticos**

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 fin 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 (Krause et al., 2003; Chiquete et al., 2008). 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 problemas de salud pública vinculados a la emergencia de cepas bacterianas resistentes y generación de residuos en productos y subproductos de origen animal (Martin, 1988). 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 et al., 2002). En Europa, la eliminación total del uso de antibióticos como promotores del crecimiento está vigente desde enero del 2006 (Directive 1831/2003/CEE, European Commission 2003). Ante esta situación, se ha intensificado la investigación en la comprensión de la microbiota ruminal y la capacidad de modularla con productos que contengan prebióticos, microorganismos probióticos u otros métodos alternativos a los fármacos. Los prebióticos son, generalmente, hidratos de carbono que no son digeridos por el animal y que, selectivamente, inducen el desarrollo y metabolismo de un cierto grupo microbiano de interés. Para que un compuesto sea considerado prebiótico, esta inducción y su resultado deben ser beneficiosos para el animal que lo consume (Roberfroid, 2007).

Los productos probióticos disponibles en el mercado en general se basan en la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* viva o inactivada, bacterias del ácido láctico usadas tradicionalmente en animales

monogástricos, administración de fluido ruminal bajo diversas formas o incluso de inhibidores sintéticos de la alfa-amilasa bacteriana (DeFrain et al., 2005; Puniya et al 2015). El campo de la producción de probióticos para salud y producción animal aparece como de promisorio 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 (FAO, 2002). El uso de probióticos 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 (FAO, 2002). Miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* y *Propionibacterium* han sido utilizados como probióticos fundamentalmente en especies de animales monogástricos (Jan et al., 2002). En el ámbito académico existen diversos grupos de trabajo dedicados a investigaciones básicas y al desarrollo de probióticos, también llamados Direct Feed Microbials (DFM) para rumiantes con resultados variados (Montaño et al., 1999, Pinova et al., 2004, Fraga et al., 2014, Elghandour et al., 2015).

En la búsqueda de cepas con potencial probiótico, se examinan en general atributos que los puedan hacer adecuados para su utilización y a su vez pudieran estar relacionados con sus posibles mecanismos de acción. Entre las características buscadas hay algunas que son compartidas por un amplio rango de cepas probióticas, como la producción de ácidos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Otras propiedades son compartidas por determinados géneros microbianos y algunas son cepa-específicas. En

estos últimos grupos de propiedades o beneficios que pueden tener los probióticos, se pueden ubicar la producción de antagonistas específicos, bacteriocinas, la síntesis de vitaminas o la interacción con el sistema inmune o incluso con el sistema nervioso (Hill et al., 2014).

El modo de acción de los probióticos depende en general de la dosis, el momento y frecuencia de administración, y por supuesto de la o las cepas que se administren (Elghandour et al., 2015). En el caso particular de los rumiantes y, en la esfera gastrointestinal, existen al menos dos ambientes muy diferentes donde los probióticos podrían efectuar su función: el rumen y el resto del tracto intestinal (Puniya et al., 2015).

En el rumen, se propone que los probióticos podrían usarse para modificar la microbiota de modo de mejorar el aprovechamiento de la energía y del carbono (Calsamiglia et al., 2006). Esto puede ser logrado manipulando las comunidades microbianas de modo de favorecer y potenciar el consumo de fibra o almidón, promoviendo la producción de AGV y disminuyendo o amortiguando la acumulación de ácido láctico de modo de disminuir los descensos de pH que inhiben la fibrólisis (Calsamiglia et al., 2006). Sin embargo, si bien hay varios productos que hoy en día se usan como aditivos probióticos en rumiantes y muchos de ellos contienen bacterias del ácido láctico, los mecanismos de acción aún restan por ser demostrados. Según Puniya et al. (2015) lo más probable es que este tipo de probióticos formulados con bacterias del ácido láctico no ejerza su efecto benéfico en el rumen sino a nivel intestinal.

La prevención o el tratamiento de la acidosis bovina es un ejemplo de la utilización de microorganismos que actúan en el rumen. Uno de los

principales fundamentos que guían estas investigaciones es la modulación de biota bacteriana ruminal "a favor" de aquellas especies que utilizan el lactato cuya acumulación anormal es clave en el desarrollo de la acidosis (Piknova et al., 2004). En este marco, especies asociadas al rumen como *M. eldesnii*, *Propionibacterium* spp. y *Selenomonas ruminantium* han sido utilizadas con la finalidad de disminuir la concentración de ácido láctico en el rumen manteniendo así los niveles de pH (Elghandour et al., 2015). Entre estas especies, *M. eldesnii* es la más importante consumidora de ácido láctico y previene las caídas abruptas del pH cuando los animales son sometidos a dietas ricas en carbohidratos fácilmente degradables (Yang et al., 2004; Kung, 2006)

Existe también un creciente interés en administrar probióticos celulolíticos con el fin de optimizar la degradación de la fibra vegetal (Chiquette et al., 2007; Klieve et al., 2007; Fraga et al., 2014). El uso de cepas bacterianas ruminales con el fin de modular la microbiota ruminal presenta la ventaja de emplear microorganismos nativos que pueden presentar una buena capacidad de adaptación y permanencia en el órgano blanco, a diferencia de cepas exógenas (Vinderola et al., 2004). Incidiendo en el aprovechamiento de la energía, desviando potenciales de reducción hacia los AGV y no hacia la formación de metano sería posible también disminuir las emisiones de este gas (Calsamiglia et al., 2006).

El metano (CH<sub>4</sub>) es uno de los productos finales de la fermentación ruminal de la fibra. Es producido por las arqueobacterias metanogénicas a partir de dióxido de carbono y del hidrógeno molecular. Su formación desde el punto de vista de la microbiota y la fermentación ruminal es lo que permite que el

hidrógeno producido por la fermentación de la fibra no se acumule inhibiendo todo el proceso (McAllister y Newbold, 2008). Desde el punto de vista de la producción animal, es una pérdida energética y de carbono del sistema ruminal ya que el metano es eliminado en forma gaseosa perdiéndose en el ambiente. Además, el metano es el segundo gas en importancia en relación al efecto invernadero (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC, 2013) por lo que también existe una creciente preocupación acerca de la producción de metano y dióxido de carbono por los rumiantes (McAllister y Newbold, 2008; Mc Allister et al., 2015). La contribución del CH<sub>4</sub> al efecto invernadero a escala global es muy alta debido al mayor potencial de calentamiento que lo caracteriza. El IPCC ha definido el concepto de Potencial de Calentamiento Global (PCG) de diferentes gases, tomando como referencia al CO<sub>2</sub>. Se ha estimado que el CH<sub>4</sub> es 28 veces más efectivo que el CO<sub>2</sub> en retener energía calórica (IPCC, 2013). Se calcula que aproximadamente se producen entre 80 y 120 millones de toneladas de CH<sub>4</sub> por parte de los rumiantes domesticados representado aproximadamente el 15% de las emisiones de metano antropogénicas (Moss et al., 2000). Se estima que en Uruguay se emite como resultado de la ganadería 1 kg CH<sub>4</sub>/kg carne y 40 g CH<sub>4</sub>/L leche. Dado que estos procesos involucran intrincadas tramas microbianas es importante lograr la modulación de la microbiota ruminal de modo de minimizar la producción de CH<sub>4</sub>, optimizando además el proceso productivo, mejorando el rendimiento y evitando el efecto perjudicial en el ambiente (McAllister et al., 2015).

## 2.6. Estrategia del presente trabajo

En este trabajo se identificó, en primer lugar, un grupo de cepas bacterianas que habían sido aisladas de un medio con celulosa como principal fuente de carbono y energía. La mayor parte de este grupo de bacterias es potencialmente fibrolítico dada la estrategia de aislamiento utilizada (Fraga, 2010).

En segundo lugar y como estrategia para caracterizar el potencial de las cepas en modular la microbiota y la fermentación ruminal se utilizó una aproximación *in vitro*. Se realizaron experimentos que tuvieron como base la metodología de medición de gas acumulado *in vitro*, metodología que originariamente se desarrolló para el estudio y la predicción de la fermentación de alimentos para rumiantes (Rymer et al., 2005). Estos ensayos permiten simular diferentes situaciones productivas o metabólicas o, como en este trabajo, la utilización de potenciales probióticos de forma segura y de bajo costo comparado con abordajes *in vivo*. Se utilizaron siete cepas ruminales nativas y se evaluó la modulación de la fermentación ruminal y la composición de la microbiota ruminal.

Por último, basados en los resultados de los ensayos *in vitro*, se eligió la cepa Pr 50C para evaluar el potencial modulador de la fermentación ruminal en un ensayo de administración. Esta cepa pertenecía a la colección de bacterias con potencial fibrolítico (Fraga, 2010). También se empleó una cepa de *Prevotella bryantii* cuyo potencial en consumir ácido láctico fue estudiado en un trabajo anterior (Perelmuter, 2010). Se utilizaron ovinos como modelo de animales rumiantes dado que su manutención es más

simple y económica que la de grandes rumiantes como los bovinos. Para evaluar la modulación de la microbiota y de la fermentación ruminal se registraron parámetros del ambiente ruminal (pH, AGV, nitrógeno amoniacal) y se analizó la composición de la microbiota ruminal por pirosecuenciación.

### **3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

La microbiota ruminal está adaptada a la anatomía y la fisiología ruminal y es una fuente de microorganismos con el potencial de ser utilizados para modular la fermentación.

#### **3.1. Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el potencial de cepas ruminales nativas para modular la estructura de la microbiota y la fermentación ruminal.

#### **3.2. Objetivos particulares**

Avanzar en la identificación de cepas ruminales nativas con potencial fibrolítico aisladas previamente en un medio de cultivo cuya principal fuente de carbono y energía era celulosa microcristalina.

Evaluar el potencial modulador de la fermentación de un grupo de cepas nativas en un sistema *in vitro*.

Evaluar el efecto de la administración de dos cepas nativas sobre el ambiente y la fermentación ruminal en un modelo experimental *in vivo*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Identificación bacteriana

La identificación de cepas bacterianas se realizó mediante la amplificación, secuenciación y análisis del gen que codifica para el ARNr 16S. Para ello se extrajo el ADN genómico empleando el sistema comercial GeneElute bacterial genomic DNA extraction kit (Sigma, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN así obtenido se empleó en reacciones de PCR para amplificar un fragmento del ADNr 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 et al. (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* y se compararon con la base de datos del *Ribosomal Data Base Project* (RDP) utilizando la herramienta *Classifier* (Wang et al., 2007). Esta herramienta permite 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 et al., 2011) Para la construcción

de los árboles se utilizaron las secuencias generadas en este trabajo y secuencias de las bases de datos del RDP.

#### **4.2. Cepas bacterianas utilizadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo***

En los ensayos *in vitro* (Numeral 6., Sección 2) se utilizaron las cepas *Butyrivibrio hungatei* 63C, *Butyrivibrio hungatei* 79C, *Butyrivibrio hungatei* 58C, *Pseudobutyrvibrio ruminis* 50C, *Pseudobutyrvibrio ruminis* 55C y dos cepas de la familia *Lachnospiraceae* sin clasificar, 21C y 56C. Todas estas cepas fueron aisladas previamente del contenido ruminal de un bovino hembra con cánula permanente en rumen y que se encontraba a pastoreo exclusivo (Fraga et al., 2013).

En los ensayos de administración del potencial probiótico (Numerales 7. y 8., Secciones 3 y 4, respectivamente) se utilizaron las cepas *P. ruminis* 50C (Pr 50C) y *Prevotella bryantii* 3C5 (Pb 3C5; Perelmuter, 2010).

### 4.3. Medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivos y todas las manipulaciones de las cepas bacterianas se realizaron en estrictas condiciones de anaerobiosis (Hungate, 1950). Brevemente, los medios de cultivo, las soluciones tampón y demás soluciones destinadas a su utilización en el cultivo o manipulación de microorganismos ruminales se prepararon con agua destilada hervida durante 10 minutos y luego enfriada bajo corriente de CO<sub>2</sub>. Todos los contenedores utilizados (viales, botellas, frascos) fueron gaseadas con CO<sub>2</sub> 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 Na<sub>2</sub>S-Cys 0,25 g/L.

Para el cultivo rutinario y el mantenimiento de las cepas bacterianas se utilizó un medio de cultivo que tuvo como base la composición del propuesto por Stahl et al. (1998) con modificaciones (Fraga et al., 2014). Este medio de cultivo (MB) fue utilizado en trabajos previos como base para diseñar estrategias de recuento y aislamiento de bacterias celulolíticas y consumidoras de ácido láctico (Fraga 2010; Fraga et al., 2014; Perelmuter 2010). La composición por litro del medio MB fue: 166 ml de solución de sales A (composición en g/l) NaCl, 5,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,159; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,12; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,06; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,06; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,4; Macy y col. 1982); 166 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 g/l, 200 ml de fluido ruminal clarificado, 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,  $8,6 \times 10^{-1}$  mM, n-valérico,  $1,8 \times 10^{-1}$  mM; isovalérico,  $1,8 \times 10^{-1}$  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,  $5 \times 10^{-3}$ ), 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), resazurina 1 mg,  $\text{Na}_2\text{S-Cys}$  0,25 g/l, el pH fue ajustado a 6,5 con  $\text{NaHCO}_3$ , cuando se requirió medio sólido se adicionó agar bacteriológico, 1.5 %. El fluido ruminal clarificado que se adicionó al MB se preparó a partir de fluido ruminal fresco que fue filtrado por un paño de quesería, luego se centrifugó por 10 min a  $1000 \times g$  y el sobrenadante resultante fue nuevamente centrifugado durante 20 min a  $25000 \times g$  (Grubb y Dehority, 1976). La incubación de las cepas bacterianas se realizó a  $39^\circ\text{C}$ , por 24 a 48 h.

Para el cultivo de las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos de administración del probiótico (Numerales 7. y 8., Secciones 3 y 4 respectivamente) se utilizó un caldo de cultivo que no contenía fluido ruminal, el caldo *Medium 10* de Caldwell y Bryant (1966). La composición porcentual (m/v) de este medio fue: glucosa, celobiosa y almidón soluble, 0,05 cada uno; solución de minerales (v/v), 3,75;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ , 0,025, cisteína-HCl, 0,025, resazurina, 0,0001;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,4; tripticasa, 0,2, extracto de levadura, 0,05; mezcla de ácidos grasos volátiles (v/v), 0,31; hemina, 0,0001. Las soluciones de minerales y la mezcla de AGV fueron las mismas que para el medio MB.

#### 4.4. Animales

Los animales utilizados en este trabajo, tanto bovinos como ovinos, se alojaron en las instalaciones de Campo Experimental Nº 2 de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Libertad, San José, Uruguay.

Como donante de fluido ruminal fresco para la preparación de medios de cultivo y en los ensayos de producción de gas *in vitro* (Sección 2) se utilizó un bovino hembra Holstein (560 kg de peso vivo) que estaba en las condiciones alimenticias del tambo. El animal tenía una cánula permanente en el saco dorsal de rumen (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY).

En los ensayos de administración de probióticos (Secciones 3 y 4) se utilizaron ovinos Corriedale, machos, fistulados, de aproximadamente 11 meses de edad. Los animales se alojaron en jaulas metabólicas individuales.

El cuidado de los animales y la implantación de cánulas y fístulas ruminales 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, docentes de Facultad de Veterinaria.

#### 4.5. Ensayo de producción de gas *in vitro*

Durante la fermentación se produce una mezcla gaseosa compuesta principalmente por metano, hidrógeno y dióxido de carbono. Con el fin de evaluar el potencial de las cepas nativas para modular la fermentación ruminal se realizó un ensayo de producción de gas *in vitro* midiendo la acumulación de la mezcla gaseosa según la metodología planteada por Theodorou et al. (1994) con las modificaciones de Mauricio et al. (1999) y Fraga et al. (2014). Los experimentos se realizaron en frascos de 125 mL que contenían un sustrato, una solución salina tamponadora que simulaba la saliva de los rumiantes, fluido ruminal fresco y una solución reductora. El sustrato (0,5 g) consistió de una mezcla, molida y pasada por una criba de 1 mm, de fardo de alfalfa y maíz en una relación 70:30. El sustrato se hidrató en la solución salina (38 mL) adicionado con 2 mL de solución reductora por 18 h a 4 °C. La composición de estas soluciones fue la descrita por Oeztuerk et al. (2005). La solución salina tamponadora se componía de KCl 0,21 M NaCl 0,27 M, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,036 M, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,053 M, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,033 mM, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,019 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,048 mM, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,039 mM, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,055 mM, SeO<sub>2</sub> 0,12 mM, NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,28 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,3 mM, NaVO<sub>3</sub> 0,068 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,06 mM, hemina 0,04 mM y 2 mL de una solución de bicarbonato de sodio 0,77 M por cada litro de solución. La solución reductora consistió de Na<sub>2</sub>S, 0,085 M.

Una vez transcurrido el tiempo de hidratación del sustrato los fermentadores se termostataron a 39 °C y luego se les agregó 10 mL de fluido ruminal fresco y gaseado con CO<sub>2</sub>. El *headspace* se saturó con una

corriente de CO<sub>2</sub> y los fermentadores se cerraron con tapones de goma y se sellaron con precintos de aluminio.

A partir de cultivos frescos crecidos a 39 °C por 24 h de las cepas a ensayar, se prepararon suspensiones en PBS estéril, en condiciones anaerobias y se evaluó la cantidad de células por mililitro por conteo microscópico directo. Estas suspensiones se utilizaron para inocular los fermentadores sellados de modo de obtener un nivel final de 10<sup>6</sup> células/mL. Las inoculaciones se realizaron utilizando jeringas y agujas previamente tratadas con una solución estéril de Na<sub>2</sub>S-Cys 0,25 g/L para mantener las condiciones de anaerobiosis. Los controles contenían todos los componentes antes descritos pero no fueron inoculados con las cepas potencialmente probióticas. Para cada cepa y para el control sin inocular se prepararon 3 series de fermentadores con triplicado, 9 fermentadores por condición. Además se prepararon blancos experimentales que contenían sustrato pero no contenían fluido ruminal ni bacterias agregadas. Todos los fermentadores se mantuvieron en baño de agua a 39 °C. Para determinar la producción de gas se midió la presión interna de los fermentadores y antes de cada medición los mismos fueron agitados. La presión interna se midió con un manómetro D1005PS (Ashcroft®, Stratford, USA) y aguja hipodérmica de 0.6 mm en los tiempos 2, 4, 8, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Luego de realizadas las medidas se liberó la presión interna por medio de una aguja de 0,6 mm; los fermentadores se agitaron y se mantuvieron en el baño hasta la siguiente medición.

Dos de las series de fermentadores se prepararon para abrirlos luego de 4 y 8 h de incubación, la serie restante se mantuvo durante todo el tiempo

experimental y los fermentadores fueron abiertos a las 96 h (final del experimento). En las diferentes aperturas se registró el pH con un pHmetro Oakton. En todas las aperturas (4, 8 y 96 h) se tomaron muestras del contenido de los fermentadores y se mezclaron con ácido perclórico 0,1 M en una relación 1:1 para hacer la determinación de AGV y ácido láctico por HPLC (Fraga et al., 2014). Una vez que se tomaron todas las muestras el contenido de los fermentadores abiertos se almacenó a -20°C para realizar extracción del ADN total de la comunidad microbiana para realizar los análisis de microbiota total y para cuantificar los microorganismos metanógenos por PCR en tiempo real.

#### **4.6. Análisis de gas acumulado, modelización matemática**

La presión de gas, expresada en psi (P), registrada en los fermentadores se convirtió a volumen de gas (V) mediante la ecuación de predicción obtenida en un experimento previo:  $V = 4,40 P + 0,09 P^2$  (Fraga et al., 2014).

Al volumen de gas producido en cada fermentador a un tiempo dado se le restó el producido por el promedio de los blancos a ese tiempo. 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:  $V = \frac{V_1}{1+e^{2+4k_1(L-T)}} + \frac{V_2}{1+e^{2+4k_2(L-T)}}$ , donde  $V_1$  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),  $K_1$  es la tasa de producción de gas de la fracción rápida expresado en  $h^{-1}$ ,  $V_2$ : volumen de gas producido durante la degradación de la fracción de lenta degradación (mL/g),  $K_2$  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 ( $V_t$ ) como la suma de  $V_1$  y  $V_2$ .

#### **4.7. Perfil de ácidos carboxílicos de los ensayos *in vitro***

Con el fin de evaluar el efecto de la inoculación de las cepas sobre la concentración de los ácidos carboxílicos láctico, acético, butírico y propiónico (AGV) de los fermentadores *in vitro* se analizaron éstos por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Para esto las muestras conservadas en ácido perclórico 0,1 M (numeral 4.5) correspondientes a las 4, 8 y 96 horas de incubación a lo largo del ensayo, se centrifugaron por 15 minutos a 15000 rpm y a 5 °C y luego se inyectaron 100  $\mu$ L de cada sobrenadante a una columna de 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  $\mu$ m 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 2 a 90% de acetonitrilo y  $H_3PO_4$

0,5 %, pH 2. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. Se determinaron los tiempos de retención de los ácidos láctico y acético, propiónico y butírico 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, Fraga et al., 2014).

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

#### **4.8 Determinación de la concentración de metano por cromatografía gaseosa**

La concentración de metano en los fermentadores del ensayo *in vitro* (numeral 4.5) se determinó a las 4, 8 y 96 h de incubación. Las muestras de gas se obtuvieron utilizando un dispositivo que consistía de una llave de 3 vías que en una de las salidas tenía acoplada una aguja hipodérmica (para penetrar el tapón del fermentador), en otra salida una jeringa para medir el volumen de gas a ser inyectado en un tubo Vacutainer® de 10 mL que estaba conectado a la tercera salida. La concentración de metano se determinó en un cromatógrafo de gases SRI 8610, (SRI Instruments®)

usando Argón como el gas *carrier* y un detector de conductividad térmica. Estos procedimientos se realizaron como un servicio de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Química.

#### **4.9. Extracción de ADN metagenómico**

Con el fin de realizar los análisis de las comunidades bacterianas presentes en los fermentadores y para cuantificar los microorganismos metanógenos se realizó la extracción del ADN genómico total de la comunidad microbiana. Para ello se utilizaron 10 g del contenido total de cada fermentador (almacenados a -20°C) y se utilizó el método de extracción de ADN con SDS y CTAB de Zhou et al. (1996). Se determinó la absorbancia a 260 nm de las soluciones de ADN en un NanoDrop (Thermo) y se registró la cantidad de ADN obtenido, las soluciones se mantuvieron a -20 °C hasta su utilización.

#### **4.10. Cuantificación de microorganismos metanógenos por PCR en tiempo real**

La detección y cuantificación de microorganismos potencialmente productores de metano se realizó por medio de la amplificación cuantitativa del gen que codifica para la coenzima metil-M-reductasa (*mrcA*). Para ello se utilizaron los cebadores qmrcA-F y qmrcA-R (Denmam et al., 2007). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad CFX 96 usando el kit SensiMix SYBR No-ROX (Bioline). Las condiciones de reacción fueron las descritas por Denman et al. (2007): 50 °C por 2 min; una desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min; 40 ciclos de 95 °C, 15 s y 60 °C por 60 s para el *annealing* de los cebadores y elongación del producto de PCR. Se realizaron curvas estándar para evaluar la eficiencia y para cuantificar posteriormente a los amplicones. Como molde estándar se utilizó un fragmento del gen *mrcA* de 474 pb inserto en un pGEM®-T Easy Vector (Promega). Todas las muestras se amplificaron en triplicado utilizando como molde 20 ng del ADN metagnómico extraído de los fermentadores. Como control negativo usó agua bidestilada estéril sin ningún agregado de ADN.

#### 4.11. Caracterización de las comunidades bacterianas: secuenciación masiva

Para analizar la comunidad bacteriana presente en los fermentadores (numeral 6) y en el fluido ruminal de los animales (numerales 7 y 8) se empleó un procedimiento basado en secuenciación masiva. Para ello se realizó una amplificación inicial de la región V1-V2 del gen que codifica para el ARNr 16S utilizando el ADN metagenómico extraído de los fermentadores. Los *Master mixes* para estas reacciones se prepararon con el kit Qiagen Hostart Hi-Fidelity Polymerase (Qiagen, Valencia CA), el cebador *forward* se compuso del "*Roche Titanium Fusion Primer A*" (5'-CATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3'), una secuencia de 10 pb identificadora y única para cada muestra (MID, por su nombre en inglés *Multiplex Identifier*, Roche, Indianápolis, IN) y el cebador universal bacteriano 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Edwards et al., 1989). El cebador reverso se compuso del "*Roche Titanium Fusion Primer B*" (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG -3'), la misma secuencia MID de 10 pb, y el cebador reverso 338R (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', Fierer et al., 2008) abarcando así la región hipervariable V1-V2 del 16S bacteriano. Las reacciones para cada muestra incluyeron un paso de desnaturalización inicial, 94 °C, 5 min seguido de 35 ciclos de 94 °C, 45 s (desnaturalización); 50 °C, 30 s (*annealing*); 72 °C, 1,5 min (extensión); finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos de la amplificación de cada muestra se purificaron de forma individual usando el *Oiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Valencia CA) (E-Gel Electrophoresis System (Life

Technologies, Invitrogen Division), y se normalizaron para hacer una muestra compuesta. Los amplicones del ADNr 16S de la muestra compuesta se secuenciaron en un secuenciador *Roche 454 Genome Sequencer FLX Titanium* (Microbiome Core Facility, Chapel Hill NC), empleándose los reactivos de secuenciación *GS FLX Titanium XLR70* así como sus protocolos. El análisis inicial de los datos y el *base calling* de cada secuencia generada fue realizado por el *Research Computing de University of North Carolina* en Chapel Hill (Chapel Hill, NC).

Las secuencias del ADNr 16S generadas por pirosecuenciación se analizaron utilizando el paquete *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME, versión 1.8.0, Caporaso et al., 2010). Las secuencias se asignaron a las diferentes muestras según su secuencia MID, se les eliminó la secuencia de los cebadores y la MID (proceso de *trimming*) y se filtraron por calidad ( $\geq 25$ ), longitud ( $\geq 150$  pb) y por el contenido de una base ambigua o por contener homopolímeros largos ( $>6$ ).

Luego, se generaron las OTUs (del inglés: *Operational taxonomic units*) alineándolas con la base de datos *GreenGenes* (DeSantis et al., 2006), utilizando la herramienta PyNAST (Caporaso et al., 2010) y se generaron clusters al 97 % de identidad utilizando el algoritmo UCLUST (Edgar, 2010). La asignación taxonómica de las OTUs se realizó con la herramienta *BlastN* (Altschul et al., 1990)

Los índices de diversidad alfa se generaron con la plataforma QIIME y con el programa *Past* (Hammer et al., 2001)

#### 4.12. Ensayo de administración de probióticos

Se evaluó el efecto de la administración, separadamente, de cepas probióticas nativas en rumiantes bajo condiciones de producción semi-intensiva. Las cepas administradas fueron *P. ruminis* 50C (Pr 50C; Fraga et al., 2014) y una cepa de *P. bryantii*, Pb 3C5 (Perelmuter, 2010). La cepa Pr 50C fue elegida en base a su buena capacidad de crecimiento, porque en ensayos previos mostró la capacidad de modular la fermentación *in vitro* aumentando la concentración de AGV y particularmente de ácido butírico, sin modificar el volumen de gas producido. (Fraga et al., 2014). La cepa de *P. bryantii* se eligió para este ensayo porque, en trabajos previos, mostró la capacidad de crecer con ácido láctico como principal fuente de energía y modificó favorablemente el número de grupos bacterianos en ensayos *in vitro* (Perelmuter, 2010).

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, UdelaR (Libertad) bajo la supervisión de profesionales del área. Se utilizaron 15 corderos Corriedale, machos peso promedio  $34 \pm 4$  kg, de entre 10 y 12 meses de edad. Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos de 5 animales cada uno: Control, Pr 50C y Pb 3C5. Los animales se alojaron en jaulas metabólicas durante todo el experimento.

La dieta base consistió de fardo de alfalfa *ad libitum* (primera oferta diaria 8 AM) y maíz partido (1 % del peso metabólico) que se administraba dos veces al día (10 AM y 4 PM). Con este régimen se buscó simular condiciones

de producción de rumiantes en condiciones de semi-intensividad. Los animales tuvieron acceso libre a agua.

Cada 48 h los corderos en los grupos Pr50C y Pb 3C5 recibieron una dosis intraruminal de  $1 \times 10^9$  células de la cepa Pr 50C o Pb 3C5 respectivamente. El grupo control recibió el vehículo estéril (Chiquette et al., 2007).

Luego de 16 días de adaptación a la dieta y a las condiciones experimentales comenzó el periodo de toma de muestras.

Desde el día 17 se registró el consumo de alimento y ese día se tomaron muestras para realizar el ensayo de potencia del inóculo. Durante los días 19 y 20 se tomaron las muestras necesarias para analizar la evolución de pH, amoníaco y AGV durante un periodo de 24 h. También se tomaron muestras para analizar la estructura de las comunidades microbianas de los animales a las 8 h luego de la primera comida diaria. Desde el día 22 al día 26, final del experimento, se tomaron muestras para analizar la digestibilidad del alimento. En los siguientes apartados se detallan las mediciones realizadas asociadas a estos experimentos.

#### *4.12.1. Evaluación de la actividad del inóculo*

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de las cepas nativas sobre el potencial fermentador del fluido ruminal de los animales se realizó un ensayo en fermentadores *in vitro* como el descrito en el numeral 4.5. El

sustrato utilizado, las soluciones y condiciones fueron las mismas, pero los donantes de fluido ruminal fueron los animales en los diferentes tratamientos. El día 17 del ensayo se extrajo fluido ruminal de todos los animales y se incubaron por triplicado como se explicó en 4.5. Para cada animal se incubaron 3 fermentadores que no contenían sustrato para restar la producción de gas debido a los sustratos que estaban presentes en el fluido ruminal donante. La presión interna de los fermentadores se midió con un manómetro D1005PS (Ashcroft®, Stratford, USA) y aguja hipodérmica de 0,6 mm en los tiempos 2, 4, 8, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Luego de realizadas las medidas se liberó la presión interna por medio de una aguja de 0,6 mm, luego, los fermentadores se agitaron y se mantuvieron en el baño hasta la siguiente medición. Se tomaron muestras del gas generado (ver numeral 4.8) para determinar la concentración de metano.

Los datos de gas generados se ajustaron al modelo matemático de Schofield et al. (1994) como se explicó en el numeral 4.6.

#### *4.12.2. Ambiente ruminal*

El día 19 del ensayo de administración se tomaron muestras de fluido ruminal cada 2 horas hasta cubrir las doce horas y luego cada cuatro horas hasta completar las 24 horas con el fin de evaluar la evolución del pH

ruminal, la concentración de AGV y de nitrógeno amoniacal en el rumen de los animales en los distintos tratamientos.

Para analizar AGV las muestras se conservaron con ácido perclórico 0,1 M en relación 1:1. Las muestras para analizar nitrógeno amoniacal se conservaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 % (v/v), en relación 1:100. Todas las muestras se almacenaron inmediatamente a -20 °C hasta su procesamiento.

#### *4.12.3. Cuantificación de AGV*

Para evaluar el efecto de la administración de las cepas nativas sobre la evolución diaria de los AGV y del ácido láctico éstos se analizaron por HPLC. Para ello las muestras conservadas en ácido perclórico 0,1 M se centrifugaron durante 15 min a 15000 rpm y a 5 °C y luego se inyectaron 100 µL de cada sobrenadante en una columna de 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 de fase entrecruzada de estireno-divinilbenceno sulfonado Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8 %, 300\*7,8 mm). La fase móvil, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,015M, fue inyectada con un flujo de 0,3 mL/min en modo isocrático. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Se determinaron los tiempos de retención de los ácidos láctico, acético, butírico y propiónico por medio de la inyección de estándares (0,5 µg/mL) que también se usaron como referencia para calcular las concentraciones de

estos ácidos en las muestras. Los picos de interés en los cromatogramas se integraron a 210 nm (Parrott et al., 2001, Fraga et al., 2014).

#### *4.12.4. Nitrógeno amoniacal*

El amoniaco es considerado la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana en el rumen. La concentración de nitrógeno amoniacal fue determinada utilizando un electrodo selectivo para iones amonio (Thermo Scientific Orion) según las indicaciones del fabricante.

#### *4.12.5. Consumo y digestibilidad*

El consumo de forraje, así como la digestibilidad aparente de la materia seca de la dieta fueron individualmente medidos diariamente durante 5 días, respectivamente (desde el día 22). El consumo de materia seca fue calculado como la diferencia entre oferta y rechazo. Se preparó una muestra compuesta de heces por individuo mezclando las heces eliminadas, en forma proporcional a la cantidad total excretada diariamente. Los coeficientes de digestibilidad fueron calculados, para cada fracción del alimento como:

$(\text{cantidad ingerida (g)} - \text{cantidad eliminada(g)}) / \text{cantidad ingerida (g)}$

#### *4.12.6. Análisis químicos*

El contenido en materia seca de la oferta de alimento y de las heces se analizó según AOAC (Official Methods of Analysis, AOAC International, 1990).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

#### **4.13. Análisis estadísticos**

Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico del SAS (version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA).

El ajuste de los datos de volumen de gas al modelo propuesto por Schofield et al. (1994) se realizó por regresión no lineal, empleando el procedimiento NLIN.

Los valores de AGV, metano, NH<sub>3</sub> en las secciones 3 y 4 se analizaron como medidas repetidas en el tiempo sobre cada animal, mediante el procedimiento MIXED del SAS (version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA).

Las variables de los animales tratados se compararon con los del control aplicando el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + (S*T)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde  $Y_{ijk}$  es la variable (AGV, NH<sub>3</sub> o metano),  $\mu$  es la media (*overall mean*),  $S_i$  es el efecto del tratamiento ( $i = \text{Control, Pr 50C, Pb 3C5}$ ) medidos en  $k$  réplicas (5 animales),  $T_j$  es el efecto fijo del tiempo ( $j =$  depende de las variables medidas),  $(S*T)_{ij}$  es la interacción tratamiento\*tiempo y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error residual.

En los casos en que se compararon variables que no dependían del tiempo se usó el modelo:

$$Y_{ik} = \mu + S_i + \varepsilon_{ik}$$

Dónde  $Y_{ik}$  es la variable,  $\mu$  es la media (*overall mean*),  $S_i$  es el efecto del tratamiento ( $i = \text{Control, Pr 50C, Pb 3C5}$ ) medido en  $k$  réplicas (5 animales) y  $\varepsilon_{ik}$  es el error residual.

Las medias entre los tratamientos se separaron usando el test de Dunnet como análisis *post hoc*. Las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$  y se consideró que hubo tendencias cuando  $0,05 < P < 0,10$ .

## 5. SECCIÓN 1. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS RUMINALES NATIVAS

### 5.1. 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 al digerir el material fibroso. Para entender mejor las relaciones microbianas y los procesos metabólicos en el rumen es necesario describir y comprender la diversidad de la comunidad así como la influencia de diferentes factores del hospedero y de la dieta en su composición (Larue et al., 2005).

Se estima que la comunidad microbiana ruminal comprende varios cientos o incluso miles de especies bacterianas. La mayoría de éstas 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 et al., 2001).

Sólo una fracción de la comunidad bacteriana de la mayor parte de los sistemas microbianos es cultivable. En el caso del rumen se calcula 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 masiva del gen que

codifica para el ARNr 16S, PCR cuantitativo y *Fluorescent in situ hybridisation* (FISH) entre otras.

En esta sección se describe la identificación de aislamientos ruminales que provienen del trabajo de Fraga (2010) y fueron realizados en un medio que como principal fuente de carbono y energía contenía celulosa microcristalina. Con esa aproximación se buscaba seleccionar bacterias que estuvieran relacionadas con la función fibrolítica. La identificación se realizó por medio del análisis del ADNr 16S de los aislamientos.

## **5.2. Resultados**

### *5.2.1. Identificación de los aislamientos*

Se identificaron 16 aislamientos de bacterias recuperadas en un medio con celulosa microcristalina como principal fuente de carbono y energía. La filogenia de estos organismos basada en la secuencia del gen ADNr 16S se presenta en la Figura 5.2.1. Para la construcción del árbol ML se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias relacionadas con las

de los aislamientos que fueron descargadas de la base de datos *GeneBank*

de la NCBI. En la tabla 5.2.1. se presenta la identidad sugerida por la comparación con la base de datos mencionada.

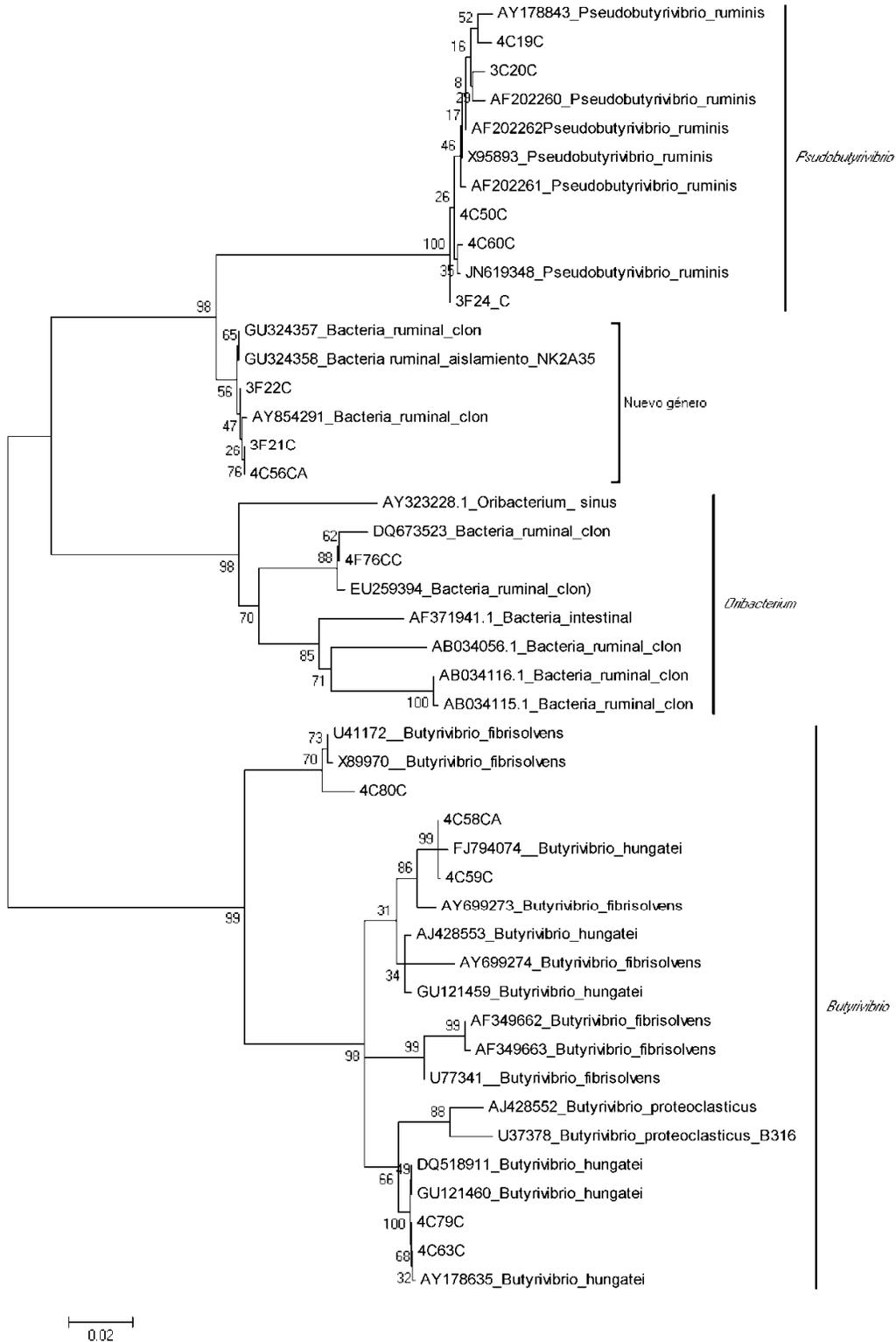
Luego de analizadas las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S se pudo determinar que los aislamientos 3F24C, 4C50C, 4C60C, 4C19C y 4C20C presentaron afiliación con el género *Pseudobutyrvibrio* mientras que cinco aislamientos fueron afiliados al género *Butyrvibrio* (4C80C, 4C63C, 4C79C, 4C58C y 4C59C). El aislamiento 4C53C perteneció al género *Selenomonas* y el aislamiento 4C52C se afilió al género *Succinivibrio*. Cuatro aislamientos correspondieron a la familia *Lachnospiraceae*, 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 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 aparecieron muy distantes evolutivamente con respecto al resto y no se incluyeron en el árbol filogenético, el aislamiento 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*.

**Tabla 5.2.1.** Identidad deducida al comparar las secuencias obtenidas con la base de datos del *GenBank*

Cepa	Identidad		% de similitud	Número de acceso*
3F21C	<i>Lachnospiraceae</i> no descrito		99	GU324409.1
3F22C	<i>Lachnospiraceae</i> no descrito		99	GU324409.1
3C56C	<i>Lachnospiraceae</i> no descrito		99	GU324409.1
4C58C	<i>Butyrivibrio hungatei</i>		99	FJ794074.1
4C59C	<i>Butyrivibrio hungatei</i>		99	FJ794074.1
4C63C	<i>Butyrivibrio hungatei</i>		99	AY178635.1
4C79CA	<i>Butyrivibrio hungatei</i>		99	AY178635.1
4C80C	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>		99	EU346756.1
3F24C	<i>Pseudobutyrvibrio. ruminis</i>		99	JQ316655.1
4C50C	<i>Pseudobutyrvibrio. ruminis</i>		99	NR_026315.1
4C60C	<i>Pseudobutyrvibrio. ruminis</i>		99	NR_026315.1
4C19C	<i>P. ruminis</i>		99	NR_026315.1
3C20C	<i>P.ruminis</i>		99	NR_026315.1
4F76C	<i>Oribacterium sp.</i>		99	EU259394.1
4C53C	<i>S. ruminantium</i>			AB558164.1
4C68C	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>		99	AB849335.1

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



**Fig. 5.2.1. 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.

### 5.3. 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 et al., 2006).

En este capítulo se identificaron microorganismos semejantes a *Butyrivibrio* ("*Butyrivibrio*-like organisms") que pueden llegar a representar del 24 al 30 % de las bacterias cultivables del rumen (Forster et al., 1996), incluyendo representantes de las especies *B. fibrisolvens*, *P. ruminis*, y *B. 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 se describieron consorcios naturales y artificiales que se formaban junto a *F. succinogenes* que incluían entre otras a *P. ruminis* y *B. fibrisolvens* (Shinkai et al., 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 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 incluidos en otro género (van Gylswyk et al., 1996; Fig. 5.2.1).

*Succinivibrio dextrinosolvens* es una bacteria ruminal descrita en el ganado ovino y bovino. Es Gram negativa, funcionalmente desempeña el rol de digerir el almidón y filogenéticamente pertenece a la subdivisión  $\gamma$  de las proteobacterias (Hippe et al., 1999). En este trabajo, el aislamiento 4C52C se clasificó como perteneciente a esta especie. El aislamiento 4C53C se clasificó como perteneciente a la especie *S. ruminantium*. Estos dos últimos aislamientos no son microorganismos asociados a las fibrólisis. La especie *S. ruminantium*, como se mencionó anteriormente, es una de las especies cultivables más abundantes del rumen. Los miembros del género se han sugerido entre los más prominentes y más metabólicamente diversos del rumen, y junto con *M. eldesnii* y con *Propionibacterium* spp., se los asocia con el consumo de ácido láctico (Ricke y Schaefer, 1996, Elghandour et al., 2015).

Cuatro aislamientos no presentaron homología con secuencias de especies bacterianas depositadas en los bancos de datos y podrían representar nuevas especies e incluso géneros. Las secuencias del ADNr 16S de 3F21C, 3F22C, 4C56C son muy similares entre sí y se incluyeron en la familia *Lachnospiraceae* del Orden *Clostridiales* (Clase *Clostridia* del Filo *Firmicutes*); organismos similares ya han sido aislados pero aún no han sido clasificados taxonómicamente (Kenters et al., 2011). En esta familia de microorganismos se encuentran géneros de microorganismos importantes en la microbiota ruminal como *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* (Fig.5.2.1). Por último, el aislamiento 4C76CC también fue clasificado como representante de la familia *Lachnospiraceae* y es un representante del género *Oribacterium* que actualmente consta de una sola especie reconocida, incluida en el análisis filogenético (Carlier et al., 2004) y con dos especies recientemente aisladas de la cavidad oral humana que comparten menos del 98 % de similitud en la secuencia del ADNr 16S con 4C76CC (Sizova et al., 2014).

Todos los aislamientos presentaron homología con especies, géneros o familias pertenecientes al ambiente ruminal y la mayor parte de ellos están relacionados con la función fibrolítica ruminal, bien por ser especies fibrolíticas o por formar parte de los consorcios microbianos fibrolíticos. Esto es explicable y coherente ya que estos organismos fueron aislados en un medio cuya fuente principal de carbono y energía era celulosa (Fraga et al., 2014). Siete de estas cepas bacterianas fueron utilizadas en un ensayo *in vitro* para evaluar su capacidad de modular la fermentación ruminal (Numeral 5, sección 2). Una de estas cepas se eligió para ser administrada

en el ensayo de administración de potenciales probióticos (Numeral 6, sección 3).

## **6. SECCIÓN 2: EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS RUMINALES NATIVAS**

### **6.1. Introducción**

En los sistemas de producción actuales, en particular intensivos y semi-intensivos, se pueden producir desbalances en el delicado equilibrio entre la microbiota ruminal y el hospedero. Por esto, la fermentación de la fibra y, consecuentemente, los resultados productivos pueden verse alterados. Para sobrellevar estos problemas la modulación de la fermentación ruminal ha captado el interés de criadores de ganado lechero y cárnico, nutricionistas y técnicos veterinarios. Tradicionalmente esta modulación se conseguía utilizando compuestos como los antibióticos o los ionóferos como aditivos a la dieta buscando disminuir la producción de metano o para evitar la acidosis ruminal (Nagaraja et al., 1982; Mutsvangwa et al., 2002).

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 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 AGV particularmente láctico, provoca un aumento en las proporciones de *Streptococcus 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.

El empleo de abordajes *in vitro* permite 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 abordajes que involucren ensayos *in vivo*. De este modo, se estudió el efecto de la adición de una cepa de *M. eldesnii* 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)

En esta sección se evalúa el potencial modulador de la fermentación de un conjunto de siete cepas bacterianas nativas de rumen. El sustrato utilizado en estos experimentos fue similar a la alimentación que se iba a administrar a los animales del numeral 5, sección 3. El objetivo de este abordaje fue evaluar la modulación de la fermentación ruminal *in vitro* por medio del

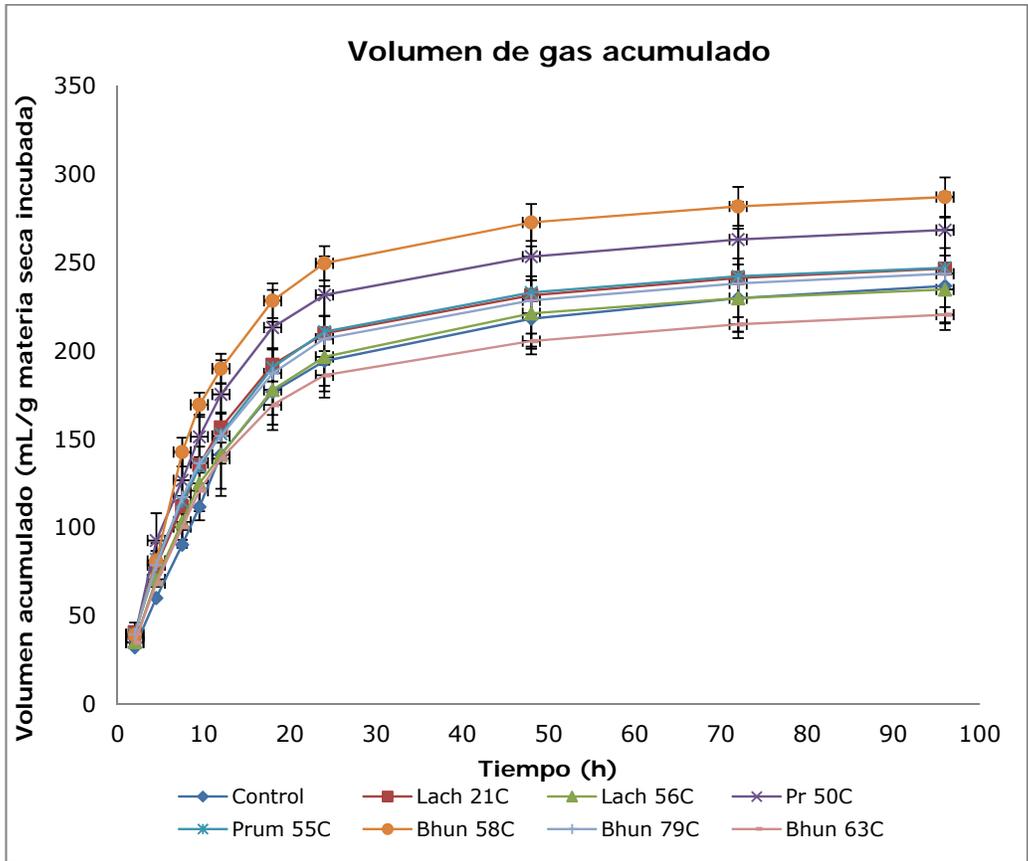
análisis de los AGV producidos, la dinámica de producción de gas y la estructura de la microbiota para seleccionar una cepa moduladora para ser administrada en el ensayo *in vivo* (Numeral 5).

## 6.2. Resultados

### 6.2.1. Dinámica de la fermentación ruminal

La evolución del volumen de gas acumulado en los fermentadores se muestra en la Fig. 6.2.1. Estos datos fueron ajustados de acuerdo a un modelo matemático para describir la cinética de la fermentación.

Los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 6.2.1. El volumen total producido ( $V_t = V_1 + V_2$ ) y la fase lag ( $L$ ) no se afectaron significativamente por la adición de ninguna de las cepas ensayadas al compararlas con los fermentadores control (sin agregado de cepa potencialmente probiótica). Sin embargo, se encontraron diferencias en otros parámetros de la fermentación. El volumen de gas producido en la fase rápida de fermentación ( $V_1$ ) en los tratamientos con Prum 55C y Lach 56C fue menor que el generado en el control mientras que la tasa de fermentación de la fase rápida ( $kd_1$ ) fue mayor en el tratamiento con la cepa Pr 50C (Tabla 6.2.1.).



**Fig. 6.2.1** Volumen de gas acumulado en los fermentadores a lo largo de todo el periodo de incubación

Analizando los parámetros descriptores de la fase lenta de fermentación se pudo observar que los tratamientos con las cepas Lach 56C, Bhun 79C, Bhun 58C y Prum 55C mostraron tasas de fermentación ( $kd_2$ ) más elevadas que las del control. Estas cuatro cepas y Pr 50C también incrementaron los valores de volumen de la fase lenta de fermentación ( $V_2$ , Tabla 6.2.1.).

**Tabla 6.2.1. Parámetros cinéticos de fermentación**

	<i>Control</i>	<i>Lach 21C</i>	<i>Lach 56C</i>	<i>Pr 50C</i>	<i>Prum 55C</i>	<i>Bhun 58C</i>	<i>Bhun 63C</i>	<i>Bhun 79C</i>	<b>P<sup>a</sup></b>
<b><i>V</i><sub>1</sub> (mL/g)</b>	171,8	166,1	87,8*	124.1	82,8*	141,6	157,9	96,0	0,02
<b><i>kd</i><sub>1</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	0,0714	0,074	0,137	0.179*	0,151	0,130	0,070	0,147	0,01
<b><i>L</i> (h)</b>	0,96	-0,39	0,81	0.87	0,64	1,43	-0,32	0,74	0,43
<b><i>V</i><sub>2</sub> (mL/g)</b>	65,4	78,1	141,1*	138.7*	157,9*	139.2*	61,5	141,1*	<0.01
<b><i>kd</i><sub>2</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	0,0155	0,0215	0,0357*	0,0355*	0,0385*	0.0365*	0,0172	0,0363*	<0.01
<b><i>V</i><sub>t</sub> (mL/g)</b>	237,2	244,2	229,0	262,8	240,7	280,9	219,4	237,1	0.12

\* En una misma fila, significativamente diferente al control luego del ajuste con el test de Dunnett, P<0.05. <sup>a</sup> Corresponde al valor de P del tratamiento.

### 6.2.2. Ácidos grasos volátiles

No se detectó ácido láctico en ningún fermentador en ninguno de los tiempos experimentales. A las 4 h de incubación la concentración total de AGV de los fermentadores tratados con Bhun 58C fue igual que la de los controles mientras que para el resto de los tratamientos la concentración total de AGV fue significativamente menor (Tabla 6.2.2). Una situación similar se observó al analizar el ácido acético ya que todos los tratamientos mostraron concentraciones más bajas que las del control (Tabla 6.2.2). También, en los fermentadores tratados con Lach 56C, Prum 55C, Lach 21C y Bhun 63C se observó una disminución significativa en la concentración de

ácido butírico. Los niveles de ácido propiónico fueron similares a los determinados en el control en la mayoría de los tratamientos salvo en el tratamiento con Prum 55C en el cual se registró una disminución significativa de este ácido (Tabla 6.2.2). En todos los casos la relación acético/propiónico (A/P) disminuyó significativamente y el pH en los tratamientos Pr 50C, Lach 56C, Bhun 79C, Bhun 58C y Prum 55C fue mayor que el del control (Tabla 6.2.2).

**Tabla. 6.2.2.** Concentración de AGV, relación A/P y pH y en los fermentadores a las 4 h de incubación

AGV (mg/mL), A/P y pH	Tratamiento							
	Control	Lach 21C	Lach 56C	Pr 50C	Prum 55C	Bhun 58C	Bhun 63C	Bhun 79C
<b>Ác. acético</b>	2491,4 (166,9)	1681,1 (101,5)*	1904,7 (151,5)*	1743,5 (130,7)*	1480,1 (385,9)*	2307,5 (373,1)	1477,0 (86,6)*	1668,3 (229,2)*
<b>Ác. propiónico</b>	1057,8 (76,8)	807,3 (69,9)	908,8 (94,0)	855,6 (47,3)	722,8 (215,1)*	1195,9 (175,9)	816,9 (88,6)	826,4 (109,2)
<b>Ác. Butírico</b>	350,4 (20,4)	96,6 (45,6)*	160,0 (145,2)*	318,1 (64,9)	99,6 (37,7)*	300,3 (11,0)	65,5 (1,5)*	238,9 (25,9)
<b>AGV totales</b>	3899,6 (245,1)	2591,4 (195,1)*	2973,6 (100,5)*	2917,2 (234,8)*	2302,5 (625,3)*	3803,8 (542,0)	2359,4 (141,3)*	2733,6 (362,7)*
<b>A/P</b>	2,4 (0,1)	2,1 (0,1)*	2,1 (0,1)*	2,04 (0,04)*	2,1 (0,1)*	1,93 (0,04)*	1,8 (0,1)*	2,02 (0,02)*
<b>pH</b>	6,34 (0,05)	6,40 (0,07)	6,48 (0,05)*	6,54 (0,02)*	6,50 (0,03)*	6,51 (0,01)*	6,39 (0,05)	6,48 (0,04)*

\* En la misma fila significativamente diferentes al control (Test de Dunnet,  $P < 0,05$ ), Entre paréntesis se presenta la desviación estándar

En general, la concentración de AGV totales y de los ácidos individuales no mostró diferencias significativas con respecto al control en los fermentadores abiertos a las 8 h de incubación (Tabla 6.2.3). Sin embargo, los fermentadores tratados con Pr 50C mostraron niveles más elevados de

ácido butírico. La relación A/P y el pH fueron, a este tiempo de incubación

**Tabla. 6.2.3.** Concentración de AGV, relación A/P y pH en los fermentadores a las 8 h de incubación

AGV (mg/mL), A/P y pH	Tratamiento							
	<i>Control</i>	<i>Lach 21C</i>	<i>Lach 56C</i>	<i>Pr 50C</i>	<i>Prum 55C</i>	<i>Bhun 58C</i>	<i>Bhun 63C</i>	<i>Bhun 79C</i>
<b>Ác. acético</b>	2244,7 (370,8)	2040,4 (332,1)	2257,7 (553,7)	2650,5 (115,2)	1850,6 (531,4)	2514,2 (188,9)	1765,6 (229,2)	1934,3 (633,4)
<b>Ác. propiónico</b>	1152,0 (156,8)	982,3 (126,1)	1013,9 (221,0)	1161,4 (157,0)	915,2 (259,3)	1312,3 (92,3)	926,8 (35,9)	956,0 (272,2)
<b>Ác. butírico</b>	293,9 (62,6)	209,3 (44,8)	340,2 (157,7)	589,5 (68,9)*	161,3 (535,3)	332,8 (29,0)	194,3 (28,1)	288,9 (67,4)
<b>AGV totales</b>	3690,6 (575,3)	3232,1 (499,1)	3611,8 (931,3)	4401,5 (321,3)	2927,1 (810,8)	4159,3 (279,5)	2886,7 (260,9)	3179,3 (971,1)
<b>A/P</b>	1,9 (0,2)	2,1 (0,1)	2,2 (0,1)	2,3 (0,3)	2,0 (0,3)	1,9 (0,1)	1,9 (0,2)	2,0 (0,1)
<b>pH</b>	6,40 (0,05)	6,43 (0,02)	6,44 (0,03)	6,44 (0,04)	6,40 (0,02)	6,39 (0,06)	6,44 (0,03)	6,43 (0,02)

\* En la misma fila significativamente diferentes al control (Test de Dunnet,  $P < 0,05$ ), Entre paréntesis se presenta la desviación estándar

similares al control (Tabla 6.2.3).

Al final del experimento, 96 h de incubación, las concentraciones de ácido acético y la de ácido propiónico así como la concentración de AGV totales fueron similares a las del control. La concentración de ácido butírico tendió a ser mayor que la del control en todos los tratamientos; esta diferencia fue significativa en los fermentadores tratados con Lach 56C (Tabla 6.2.4). La relación A/P fue mayor que la del control en el tratamiento con Bhun 79C y similar en los casos restantes (Tabla 6.2.4). El tratamiento con Prum 55C mostró valores de pH significativamente mayores que los del control (Tabla 6.2.4.).

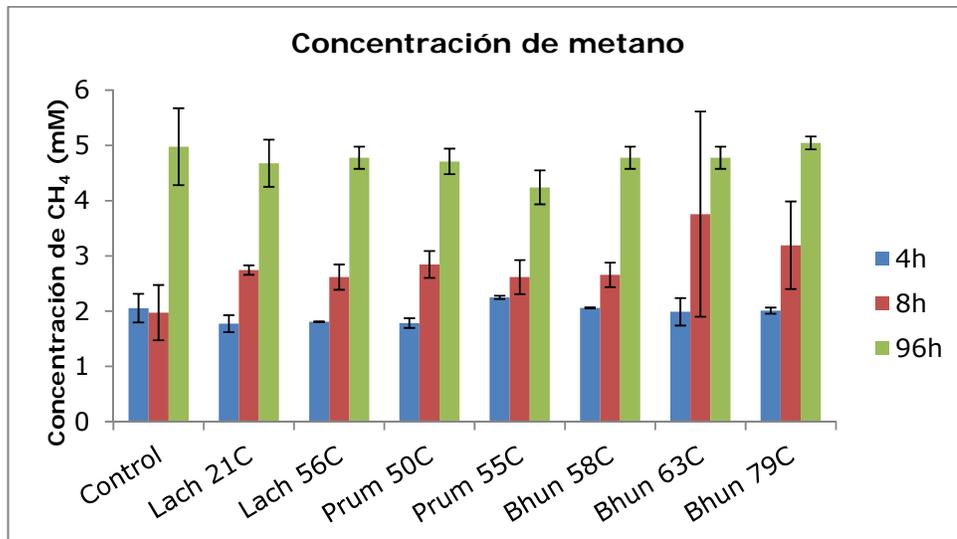
**Tabla. 6.2.4.** Concentración de AGV, relación A/P y pH en los fermentadores a las 96 h de incubación

AGV (mg/mL), A/P y pH	Tratamiento							
	Control	Lach 21C	Lach 56C	Pr 50C	Prum 55C	Bhun 58C	Bhun 63C	Bhun 79C
<b>Ác. acético</b>	3151,8 (928,1)	2989,3 (249,8)	3620,3 (556,1)	3188,0 (528,2)	3639,0 (660,7)	3268,0 (292,4)	2478,5 (528,0)	3686,7 (889,3)
<b>Ác. propiónico</b>	1435,6 (384,7)	1391,0 (68,8)	1743,9 (288,0)	1479,7 (212,4)	1783,4 (428,2)	1620,1 (243,9)	1173,2 (271,2)	1920,1 (420,1)
<b>Ác. butírico</b>	223,8 (14,4)	699,3 (262,1)	904,7 (152,5)*	556,8 (337,5)	558,9 (258,7)	782,9 (344,4)	638,5 (303,1)	704,1 (132,6)
<b>AGV totales</b>	4811,1 (1324,4)	5079,6 (574,6)	6268,9 (1006,1)	5224,5 (1076,6)	5981,3 (1333,3)	5671,0 (669,0)	4290,2 (1084,8)	6310,8 (1441,2)
<b>A/P</b>	2,2 (0,1)	2,1 (0,1)	2,08 (0,03)	2,2 (0,1)	2,1 (0,1)	2,0 (0,2)	2,12 (0,04)	1,91 (0,05)*
<b>pH</b>	6,42 (0,02)	6,43 (0,03)	6,43 (0,03)	6,42 (0,01)	6,56 (0,03)*	6,41 (0,02)	6,40 (0,02)	6,42 (0,04)

\* En la misma fila significativamente diferentes al control (Test de Dunnet,  $P < 0,05$ ), Entre paréntesis se presenta la desviación estándar

### 6.2.3. Determinación de metano y microorganismos metanógenos

La concentración de metano (Fig. 6.2.2.) se determinó a las 4, 8 y 96 h de incubación y la misma no se vio significativamente afectada por la adición de las cepas potencialmente probióticas en ninguno de los tiempos al compararla con el control. A las 96 h se alcanzaron concentraciones promedio en el entorno de 5 mM en el *headspace* de los fermentadores (Fig. 6.2.2.).



**Figura 6.2.2.** Concentración promedio de metano en los fermentadores a las 4, 8 y 96 h de incubación.

Los microorganismos metanógenos se estimaron cuantificando el gen *mrcA*. No se encontraron diferencias significativas entre el control y los fermentadores tratados con cepas nativas. A las 4 horas de incubación se cuantificaron en promedio  $2,7 \times 10^3$  copias del gen *mrcA* por ng de ADN total mientras que a las 8 h de incubación se observó un aumento de casi 10 veces alcanzando valores promedio de  $1,5 \times 10^4$  copias del gen *mrcA*/ng de ADN.

#### 6.2.4. Evaluación de la microbiota ruminal en los fermentadores

La estructura y composición de la microbiota en los fermentadores se estudió por medio de la secuenciación masiva del gen que codifica para el

ARNr 16S. Luego del análisis de calidad se analizaron 107874 secuencias con un promedio por muestra de  $2335 \pm 650$ .

El filo más abundante en todos los casos fue *Bacteroidetes* con abundancias que alcanzaron al 85 % de todas las secuencias obtenidas y el segundo filo más abundante fue *Firmicutes* alcanzando en el caso del tratamiento con Bthung 79C el 12,3 % (Tabla 6.2.5, Figura 6.2.3)

**Tabla 6.2.5.** Composición, en términos de Filos, detectados en los fermentadores

Abundancia porcentual de filios en los fermentadore por tratamiento							
Filos	Control	Lach 21C	Lach 56C	Pr 50C	Prum55C	Bthung63C	Bthung79C
<i>Bacteroidetes</i>	85,38	82,12	81,67	86,48	83,59	83,61	78,06
<i>Firmicutes</i>	6,05	8,39	8,90	5,50	7,45	7,37	12,32
Sin designar	7,72	8,12	8,25	6,94	7,77	7,64	8,43
<i>Cyanobacteria</i>	0,43	0,54	0,63	0,52	0,52	0,63	0,64
<i>Tenericutes</i>	0,19	0,36	0,14	0,29	0,27	0,36	0,23
<i>Fibrobacteres</i>	0,06	0,19	0,23	0,15	0,18	0,15	0,09
<i>Spirochaetes</i>	0,12	0,18	0,04	0,04	0,11	0,06	0,21
Otros	0,04	0,10	0,14	0,08	0,09	0,14	0,02

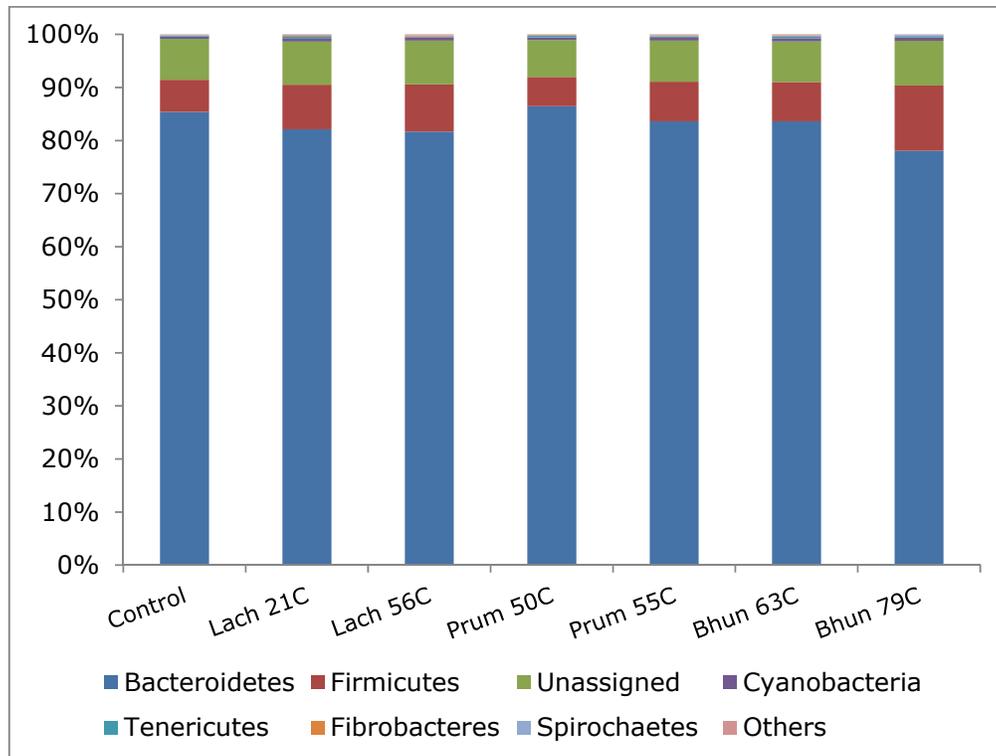


Figura 6.2.3. Composición porcentual de filos bacterianos en los fermentadores

### 6.3. Discusión

Una necesaria disminución en el uso de antimicrobianos como “promotores del crecimiento” en producción animal ha sido el motor de la búsqueda de alternativas para modular la fermentación animal. Los probióticos representan una alternativa que se puede inscribir en una estrategia “saludable”, no química y también segura para alcanzar este propósito (Kobayashi, 2006; Seo et al., 2010; Chiquette et al., 2012). En este capítulo se evaluó la capacidad de modular la fermentación *in vitro* de siete

cepas nativas del contenido ruminal de un bovino a pastoreo exclusivo. Estas cepas habían sido aisladas en un trabajo previo (Fraga 2010) y presentaban buenas características de crecimiento, alcanzando niveles de  $10^8$  UFC/mL en 24 h y estaban afiliadas a grupos y especies bacterianas pertenecientes a los llamados consorcios fibrolíticos (Fraga et al., 2010; Shinkai et al., 2010). Las cepas Pr 50C, Prum 55C y Lach 21C habían sido analizadas en un abordaje anterior en cuanto a su capacidad de modular la fermentación ruminal usando como sustratos celulosa microcristalina, xilano de avena y paja de trigo (Fraga et al., 2014). En este trabajo, los autores habían observado que el agregado a los fermentadores de las cepas nativas provocaba en general una mayor concentración de AGV a las 96 h de incubación así como un menor volumen de gas al compararlo con los controles sin agregado de cepas nativas (Fraga 2010; Fraga et al., 2014). Por el diseño experimental los autores no pudieron determinar la dinámica de producción de AGV, la composición del gas generado ni las características de las comunidades microbianas en los fermentadores. En este trabajo, esos aspectos fueron abordados.

Originariamente las metodologías *in vitro* utilizadas en este trabajo fueron diseñadas para estudiar y predecir la fermentación de alimento por los rumiantes (Rymer et al., 2005) y se han utilizado previamente para evaluar la influencia de distintos factores que podrían afectar la fermentación ruminal (Kung y Hession, 1995; Cherdthong y Wanapat, 2013; Fraga et al., 2014, Lavrenčič et al., 2014).

Los fermentadores que fueron suplementados con cepas nativas mostraron diferencias con los fermentadores control en la cinética de fermentación. Al

compararlas con los fermentadores control cinco de las cepas mostraron mayor tasa de producción de gas en la fase lenta de fermentación ( $k_2$ ) así como una mayor producción de gas en esta fase ( $V_2$ ). La fase lenta de la fermentación se asocia a la fermentación de los carbohidratos insolubles como celulosa y hemicelulosa. Estos cambios en la fermentación de la fase lenta no implicaron cambios significativos en el volumen total de gas producido en ningún caso.

Analizando el gas producido en la fase rápida de fermentación se pudo observar que el mismo fue siempre inferior al volumen de gas producido por los fermentadores control, estas diferencias fueron significativas en los fermentadores tratados con Lach 56C y Prum 55C. Estos efectos implicarían que la adición de las cepas indujo un efecto modulador en la dinámica de fermentación particularmente al comienzo de la incubación sin afectar la producción final total de gas. Esta última observación se refuerza con el hecho que la mayor parte de las diferencias significativas al analizar los AGV se encontraron a las 4h de incubación, correspondiente a las primeras horas de incubación. Salvo para los fermentadores tratados con Bhung 58C, el agregado de las cepas a los fermentadores provocó una menor concentración de AGV con respecto al control a las 4 h de incubación. Estas diferencias se pueden explicar por el hecho de que la concentración de ácido acético fue menor que el control en todos los casos y ese ácido representa aproximadamente el 70 % de la producción total de AGV. La concentración de ácido butírico se vio también disminuida al comparar con el control los fermentadores tratados con Bhun 63C, Lach 21C, Lach 56C y Prum 55C a las 4 h de incubación. Sin embargo, la relación A/P fue afectada de forma

positiva ya que en los fermentadores se registró mayor concentración de ácido propiónico en relación al ácido acético.

En conjunto, la adición de las cepas nativas afectó la primera fase de fermentación disminuyendo la producción de gas ( $V_1$ ) así como su tasa de producción ( $k_1$ ). Esto último fue sustentado por la menor producción de AGV sin alterar la concentración de metano y mostrando una mejor relación A/P. Las diferencias observadas a las 4 horas de incubación no pudieron ser explicadas por cambios generales en la estructura de la comunidad microbiana ya que no hubo diferencias entre las comunidades presentes en los fermentadores tratados y el control.

Si bien se ha descrito que los cultivos en "batch" con fluido ruminal, como los utilizados en esta sección, tienen índices de diversidad inferiores que el fluido ruminal original los mismos sustentan el crecimiento de muchas especies particularmente de bacterias fibrolíticas (Soto et al., 2013). En general, la comunidad microbiana de los fermentadores en este ensayo fue similar a la de otros estudios en los que *Bacteroidetes* y *Firmicutes* aparecen como los filos principales de la microbiota (Jami y Mizrahi, 2012; Zened et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2014; Jami et al., 2014). Las diferencias en abundancia de algunas familias que se encontraron podrían estar relacionadas por las propias cepas agregadas ya que en algunos tratamientos los miembros de la familia *Lachnospiraceae* fueron más abundantes, familia a la que pertenecen todas las cepas agregadas. Sin embargo, las diferencias en las familias *Veillonellaceae*, *Succinivibrionaceae* y *Rickenellaceae* podrían reflejar cambios en la comunidad (con respecto al control) ya que ninguna de las cepas adicionadas pertenece a estas

familias. Estos grupos bacterianos modificados por la adición de cepas nativas en este caso, han sido descritos como habitantes del rumen de bovinos y se ha demostrado que sus abundancias responden a variaciones en las dietas y a la adición de suplementos (Wu et al., 2012; Zened et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2014).

El potencial de modular la microbiota ruminal para modificar y mejorar los rendimientos productivos hoy comienza a ser una realidad (Jami et al., 2014) y la investigación en nuevos moduladores de la fermentación, incluidos los probióticos, está justificada. De los ensayos *in vitro* del presente trabajo así como de abordajes anteriores similares (Fraga, 2010; Fraga et al., 2014) se desprende que la adición de cepas nativas en bajas cantidades provoca diferencias entre los tratamientos. En este caso los efectos de la modulación consistieron en un cambio en la dinámica de fermentación con menos gas producido en las etapas tempranas de degradación (degradación de carbohidratos solubles) y subsecuente aumento de la tasa de producción de gas y del volumen de la fase de fermentación lenta. Esto último estaría asociado a una mayor degradación de la fracción insoluble de los sustratos, esto es, celulosa y hemicelulosa.

## **7. SECCIÓN 3. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE *Pseudobutyrvibrio ruminis* 50C**

### **7.1. Introducción**

La administración de probióticos a rumiantes con el objetivo de modular la microbiota y la fermentación ruminal se puede realizar con diferentes fines productivos, sanitarios o ambientales. Entre estos aspectos no se pueden definir límites precisos ya que siempre existe una interrelación entre ellos. Así, modular la fermentación ruminal para obtener mejores resultados productivos puede implicar una disminución de emisiones de gases de efecto invernadero lo que se refleja también en un beneficio ambiental.

En general, los probióticos se han utilizado en rumiantes para prevenir o amortiguar los efectos asociados al consumo de concentrados energéticos a los que se asocia la patología metabólica conocida como acidosis. Los efectos más significativos asociados a su uso se han detectado en animales que están sometidos a importantes situaciones de estrés como son el periodo de lactación o el cambio de dietas de gran concentración de fibra a dietas con mayor concentración de carbohidratos (Jouany y Morgavi, 2007; Chaucheyras-Durand y Durand, 2010). También hay un creciente interés en promover la degradación de la fibra utilizando microorganismos con

potencial fibrolítico (Klieve et al., 2003; Chiquette et al., 2007; Fraga et al., 2014).

La microbiota fibrolítica del rumen es la encargada de dar comienzo a la degradación de la fibra que consume el rumiante. Este proceso es llevado a cabo por bacterias y hongos anaerobios (Stewart y Bryant, 1988).

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 características de los sistemas de cría intensivos y semi-intensivos son ricas en grano y poseen una gran proporción de carbohidratos solubles. Éstos 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 consecuencias de la acidosis bovina.

Las especies bacterianas clásicamente asociadas con la degradación de la fibra en el rumen son *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*. Junto a estas bacterias, *B. fibrisolvens* 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). Otras especies implicadas con esta función son *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium fibrisolvens* y *Eubacterium ruminantium* (Stewart y Bryant, 1988). Diferentes estudios coinciden en que las proporciones de los microorganismos fibrolíticos en el rumen de ovinos y bovinos se encuentran en el entorno del 1 al 2% de la microbiota bacteriana (Krause et al., 1999; Uyeno et al., 2007; Fraga, 2010). Sin embargo, la mayor parte de la microbiota fibrolítica aún no ha sido cultivada, por tanto no se ha

caracterizado (Kong et al., 2012) y en los últimos años ha crecido el interés por aislar y caracterizar estos microorganismos (Shinkai et al., 2010; Fukuma et al., 2012; Fraga et al., 2014; Nyonyo et al., 2014). Entre las bacterias asociadas a este proceso se han aislado, entre otras, representantes de la especie *P. ruminis*.

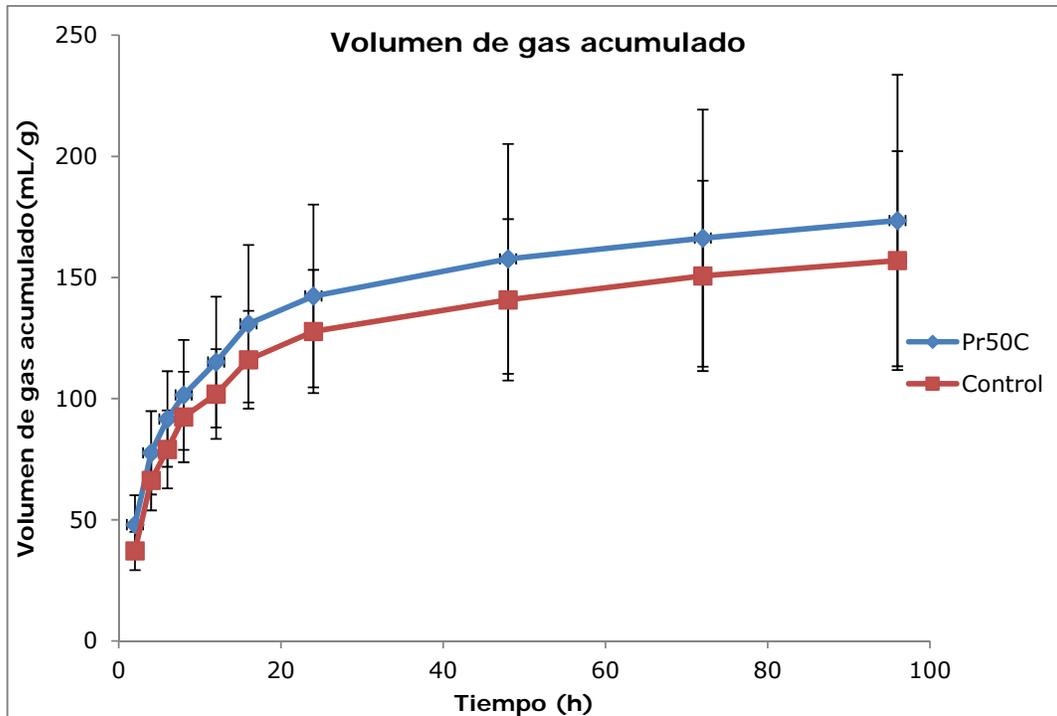
La bacteria *P. ruminis* es frecuentemente aislada del rumen. En 1996 se describió por primera vez el género *Pseudobutyrvibrio* en base a consideraciones genotípicas así como la especie *P. ruminis* que era erróneamente clasificada como perteneciente al género *Butyrvibrio* (van Gylswyk et al., 1996). Esta especie se ha descrito como integrante de los consorcios fibrólíticos, tanto naturales como artificiales (Shinkai et al., 2010) y recientemente se ha descrito su capacidad de degradar celulosa (Nyonyo et al., 2014).

En esta sección se describe la utilización de una cepa de *P. ruminis* (Pr 50C) aislada en un trabajo previo (Fraga, 2010; Fraga et al., 2014). Esta cepa fue aislada de un medio con celulosa como principal fuente de carbono y energía y se describió su capacidad de modular la fermentación ruminal *in vitro* en incubaciones con sustratos puros (celulosa y xilano) así como con paja de trigo. En esos ensayos mostró una particular producción de ácido butírico (Fraga et al., 2014) y en el numeral 6, sección 2 de esta Tesis mostró, en ensayos *in vitro*, un comportamiento similar con sustratos que simulaban la alimentación de animales en condiciones de cría semi-intensiva.

## 7.2. Resultados

### *7.2.1. Evaluación de la actividad del inóculo*

Para evaluar el potencial fermentador del fluido ruminal de los animales empleados en los distintos tratamientos se realizó un experimento de fermentación *in vitro*. En la Figura 7.2.1 se muestra el volumen de gas acumulado en función del tiempo de ambos tratamientos. Los datos de volumen de gas acumulado se ajustaron al modelo de Schoefield y los parámetros obtenidos se presentan en la Tabla 7.2.1. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de fermentación entre los animales tratados y los controles. Tampoco se observaron diferencias en la concentración de metano en los fermentadores para ninguno de los horarios muestreados (Fig. 7.2.2).

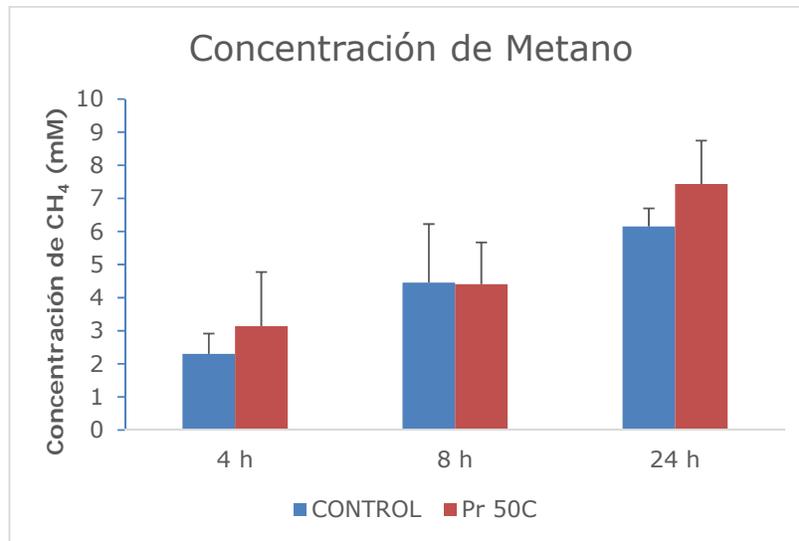


**Figura 7.2.1. Volumen de gas acumulado en el tiempo.** Se presentan las medias acumuladas y el desvío estándar (DE) del control y el tratamiento.

**Tabla 7.2.1 Parámetros cinéticos de fermentación**

Tratamiento	$V_1$ (mL/g)	$k_1$ ( $h^{-1}$ )	$L$ (h)	$V_2$ (mL/g)	$k_2$ ( $h^{-1}$ )	$V_t$ (mL/g)
Control	82,86	0,167	-0,5	73,16	0,031	156,0
Tratamiento	105,4	0,173	-2,6	69,96	0,023	175,3
P <sup>a</sup>	0,31	0,92	0,07	0,80	0,26	0,47
ESM <sup>b</sup>	15,9	0,004	1,5	2,27	0,006	13,64

<sup>a</sup> P del tratamiento para cada parámetro. <sup>b</sup> Error estándar de la media



**Figura 7.2.2. Concentración de metano en los fermentadores del ensayo de potencial de inóculo.** Se presentan las medias y el desvío estándar (DE) de cada grupo a las 4, 8 y 24 h de incubación.

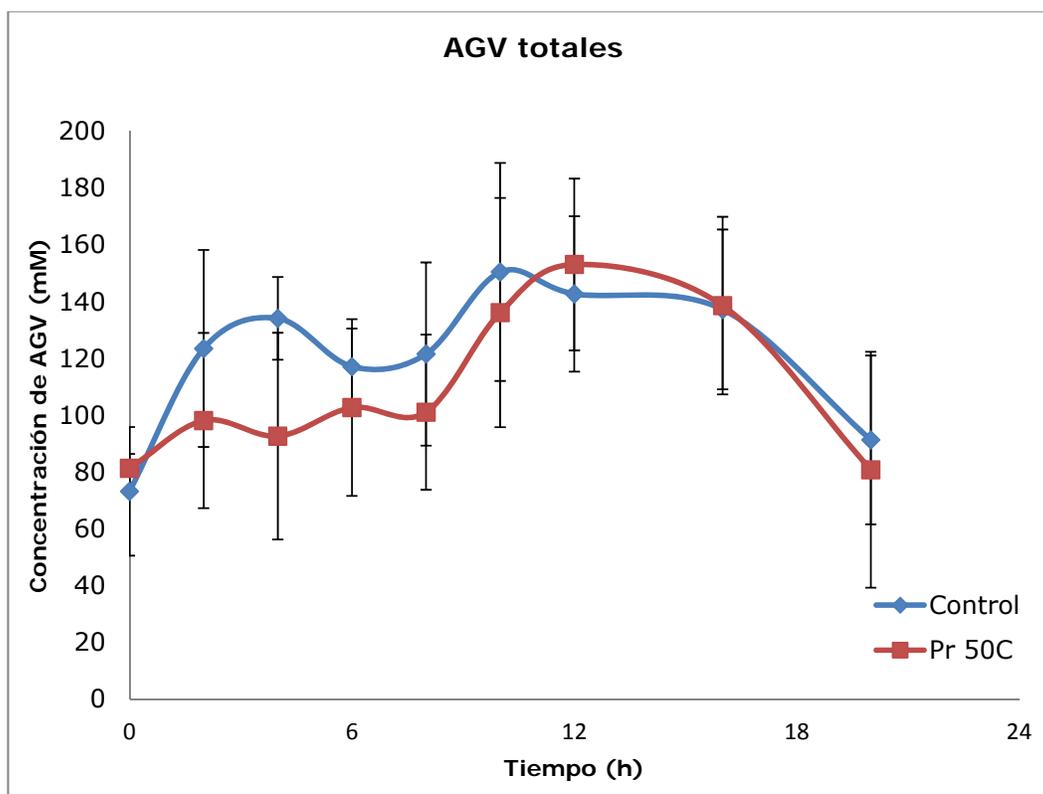
### 7.2.2. Ambiente ruminal

La evolución diaria de la concentración de AGV totales fue similar para los animales tratados con la cepa Pr 50C y para el control (Fig 7.2.3). Las curvas de evolución de la concentración de AGV no presentaron diferencias significativas entre ellas ( $P$  tratamiento = 0,10;  $P$  interacción tratamiento\*t = 0,69). Al analizar los tres AGV principales por separado tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración diaria de ácido acético ( $P$  = 0,56, Fig 7.2.4). Sin embargo los animales tratados mostraron diferencias significativas con respecto al control en la evolución diaria de la concentración de ácido propiónico y de ácido butírico ( $P$  tratamiento <0,001 y  $P$  tratamiento <0,001 respectivamente, Fig 7.2.5 y 7.2.6). El grupo de animales tratado con Pr 50C presentó valores de concentración de ácido propiónico significativamente inferiores a los del control. La concentración

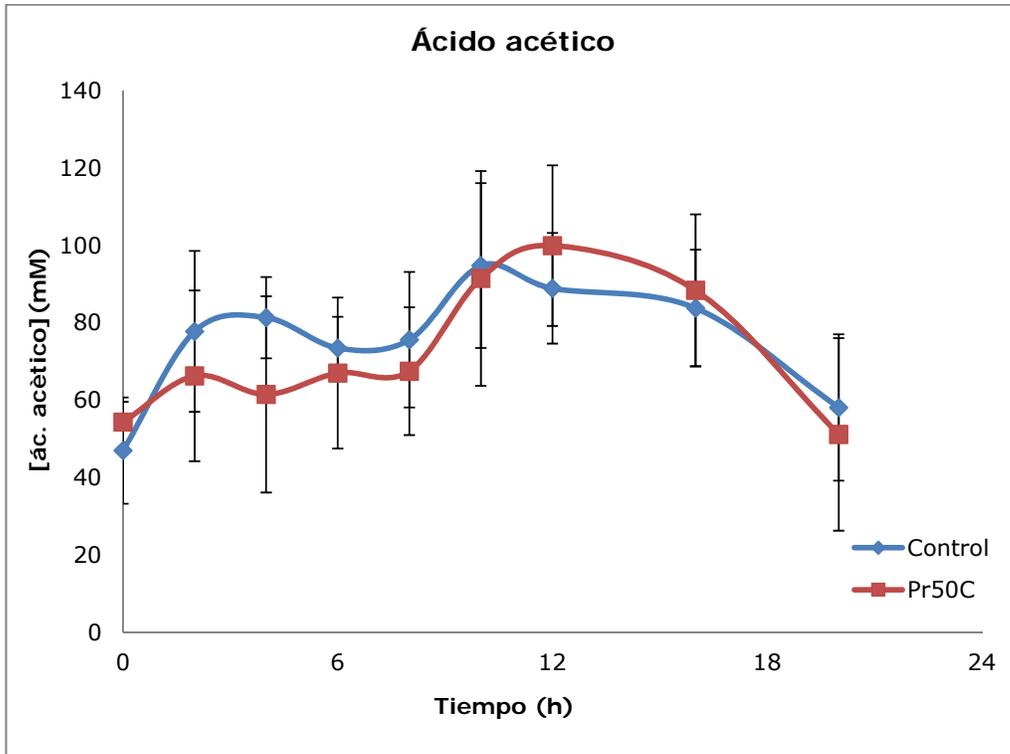
de ácido butírico en el fluido ruminal de los animales tratados con Pr 50C fue mayor que la del control durante todo el día con una diferencia de 2,88 mM entre las medias diarias.

El pH ruminal de los animales tratados fue igual al de los animales en el grupo control (Fig. 7.2.7). No hubo diferencias significativas en la evolución diaria y los niveles de pH estuvieron siempre por encima de 6,2. (P tratamiento = 0,74, P tiempo <0,001; P tratamiento\*tiempo= 0,93)

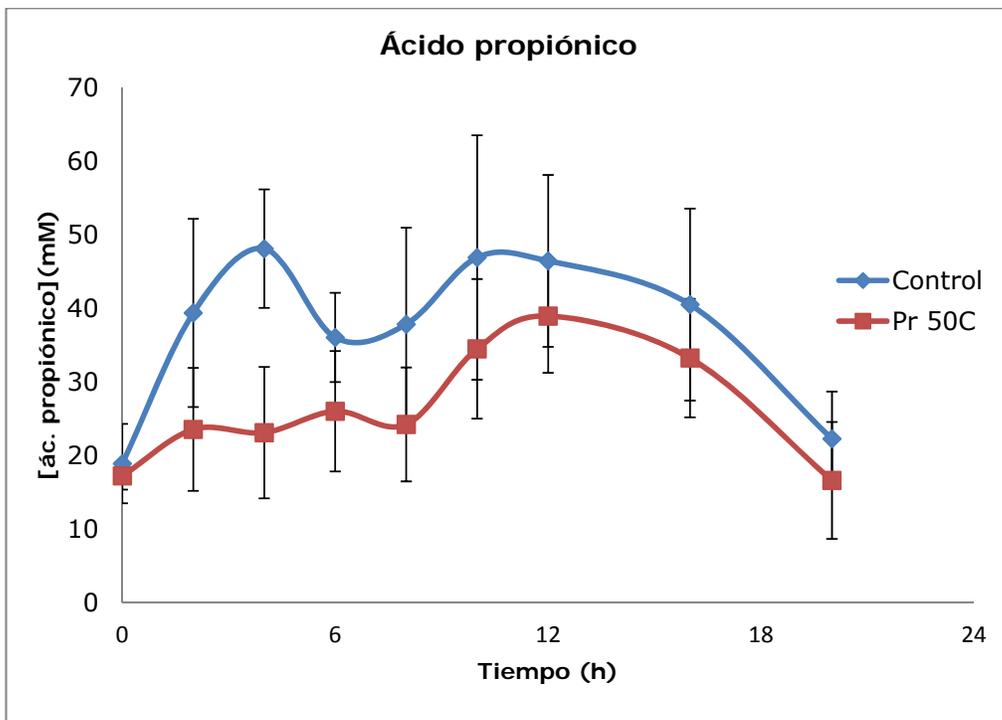
Si bien la evolución diaria de nitrógeno amoniacal no se vio afectada en cuanto a la concentración (P tratamiento = 0,909) si presentó interacción tiempo\*tratamiento (P = 0,001, Fig 7.2.7), lo que se ve reflejado en las diferentes formas de las curvas.



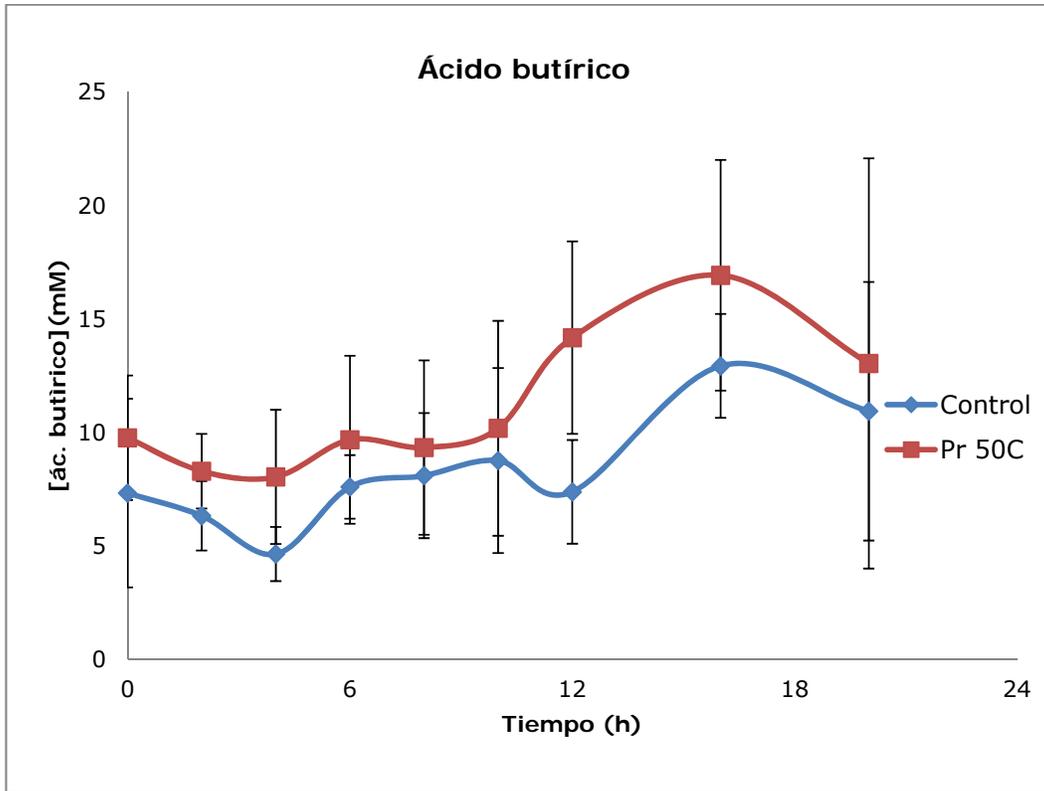
**Figura 7.2.3. Evolución diaria de AGV totales en el rumen.** Para cada grupo (5 animales) se presentan las medias y el DE de la concentración de AGV a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



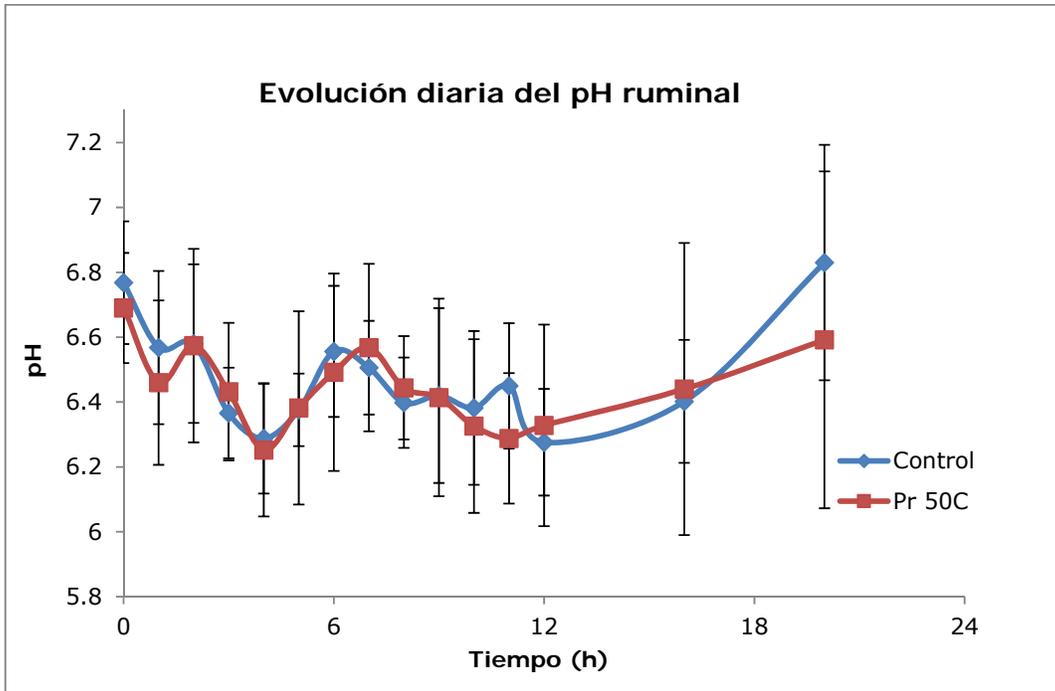
**Figura 7.2.4. Evolución diaria del ácido acético en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de ácido acético a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



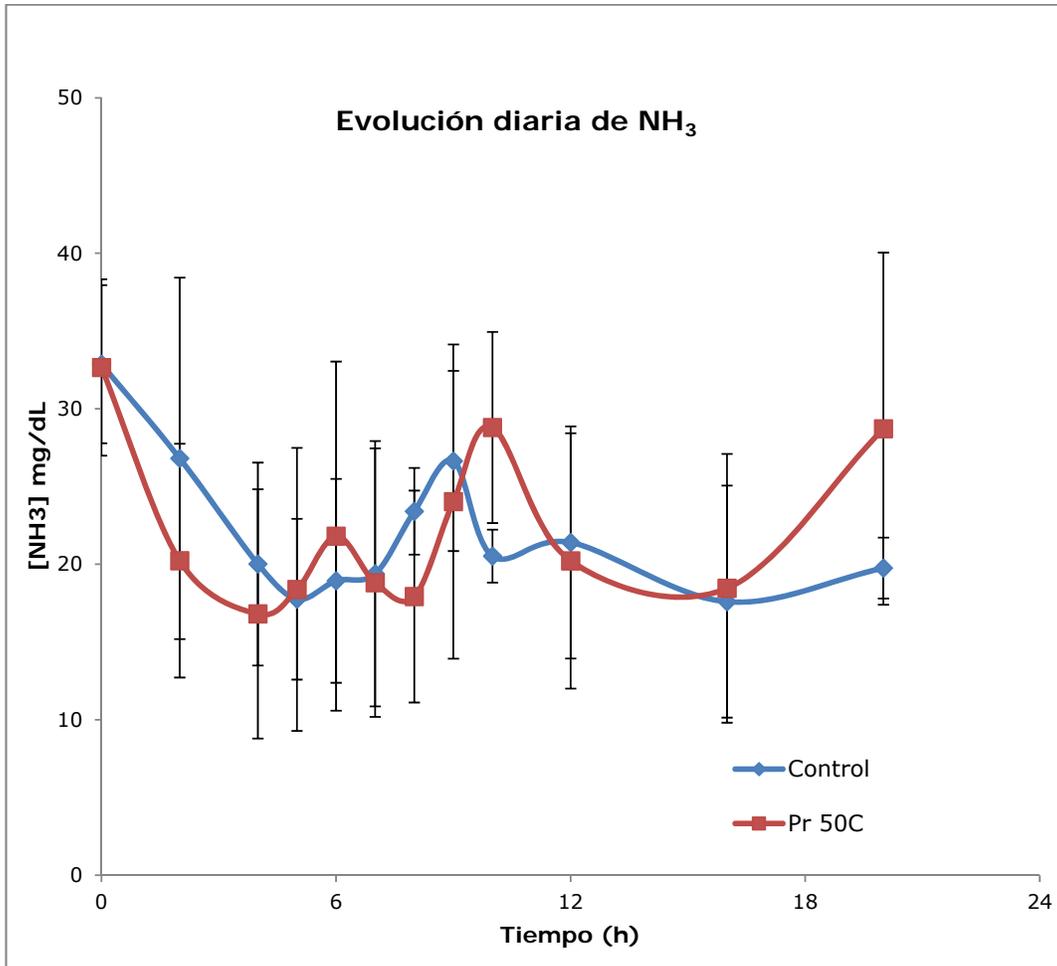
**Figura 7.2.5. Evolución diaria del ácido propiónico en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de ácido propiónico a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



**Figura 7.2.6. Evolución diaria del ácido butírico en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de ácido butírico a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



**Figura 7.2.7. Evolución diaria del pH ruminal.** . Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de pH a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



**Figura 7.2.8. Evolución diaria del NH<sub>3</sub> ruminal.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de NH<sub>3</sub> a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.

### 7.2.3. Consumo y digestibilidad

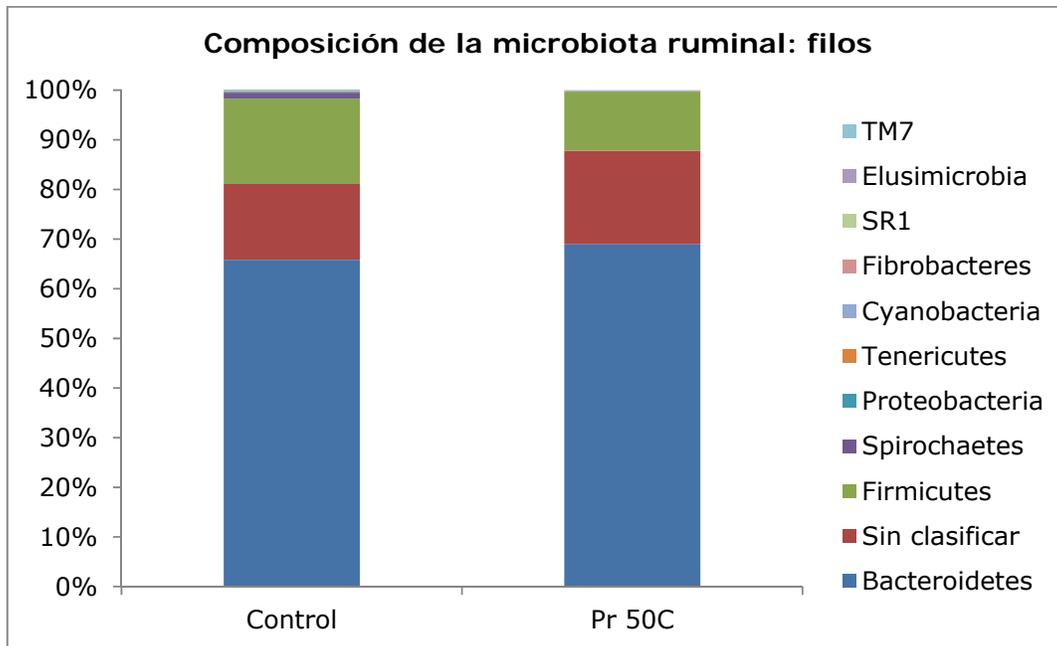
El consumo y la digestibilidad de la materia seca de los animales fueron registrados durante 5 días. El grupo control mostró un consumo de materia seca promedio de 1340 g/día y una digestibilidad de la materia seca del 67 % mientras que los animales del grupo tratado con Pr 50C presentaron valores de 964 g/día y también digestibilidad del 67 %. No hubo diferencias

significativas entre los diferentes grupos en estos dos parámetros ( $P = 0,15$  y  $P = 0,97$  respectivamente).

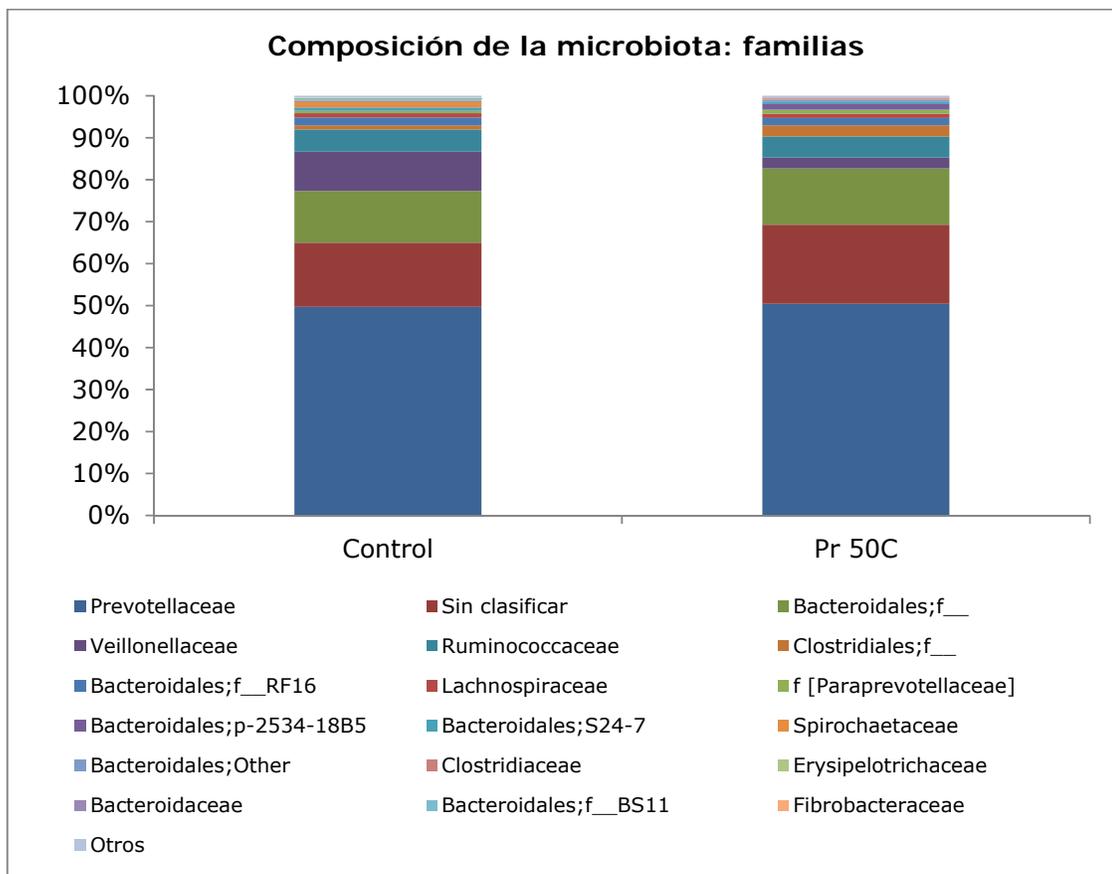
#### 7.2.4. Estructura de la comunidad microbiana

La comunidad bacteriana en los animales fue analizada a las ocho horas luego de la primera comida. Se analizaron en promedio 2289 ( $\pm 273$ ) secuencias por muestra. Las secuencias se clasificaron en 1941 OTUs. Más del 60% de las secuencias en ambos grupos de animales se clasificaron dentro del filo *Bacteroidetes* mientras que el segundo filo más abundante fue *Firmicutes*; el 15,3 % de las secuencias del control y el 18,8 % de las secuencias obtenidas de los animales en el grupo tratado no pudieron ser clasificadas (Fig 7.2.9). La familia *Prevotellaceae* fue la más representada tanto en los animales tratados como en el control con el 50,5 y el 49,7 % de todas las secuencias respectivamente (Fig. 7.2.10). Dentro de esta familia casi la totalidad de las secuencias pudieron ser clasificadas en el género *Prevotella* (Fig. 7.2.11).

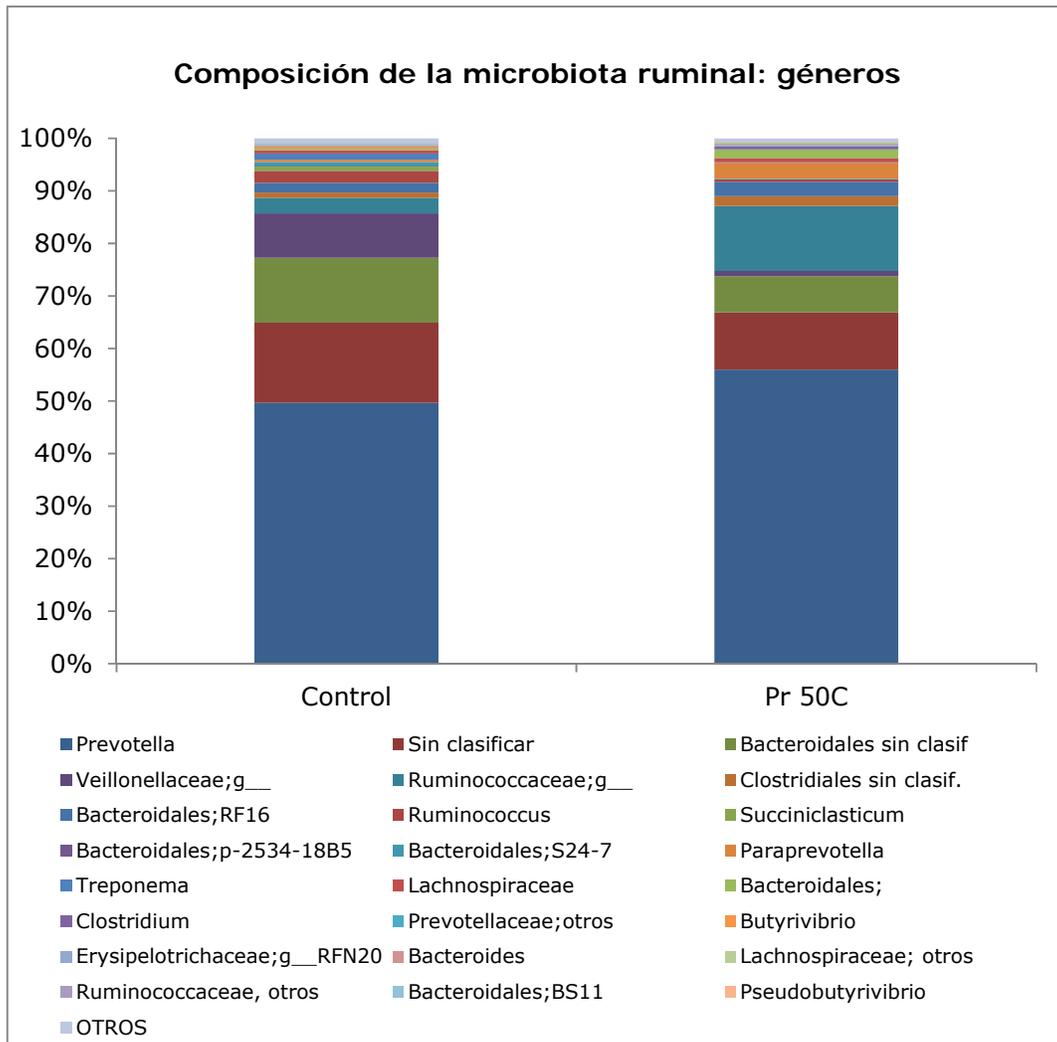
Si bien en los análisis de componentes principales (Fig. 7.2.12) se puede ver una tendencia al agrupamiento de muestras en los dos tratamientos, estos agrupamientos no fueron significativos ( $P$  ADONIS= 0,383,  $P$  ANOSIM = 0,286).



**Figura 7.2.9.** Proporción media (5 animales) de los filos bacterianos presentes en los animales de los grupos tratado y control.



**Figura 7.2.10.** Proporción media de 5 animales de las familias bacterianas presentes en los animales de los grupos tratado y control.



**Figura 7.2.11. Proporción media de los géneros bacterianos presentes en los animales tratados y en los animales control.**

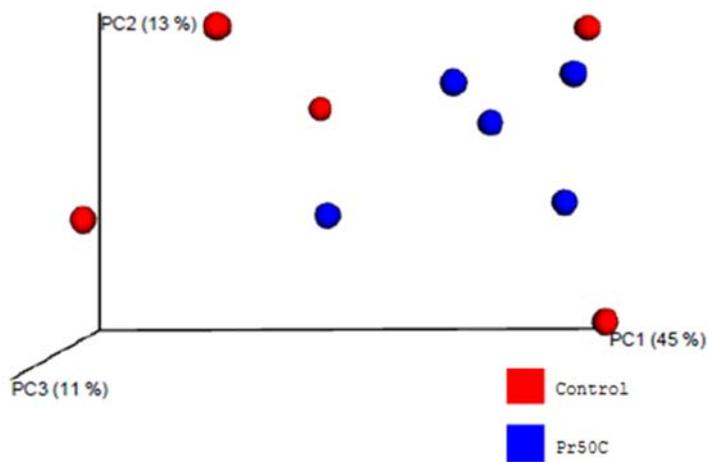


Figura 7.2.12. Análisis de componentes principales.

### 7.3. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenido en este estudio, la administración de *P. ruminis* 50C en relativamente bajas dosis provocó cambios en el ambiente ruminal. Su administración indujo cambios en el perfil del ácido butírico y del ácido propiónico y en la dinámica de producción diaria de nitrógeno amoniacal (numeral 7.2.3.). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en el potencial fermentador del fluido ruminal de los animales en el tratamiento (numeral 7.2.1), en la producción potencial de metano, en la composición de la microbiota ruminal (numeral 7.2.4) ni en la evolución diaria del pH.

Es de resaltar que las dosis de Pr 50C administradas fueron siempre en bajas cantidades comparadas con la población microbiana del rumen de los animales. En el rumen hay aproximadamente una población de entre  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{11}$  cél/mL (Kumar et al., 2012), considerando el volumen total del rumen de los corderos, aproximadamente 8 L, la cantidad de bacterias nativas presentes estaba en el entorno de  $1 \times 10^{15}$ , mientras que el inóculo administrado fue de  $1 \times 10^{10}$ , cinco órdenes de magnitud menor.

Desde el punto de vista del beneficio que la administración de Pr50C pudiera eventualmente generar en los animales, la disminución de la concentración del ácido propiónico no es ventajosa. 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). En los abordajes de modulación de la fermentación ruminal se busca que la producción de este ácido se vea aumentada. 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). Además, su producción está asociada con una menor producción de metano, en los ensayos de producción potencial de este gas no se vieron diferencias significativas. Sin embargo, mirado desde la perspectiva de la inducción de cambios en el ambiente ruminal, la administración de Pr 50C, en bajas dosis, logró ese objetivo.

Como contraparte, la administración de Pr 50C aumentó significativamente la producción diaria de ácido butírico. Este efecto, ya había sido observado en experimentos *in vitro* en los que se emplearon sustratos puros y complejos (Fraga et al., 2014). En la segunda sección de este trabajo se

mostró que esta cepa inducía el mismo efecto con un sustrato que simulaba la alimentación de los animales en esta sección. Pr 50C, fue elegida por esta característica para ser administrada y se comportó de igual modo en el modelo *in vivo*. Este hecho resalta la aproximación utilizada y refuerza el hecho de la utilización del modelo *in vitro* utilizado para predecir el comportamiento de las cepas *in vivo*.

Si bien hubo un cierto agrupamiento de las distintas muestras en cuanto a su composición, la microbiota ruminal de los animales tratados no fue modificada al compararla con la del control. La composición de la microbiota de ambos grupos fue similar y consistente con numerosos estudios previos realizados tanto en ovinos, bovinos y caprinos (Castro-Carrera et al., 2014) con miembros de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* como los más abundantes de la microbiota. Los representantes del género *Prevotella* fueron los más representados de la microbiota total lo que sugiere el rol importante que cumplen en este ecosistema. Por ejemplo, *Prevotella ruminicola*, que es hemicelulolítica, es una de las especies más abundantes y productoras de amoníaco en el rumen (Stevenson y Weimer., 2007). Su papel en el rumen es importante dada la escasez de proteínas en el rumen y la producción de amoníaco sirve como precursor para el anabolismo de aminoácidos y proteínas (Stevens y Weimer, 2007). Las variaciones en la dinámica de amoníaco que se registraron en este trabajo podrían estar relacionados con alguna variación que no se pudo detectar con el abordaje planteado como por ejemplo cambios a nivel metabólico.

En resumen, la administración de Pr 50C en bajas cantidades, moduló algunos aspectos de la fermentación ruminal como la producción de ácido

butírico y la dinámica de producción de amoníaco. Estos cambios se lograron sin afectar la producción potencial de metano, los parámetros generales de fermentación ruminal o el pH ruminal. Si bien no se registraron cambios significativos en la composición de la microbiota ruminal en el tiempo analizado (8 h luego de la primera ingesta) no se puede descartar que puedan existir cambios en la estructura en otros momentos del día o variaciones en el metabolismo de la microbiota que no puedan ser detectadas mediante el abordaje utilizado. Estos resultados analizados en conjunto con lo observado en la sección 2 alientan la profundización de los estudios y justifican la utilización de otros abordajes como el estudio del transcriptoma ruminal asociado a distintos tratamientos.

## **8. SECCIÓN 4. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE *Prevotella bryantii* 3C5**

### **8.1. Introducción**

Para poder sostener la demanda a que están sujetos los rumiantes de importancia productiva en los sistemas intensivos o semi-intensivos se utilizan estrategias de manejo nutricional que involucran la administración de concentrados de carbohidratos y proteínas. Esta situación genera desórdenes en el equilibrio del ecosistema ruminal, se afecta la microbiota y ocasiona en los animales desórdenes y patologías metabólicas. En esas condiciones la eficiencia de aprovechamiento del alimento se ve afectada, lo que repercute en los aspectos económicos de la producción.

Con el fin de mejorar el resultado productivo y sostener los sistemas de producción la modulación de la microbiota y la fermentación ruminal ha captado el interés de profesionales veterinarios así como de investigadores. El agregado a la dietas de rumiantes de compuestos que modulan positivamente la fermentación ruminal provocan modificaciones de los procesos digestivos y metabólicos que se traducen en el aumento de la eficiencia de utilización de los alimentos. Entre los más usados están los

antibióticos (particularmente los ionóforos), los amortiguadores o sustancias buffer y también los probióticos (NRC, 2001; Krause y Oetzel, 2006).

El género *Prevotella* es el más representado en el rumen y es prevalente en el tracto gastrointestinal de los herbívoros y omnívoros. Hasta los años 90 sólo había descrito una especie: *Prevotella ruminicola* (Purshue et al., 2010). Avguštin et al. (1997) reclasificó aislamientos que se consideraban *P. ruminicola* y describió las especies *Prevotella bryantii*, *Prevotella brevis*, *Prevotella albensis* y redefinió a *P. ruminicola*. Estos organismos han sido utilizados en abordajes previos como posibles probióticos. En particular, *P. bryantii* ha sido empleada como probiótico en vacas en lactación y en situaciones en que los animales son cambiados a dietas ricas en concentrados energéticos, condiciones que promueven la acidosis (Chiquette et al., 2008; Chiquette et al., 2012; Rodriguez, 2003).

La acidosis es provocada por la ingestión de carbohidratos fácilmente fermentables en niveles mayores a los que normalmente puede tolerar el rumen. Como resultado de este alto nivel de carbohidratos se produce un rápido aumento en la producción de AGV con un concomitante descenso del pH (Stock y Britton, 1993).

En esta sección se describe la administración de *P. bryantii* 3C5 (Pb 3C5) a corderos sujetos a una alimentación que simulaba la de los sistemas semi-intensivos. La cepa Pb 3C5, fue aislada en un abordaje previo (Perelmuter, 2010) y mostró entre otros atributos la capacidad de crecer en un medio con ácido láctico como principal fuente de carbono y energía así como una tendencia a disminuir el número *Streptococcus bovis* en experimentos *in vitro*. Este patógeno está tradicionalmente asociado con la acidosis bovina.

*P. bryantii* 3C5 podría consumir el ácido láctico en el rumen y así podría favorecer en la prevención de los efectos de la acidosis.

En este ensayo se evaluó la capacidad *in vivo* de Pb 3C5 en modular la fermentación y el ambiente ruminal así como la estructura general de la microbiota.

## **8.2. Resultados**

### *8.2.1. Evaluación de la actividad del inóculo*

El potencial del inóculo de los animales tratados con *P. bryantii* 3C5 se analizó como en el numeral 7, sección 3. En la figura 8.2.1 se muestra el gráfico de gas acumulado a lo largo del tiempo para ambos grupos. Luego de ajustar los valores de gas acumulado al modelo de Schoefield se analizaron los parámetros de fermentación que se presentan en la tabla 8.2.1. No se registraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados. La concentración de metano en los fermentadores tampoco se vio afectada en el grupo tratado con Pb 3C5 al compararla con el grupo control (Fig. 8.2.2).

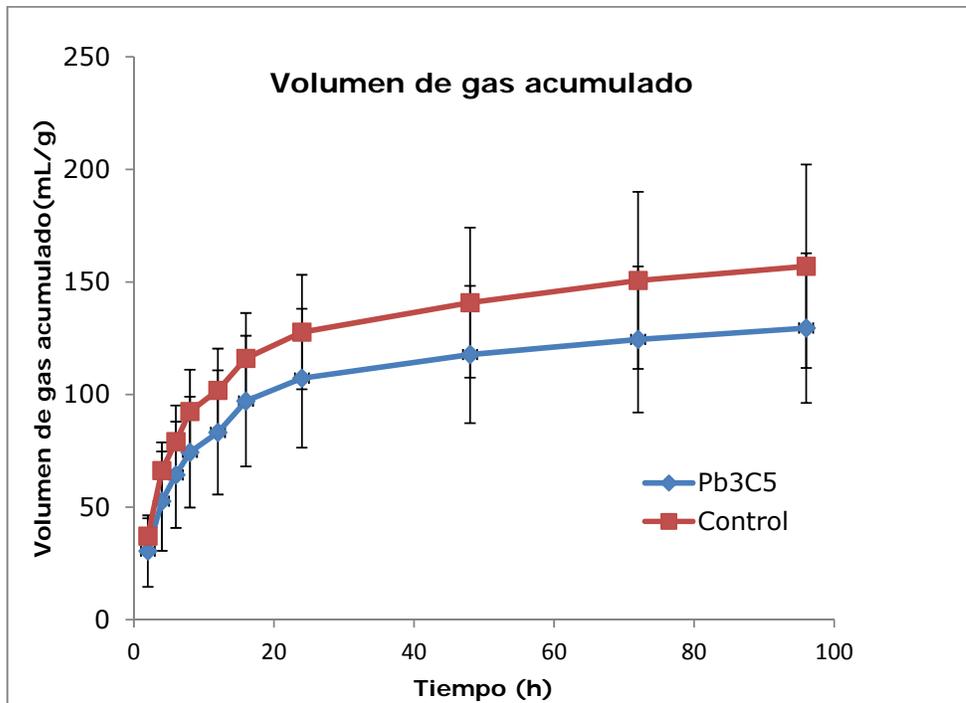
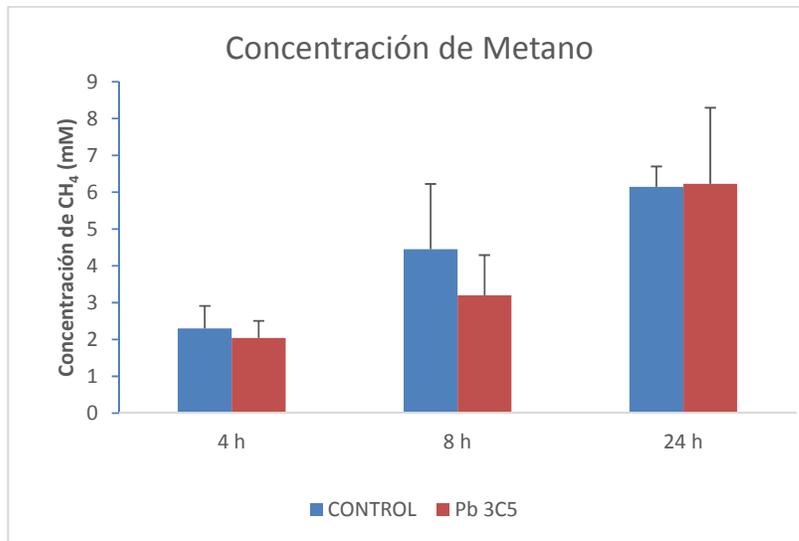


Figura 8.2.1. Volumen de gas acumulado en el tiempo. Se presentan las medias acumuladas del control y el tratamiento.

Tabla 8.2.1. Parámetros cinéticos de fermentación

Tratamiento	$V_1$ (mL/g)	$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	$L$ (h)	$V_2$ (mL/g)	$k_2$ (h <sup>-1</sup> )	$V_t$ (mL/g)
Control	82,86	0,167	-0,5	73,16	0,031	156,0
Tratamiento	71,82	0,149	-0,8	53,48	0,022	125,3
P <sup>a</sup>	0,61	0,42	0,48	0,08	0,22	0,16
ESM <sup>b</sup>	7,8	0,013	0,24	13,91	0,007	21,7

<sup>a</sup> P del tratamiento para cada parámetro. <sup>b</sup> Error estándar de la media



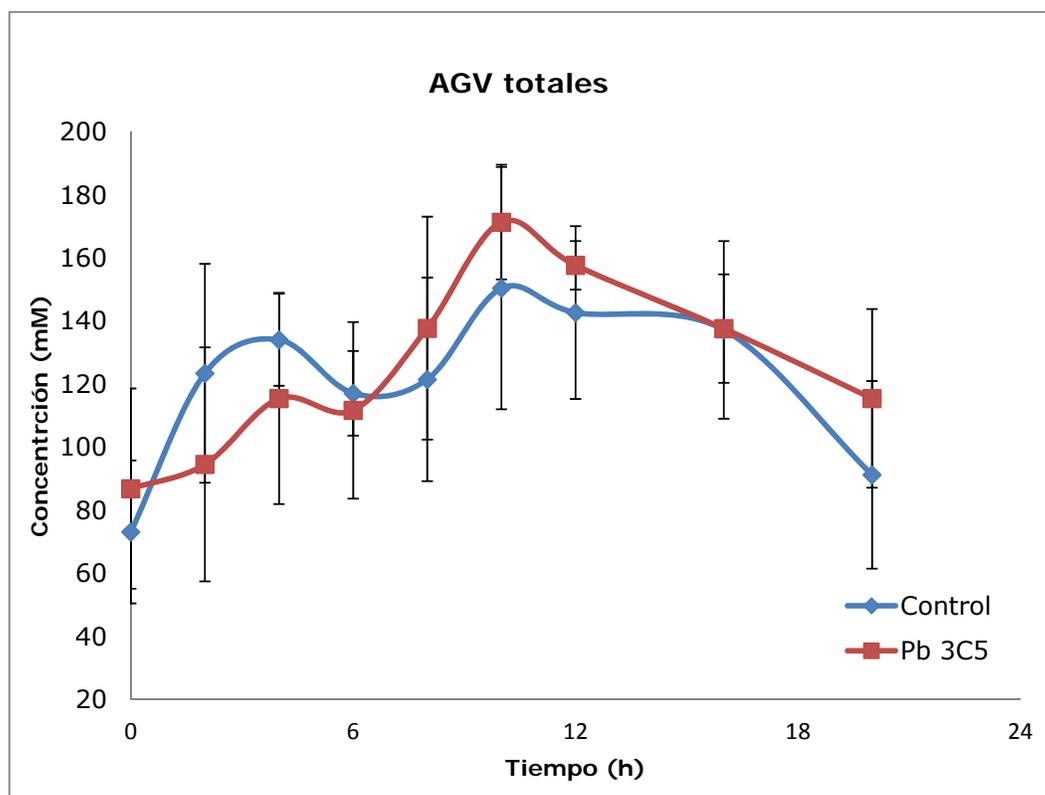
**Figura 8.2.2. Concentración de metano en los fermentadores del ensayo de potencial de inóculo.** Se presentan las medias y el DE de cada grupo a las 4, 8 y 24 h de incubación.

### 8.2.2. Ambiente ruminal

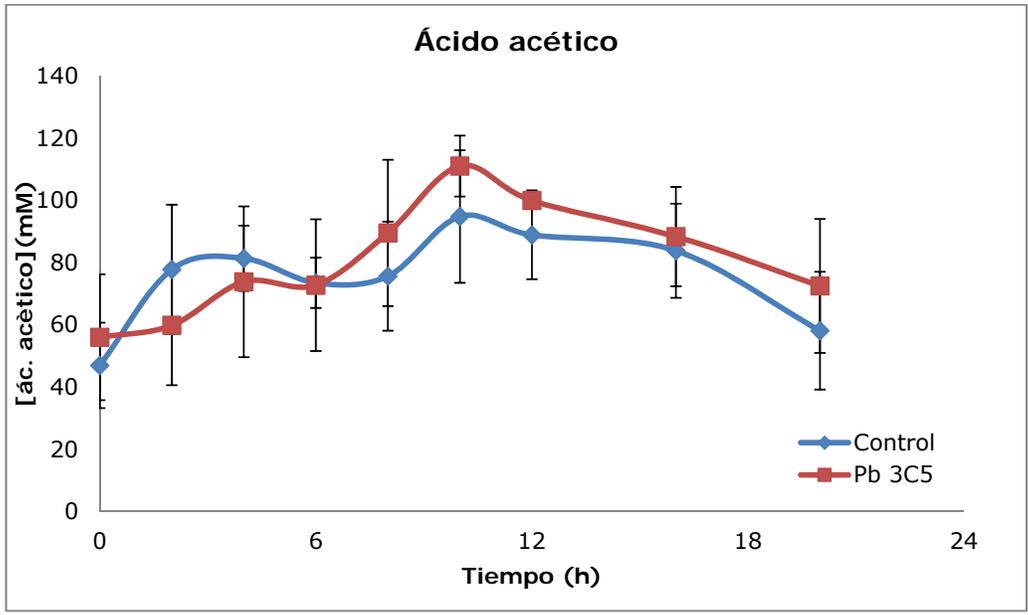
La variación diaria de los AGV totales se presenta en la figura 8.2.3. en la que se observa una tendencia en los animales tratados a presentar una concentración total diaria de AGV mayor que en los animales control ( $P = 0,0622$ ). La concentración de ácido acético fue mayor en los animales tratados con Pb3C5 que en los animales del grupo control ( $P = 0,0187$ ) con una media diaria superior en 17,7 mM (Fig. 8.2.4). No se registraron diferencias en la dinámica diaria del ácido propiónico ( $P = 0,8328$ , Fig. 8.2.5) pero sí hubo una mayor concentración de ácido butírico a lo largo del día en los animales tratados ( $P = 0,0199$ , Fig. 8.2.6.).

Como se puede ver en la figura 8.2.7., el pH ruminal de los animales en el grupo tratado presentó valores inferiores que los del grupo control a lo largo del día. Estas diferencias fueron significativas,  $P$  tratamiento = 0,006, y no hubo interacción tratamiento\*tiempo ( $P = 0,267$ ).

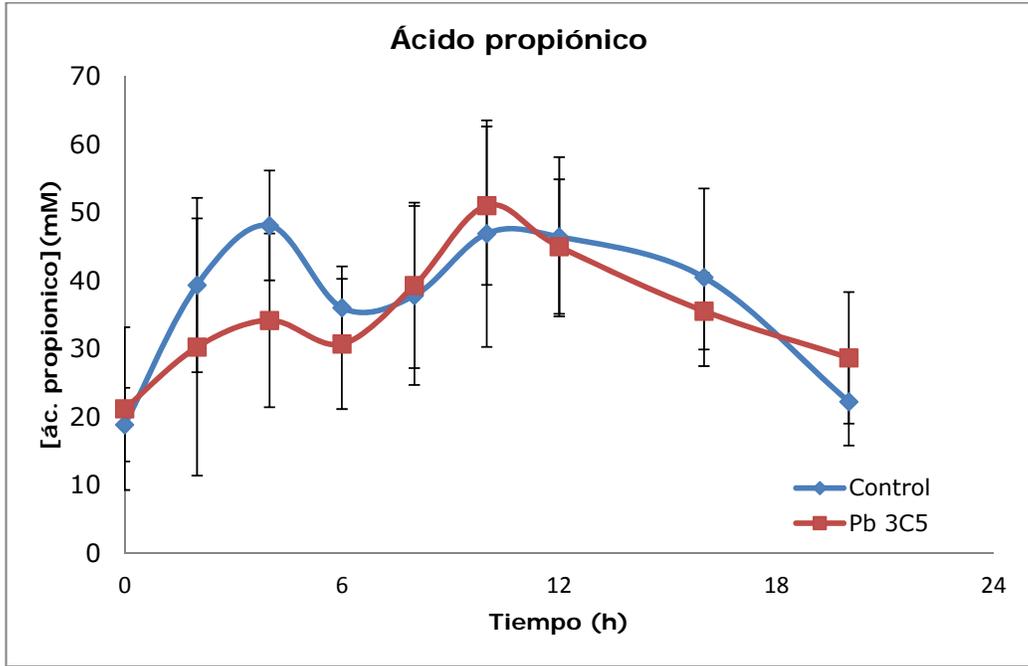
El comportamiento diario del amoníaco ruminal se presenta en la figura 8.2.8. La media diaria de nitrógeno amoniacal en los animales tratados con Pb 3C5 fue mayor que los animales en el grupo control ( $P = 0,05$ ), aunque no se registró interacción tratamiento\*tiempo.



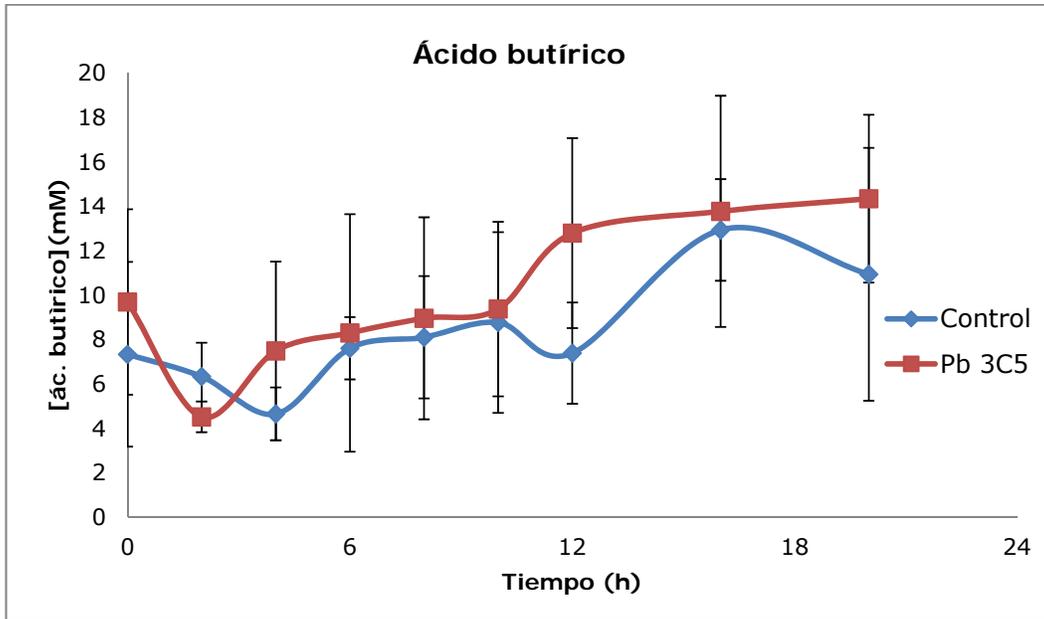
**Figura 8.2.3. Evolución diaria de AGV totales en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de AGV a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



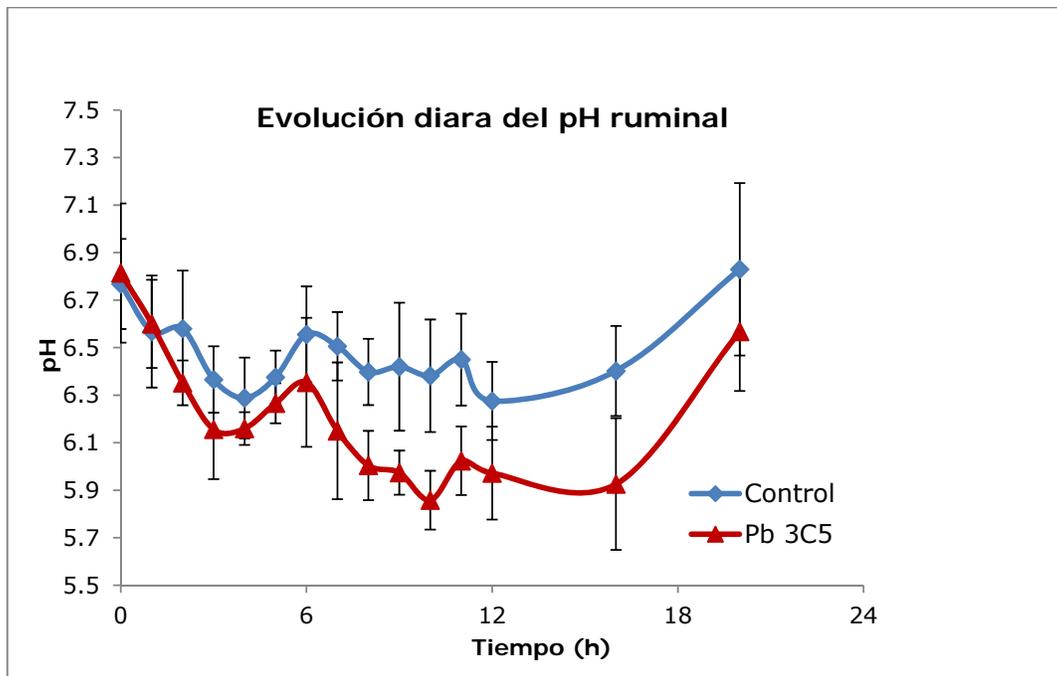
**Figura 8.2.4. Evolución diaria del ácido acético en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de ácido acético a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



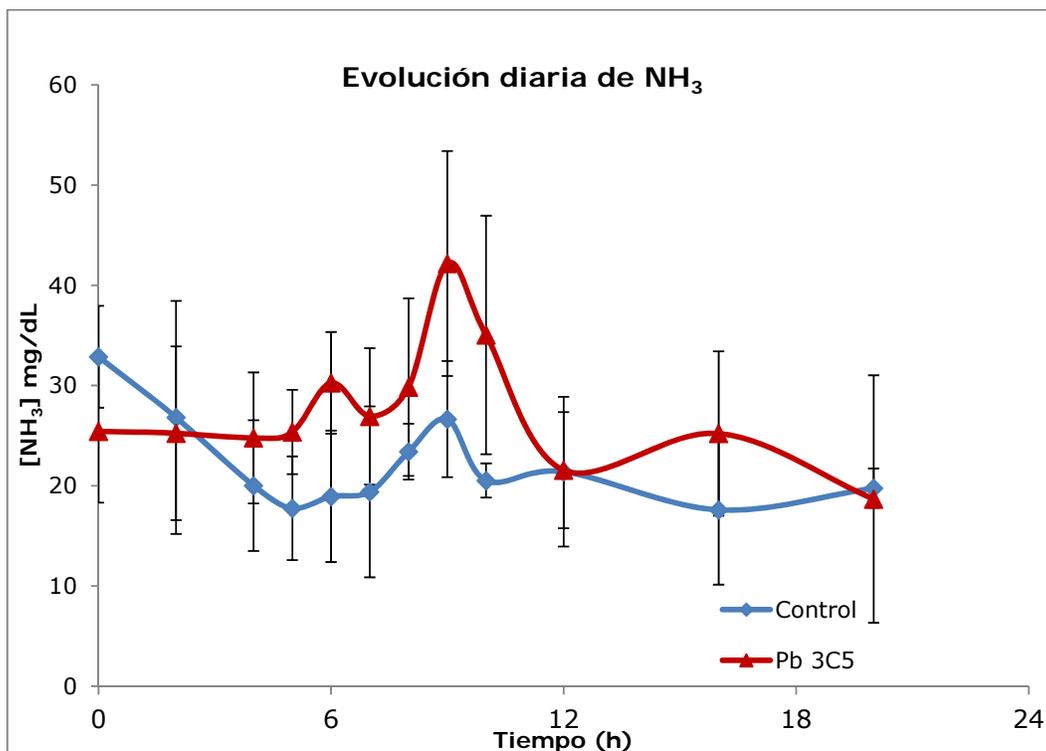
**Figura 8.2.5. Evolución diaria del ácido propiónico en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de ácido propiónico a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



**Figura 8.2.6. Evolución diaria del ácido butírico en el rumen.** Para cada grupo se presentan las medias de 5 animales y el DE de la concentración de ácido butírico a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



**Figura 8.2.7. Evolución diaria del pH ruminal.** Para cada grupo se presentan las medias de pH de 5 animales y el DE a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.



**Figura 8.2.8. Evolución diaria del NH<sub>3</sub> ruminal.** Para cada grupo se presentan las medias de la concentración de NH<sub>3</sub> de 5 animales y el DE a lo largo del día. La hora 0 corresponde a la primera ingesta de alimento, 8 AM.

### 8.2.3. Consumo y digestibilidad

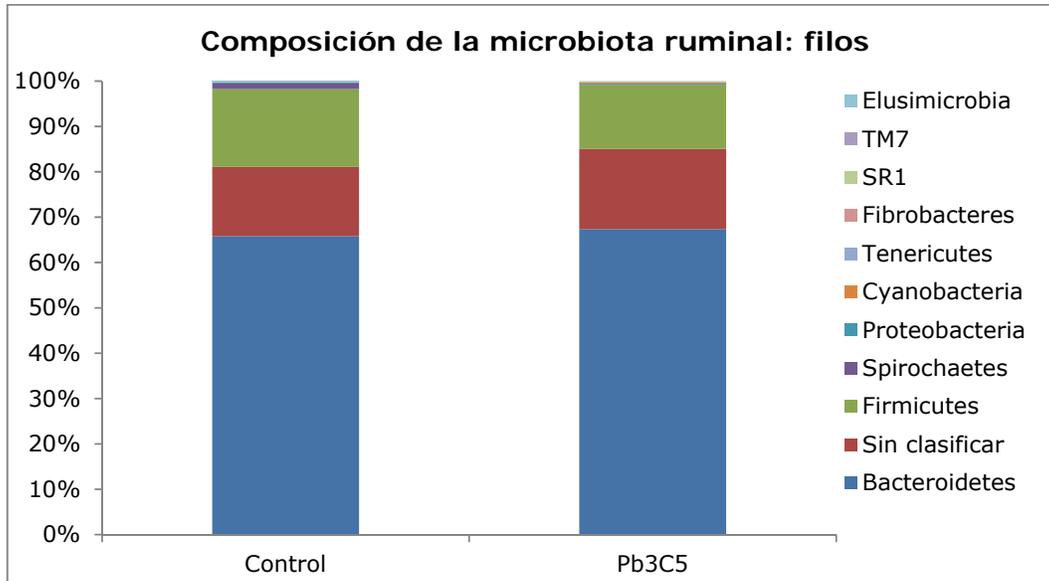
El grupo control mostró un consumo de materia seca promedio de 1340 g/día y una digestibilidad de la MATERIA SECA del 67 % mientras que los animales del grupo tratado con Pb 50C presentaron un valor promedial de 1297 g/día y digestibilidad del 66 %. No hubo diferencias significativas

entre los diferentes grupos en estos dos parámetros ( $P = 0,82$  y  $P = 0,80$  respectivamente).

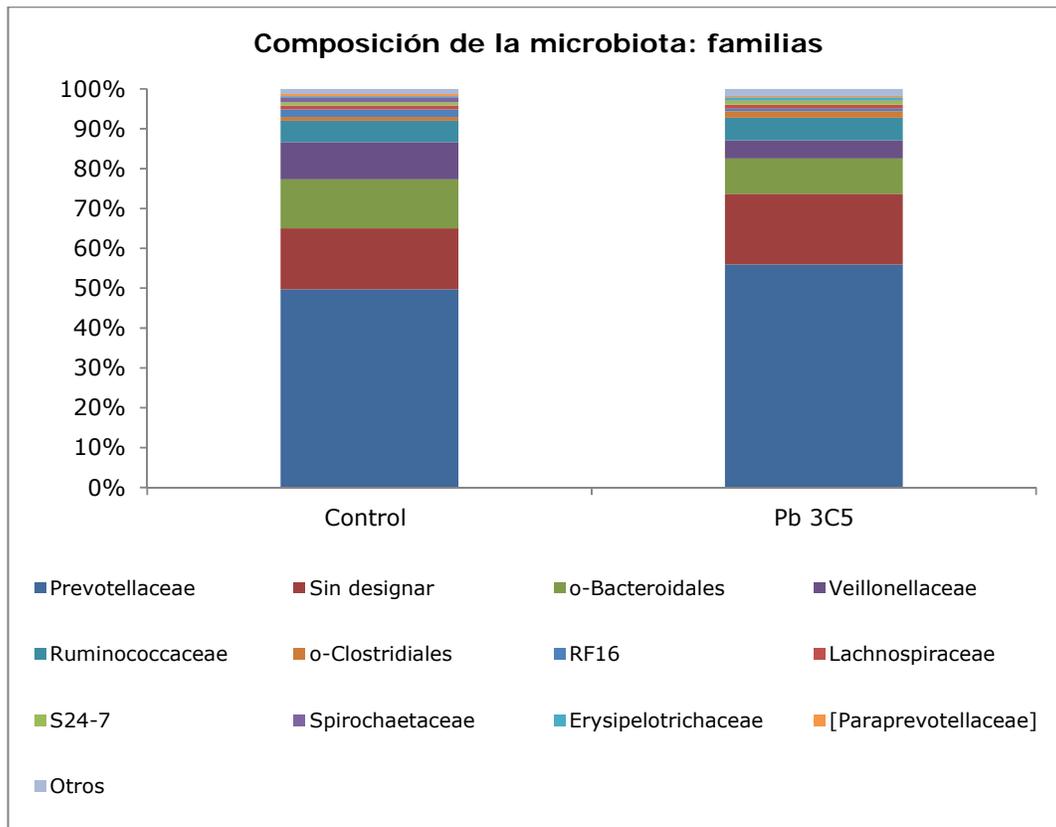
#### 8.2.4. Estructura de la comunidad microbiana

La comunidad bacteriana en los animales fue analizada a las ocho horas luego de la primera comida. Se analizaron en promedio 2588,6 ( $\pm 645,9$ ) secuencias por muestra. Las secuencias se clasificaron en 1987 OTUs. Más del 65 % de las secuencias se clasificaron dentro del filo *Bacteroidetes* mientras que el segundo filo más abundante fue Firmicutes, el 15,3 % de las secuencias del control y el 18,8 % de las secuencias obtenidas de los animales en el grupo tratado no pudieron ser clasificadas (Fig. 8.2.9). En este caso la familia *Prevotellaceae* fue también la más representada tanto en los animales tratados como en el control con el 56 y 50 % de todas las secuencias respectivamente (Fig. 8.2.10). Dentro de esta familia casi la totalidad de las secuencias pudieron ser clasificadas en el género *Prevotella* (Fig. 8.2.11)

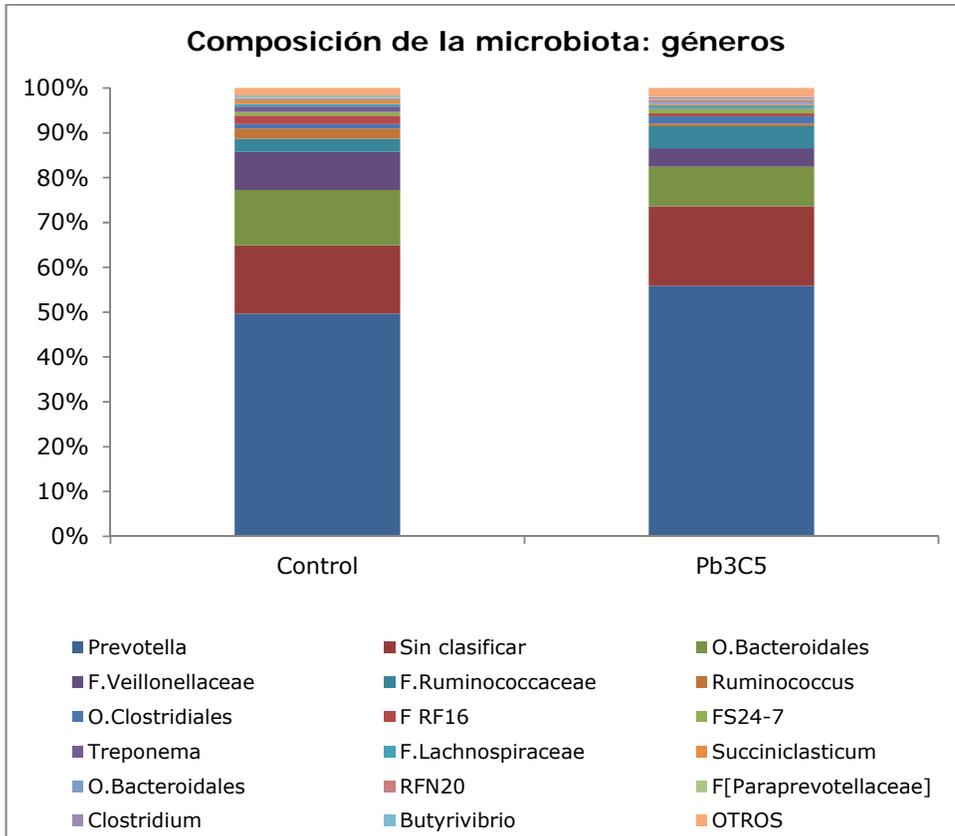
La estructura de las comunidades de los animales en ambos tratamientos fue muy similar como se observa en el análisis de componentes principales (Fig. 8.2.12,  $P$  ADONIS= 0,837;  $P$  ANOSIM = 0,712).



**Figura 8.2.9. Proporción media de los filos bacterianos presentes en los animales de los grupos tratado y el control.**



**Figura 8.2.10. Proporción media de las familias bacterianas presentes en el rumen de los animales de los grupos tratado y el control.**



**Figura 8.2.11. Proporción media de las géneros bacterianas presentes en el rumen de los animales del grupo tratado y del grupo control.**

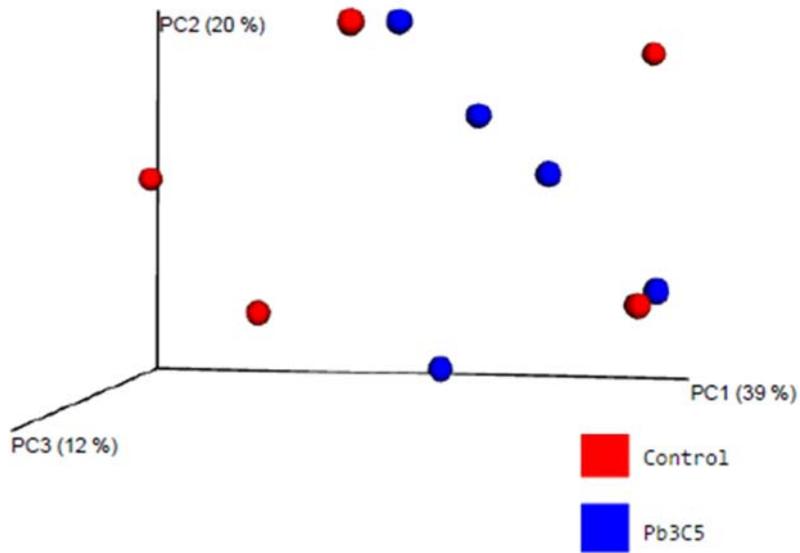


Figura 8.2.12. Análisis de componentes principales.

### 8.3. Discusión

En el rumen de los bovinos y ovinos coexisten los tres dominios de la vida, Bacteria, Eukarya y Archaea. Las bacterias son las más abundantes en números absolutos alcanzando valores en el orden de  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{11}$  cél/mL (Kumar et al., 2012). Lograr modular la microbiota y la fermentación ruminal por medio del agregado de probióticos es un desafío teniendo en

cuenta esos números y el nivel de células que se deberían inocular para lograr números significativos del potencial producto probiótico. Sin embargo, en este trabajo, se logró modificar el ambiente ruminal mediante el agregado de Pb 3C5 en bajas dosis sostenidas en el tiempo.

La administración de Pb 3C5 logró modificar el perfil de AGV en los animales tratados al compararlos con el control observándose una concentración mayor de AGV totales, de ácido acético y de ácido butírico (punto 8.2.2). Este efecto se vio reflejado en el hecho que los animales del grupo tratado mostraron medias de pH inferiores a las del control (punto 8.2.2, Fig. 8.2.7). Dado que el ácido acético es el AGV predominante en el rumen representando más del 70 % de los AGV totales, su aumento podría explicar la tendencia observada en el incremento de los AGV totales.

Los valores de pH inferiores al control que mostraron los animales tratados con Pb 3C5 estarían relacionados con la mayor concentración de ácidos orgánicos en estos últimos, si bien serían desfavorables del punto de vista de la prevención de las acidosis, es de destacar que no ubican a los animales en situaciones peligrosas del punto de vista de una posible patología. Los rumiantes muestran signos de acidosis subclínica cuando se sostienen valores de pH entre 5,2 y 5,6 (Duffield et al., 2004) y manifiestan acidosis aguda con niveles de pH por debajo de 5,2 (Mutsvangwa et al., 2002).

También las modificaciones del ambiente ruminal se evidenciaron al analizar la dinámica de producción de amoníaco ruminal. Este importante precursor de proteína microbiana mostró en el rumen de los animales tratados concentraciones medias diarias superiores a las de los animales del grupo

control (numeral 8.2.2, Fig. 8.2.8). Estas concentraciones siempre estuvieron por encima de los valores mínimos necesarios para el correcto crecimiento microbiano y por ende de síntesis proteica (Dixon y Egan, 1988) y fueron similares a los valores encontrados en corderos en experimentos similares al presente (Perez-Ruchel et al., 2013; Pérez-Ruchel et al. 2014).

Estos cambios se vieron sin afectar la producción potencial de metano o la producción de gas y los parámetros de fermentación ruminal en los ensayos de producción de gas *in vitro*. En estos ensayos se analizó la capacidad del fluido ruminal de los animales en los distintos tratamientos en fermentar un sustrato similar al que consumían los animales. Tampoco se vio afectada la composición de la microbiota ruminal (numeral 8.2.4) o la digestibilidad de la materia orgánica (punto 8.2.3).

La composición de la microbiota ruminal de los animales tratados no se vio afectada por la administración de Pb 3C5 a las 8 h luego de la primera comida. Este hecho, que se observó también en el numeral 7, sección 3 de este trabajo, podría deberse a que sólo se analizó una hora determinada en todos los animales. La microbiota de los animales en ambos grupos estuvo dominada por los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes* con el género *Prevotella* como el dominante, resultado que, como se dijo anteriormente, coincide con otros estudios de la microbiota ruminal (Jami y Mizrahi, 2012; Zened et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2014; Jami et al., 2014).

Con los resultados actuales no es posible relacionar con certeza a miembros específicos de la microbiota ruminal con los cambios que se evidenciaron en el ambiente ruminal. En abordajes similares pero en seres humanos, se vio

que si bien las comunidades microbianas eran similares se evidenciaban diferencias a nivel del transcriptoma de la comunidad (McNulty et al., 2011). Un abordaje futuro que considere estas posibilidades podrá arrojar luz sobre la posibilidad de evaluar los cambios a nivel metabólico de la microbiota ruminal modulada por probióticos.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se identificaron bacterias aisladas del contenido ruminal de un rumiante que estaba en un régimen de pastoreo exclusivo. Varios de los aislamientos corresponden a especies sin describir e incluso a nuevos géneros (Sección 1). Entre las bacterias identificadas se destacan miembros del género *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* de acuerdo a la frecuencia de aislamiento. Los resultados de esta sección fueron publicados (Fraga et al., 2013) y el artículo correspondiente se adjunta a este documento.

En la sección 2 de este trabajo se caracterizó el potencial *in vitro* de un conjunto de cepas en su capacidad de modular la fermentación ruminal. La modulación lograda implicó diferencias en los perfiles de AGV generados así como diferencias en la dinámica de fermentación, en particular la cepa Pr 50C mostró una mayor concentración de ácido butírico a la hora 8 de incubación al compararla con los fermentadores control. Este efecto ya se había observado en un abordaje anterior similar al utilizado en este trabajo pero donde se utilizaron otros compuestos como sustratos para la fermentación (Fraga et al., 2014). En la sección 2 se utilizó como sustrato una mezcla de alfalfa y maíz molido intentando simular la alimentación que finalmente se utilizaría en el experimento de las secciones 3 y 4. La cepa Pr 50C mostró el mismo comportamiento que se observó *in vitro* en el modelo de administración induciendo una mayor concentración de ácido butírico en el rumen de los animales en el tratamiento. Este hecho consolida el valor de las aproximaciones experimentales que se utilizaron para evaluar la

modulación ruminal *in vitro*. Es de destacar que los experimentos *in vitro* utilizados son cerrados a diferencia de un sistema experimental *in vivo* en que existe remoción de sustratos y desechos. Los resultados de la sección 2 de este trabajo fueron publicados (Fraga et al, 2015) y el artículo correspondiente se adjunta a este manuscrito.

La administración de Pr 50C indujo cambios en el ambiente ruminal sin modificar la producción potencial de metano, la dinámica de producción de gas del fluido ruminal de los animales en el tratamiento ni la estructura general de la microbiota ruminal (sección 3). La mayor concentración de ácido butírico observada en el rumen de los animales ya se había observado en las aproximaciones *in vitro* como se mencionó anteriormente. Esta cepa, si bien no modificó la concentración del amoníaco del rumen, indujo un cambio en la dinámica de producción de este compuesto. Resultados similares se observaron con la administración de Pb 3C5 (sección 3). La administración de esta cepa indujo una mayor concentración de AGV totales, ácido acético y butírico y también indujo una mayor concentración diaria de amoníaco ruminal.

La composición de la microbiota ruminal tanto en los animales de los tratamientos y del control así como en los fermentadores fue similar y coherente con la reportada tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. Estos resultados junto con las observaciones en cuanto al comportamiento de Pr 50C vuelve a resaltar los abordajes utilizados.

La administración de estas cepas en bajas cantidades mostró que es posible generar cambios en el ambiente ruminal de animales en situaciones de cría semi-intensiva. Si bien hubo resultados contradictorios con una mejora en

la producción animal (como la disminución del ácido propiónico al administrar Pr 50C), se justifica seguir explorando estas estrategias ya que se pudo demostrar que es posible generar cambios en el rumen en base a estas aproximaciones. La administración de nuevas cepas o incluso combinaciones de cepas servirá para diseñar estrategias de modulación dirigidas a resultados productivos específicos.

## 10. AGRADECIMIENTOS

A Pablo Zunino y Cecilia Cajaville, Directores de la Tesis y amigos.

Al IIBCE y al Departamento de Microbiología por incubarme durante tantos años y permitirme llegar.

Al Departamento de Nutrición de Facultad de Veterinaria y a su equipo por la ayuda que me brindaron.

A la ANII, por la beca de doctorado (POS 2011\_3374), la financiación de los proyectos FMV\_2799 y FCE\_2493 y la financiación de una beca de movilidad (MOV\_10852).

¡A la Colonia! Por todos estos años de aprender y enseñar juntos.

A Nicolle Pomiés y a Maximiliano Pastorino, sin ustedes no hubiese salido.

A Juan Andrés Abin y Marcela Martínez por la ayuda y soporte en los análisis

A Andrea Azcárate, por recibirme en Chapel Hill, a Belén Cárdenas por el apoyo y por ser una excelente compañía.

A los que me ayudaron en el campo y en el laboratorio: Luis Vázquez, Paola Delgado, Paola San Pedro, Diego Fernández, Cristina Manzzi, Bruno Cremella, Virginia Ramón, Ernesto Rosas. A Adriana, a Helena y a todo el personal del Campo experimental.

A Sofía, mi "chiquita", estoy orgulloso de vos, de corazón.

A Claudia, amiga de la vida, compañera de muchos "viajes", soporte mutuo en el laboratorio y en la vida. Algún día me gustaría entender la Microbiología cómo vos la entendés.

A Paola, amiga desde la Licenciatura, compañera de estudio, nadie como vos me dice qué hacer con el STATISTICA.

A Anirrra, que siempre me explica cosas con una sonrisa.

A Karina, que siempre está dispuesta a compartir lo que sabe.

Otra vez a Pablo, por enseñarme, por hacerme enojar, porque gracias a vos hoy soy un investigador. Gracias.

A Vanessa. A Patricia.

A mis padres. A hermanini. A Gonzalo.

A **Emilia**, por ser una luz.

A **Fede**. Mi compañero, mi apoyo, mi aliento, mi música. Gracias, gracias, gracias.

**A todos los que tuvieron que ver con esto, Gracias.**

## 11. BIBLIOGRAFÍA

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.

A.O.A.C. 1990. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 15th ed. AOAC, Arlington VA.

Avguštin G, Wallace RJ, Flint, HJ. 1997. Phenotypic Diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: Proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella byantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *Int J Syst Bacteriol* 47: 284-288.

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

Caldwell DR, Bryant MP. 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl Microbiol* 14:794-801.

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](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/05CAP_VIII.pdf)

Calsamiglia S, Castillejos L, Busquet M. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. En: Smith P, Wiseman J (eds) Recent Advances in Animal Nutrition , Nottingham University Press, Nottingham, pp 129–167

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, González Peña A, Goodrich JK , Gordon JI , Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE , Ley RE , Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M , Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA , Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Meth 7:335–336.

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.

Castro-Carrera T, Toral PG, Frutos P, McEwan NR, Hervás G, Abecia L, Pinloche E, Girdwood SE, Belenguer A. 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. J Dairy Sci 97:1–9.

Chauchehyras-Durand F, Durand H. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. Benef Microbes 1:3-9.

Cherdthong A, Wanapat M. 2013. Manipulation of *in vitro* ruminal fermentation and digestibility by dried rumen digesta. Livest Sci 153:94–100.

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.

Chiquette J, Allison MJ, Rasmussen M. 2012. Use of *Prevotella bryantii* 25A and a commercial probiotic during subacute acidosis challenge in midlactation dairy cows. *J Dairy Sci* 95:1-11.

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.

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.

Dehority BA. 1991. Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. *Proc Nutr Soc* 50:149-159.

Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* 62:313-322.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. 2006. Greengenes, a Chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069–5072.

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

Dixon RM, Egan AR. 1988. Strategies for optimizing use of fibrous crop residues as animal feeds. En: Dixon RM (ed) *Ruminant Feeding Systems Utilizing Fibrous Agricultural Residues*, pp 11–26. International Development Program of Australian Universities and Colleges, Canberra, Australia.

Duffield T, Plaizier JC, Fairfield A, Bagg R, Vessie G, Dick P, Wilson J, Aramini J, McBride BW. 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 87:59–66.

Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.

Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids res* 17:7843-53.

Elghandour MMY, Salem AZM, Martínez Castañeda JS, Camacho LM, Kholif AE, Vázquez Chagoyán JC. 2015. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *J Integr Agr* 14:526–533.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17994-17999.

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.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London. Ontario. Canada. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

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.

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

Fraga M. 2010. Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Fac. de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Fraga M, Perelmuter K, Valencia MJ, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Cajarville C, Zunino P. 2014. Evaluation of native potential probiotic bacteria using an *in vitro* ruminal fermentation system. *Ann Microbiol* 64:1149-1156.

Fukuma N, Koike S, Kobayashi Y. 2012. Involvement of recently cultured group U2 bacterium in ruminal fiber digestion revealed by coculture with *Fibrobacter succinogenes* S85. *FEMS Microbiol Lett.* 336:17-25.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9pp.

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

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Berni Canani R, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11:506–514.

Hippe H, Hagelstein A, Kramer I, Swiderski J, Stackebrandt E. 1999. Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propionivibrio 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.

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

Instituto Nacional de Carnes. 2013.. Anuario Estadístico. Disponible en <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/9245/1/innova.net/anuario-estadistico-2013>

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2013. Fifth Assessment Report: Climate change 2013, The physical science basis, Cambridge Univ. Press, 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.

Jami E, Mizrahi I. 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS ONE* 7: e33306.

Jami E; White BA; Mizrahi I. 2014. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS ONE* 9:e85423.

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

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.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol Evol* 16:111-120.

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

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

Kong Y, Xia Y, Seviour R, He M, McAllister T, Forster R. 2012. In situ identification of carboxymethyl cellulose-digesting bacteria in the rumen of cattle fed alfalfa or triticale. *FEMS Microbiol Ecol* 80: 159–167.

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

Krause 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.

Krause K, Oetzel G. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim Feed Sci Technol* 126: 215-236.

Kumar S, Singh N, Singh S, Kumar A. 2012. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:1135–1154.

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

Kung Jr L. 2006. Direct-fed microbial and enzyme feed additives. En 2006 Direct-Fed Microbial, enzyme and forage additive compendium. Miller Publishing, Minnetonka, MN.

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.

Lavrenčič A, Levart A, Košir IJ, Čerenak A. 2014. In vitro gas production kinetics and short-chain fatty acid production from rumen incubation of diets supplemented with hop cones (*Humulus lupulus L.*) *Animal* 9:576-581.

Li R W, Connor EE, Li C, Baldwin VI RL, y Sparks ME. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14:129–139.

Mackie RI. 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integr Comp Biol* 42:319–326.

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 S. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J Anim Sci* 76:3123-3132.

McAllister TA, Newbold CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust J Exp Agri.* 48:7–13.

McAllister TA, Meale SJ, Valle E, Guan LL, Zhou M, Kelly WJ, Henderson G, Attwood GT, Janssen PH. 2015. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Use of genomics and transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis. *J Anim Sci* 93:1431–1449.

McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette Jr FM, Tedeschi LO. 2014. Relationship between the Rrumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on Bermudagrass pastures. *PLoS ONE* 9: e91864.

McNulty NP, Yatsunenkov T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, Henrissat B, Oozeer R, Cools-Portier S, Gobert G, Chervaux C, Knights D, Lozupone CA, Knight R, Duncan AE, Bain JR, Muehlbauer MJ, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI. 2011. The impact of a consortium of fermented milk

strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med* 3:106ra106.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. 2014. Anuario estadístico agropecuario 2014.

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

Mizrahi I. 2013. Rumen Symbioses. En: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt, eds. *The Prokaryotes*, Springer. pp 533-544.

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.

Moss A, Jouany J, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech* 49: 231–253.

Mutsvangwa T, Walton JD, Plaizier JC, Duffield TF, Bagg R, Dick P, Vessie G, McBride BW. 2002. Effects of a monensin controlled-release capsule or premix on attenuation of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 85:3454–3461.

Nagaraja TG, Avery TB, Bartley EE, Roof SK, Dayton AD. 1982. Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. *J Anim Sci* 54:649-658.

NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7<sup>o</sup> Revised Edition. National Academy Press. Washington D.C.

Nyonyo T, Shinkai T, Mitsumori M. 2014. Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen. *FEMS Microbiol Ecol* 88:528–537.

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.

Okafor CC, Grooms DL, Bruning-Fann CS; Averill JJ, Kaneene JB. 2011. Descriptive Epidemiology of Bovine Tuberculosis in Michigan (1975–2010): Lessons Learned. *Veterinary medicine International*. ID 874924, 13pp.

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. 2010. Aislamiento y caracterización de bacterias nativas de rumen bovino con potencial probiótico para su utilización en el control de la acidosis bovina. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C, 2013. Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 97: 1043 – 1050.

Pérez-Ruchel A.; Repetto J.L.; Cajarville C., 2014. Use of NaHCO<sub>3</sub> and MgO as additives for sheep fed only pasture for a restricted period of time per day: effects on intake, digestion and the rumen environment. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 98:1068-1074.

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.

Pitta DW, Pinchak WE, Dowd SE, Osterstock J, Gontcharova V, Youn E, Dorton K, Yoon I, Min BR, Fulford JD, Wickersham TA, Malinowski DP. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from Bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb Ecol* 59:511–522.

Pitta DW, Kumar S, Vecchiarelli B, Shirley DJ, Bittinger K, Baker LD, Ferguson JD, Thomsen N. 2014. Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. *J Anim Sci* 92:4014-4022.

Puniya AK, Abdelfattah ZM, Kumar S, Dagar SS, Griffith GW, Puniya M, Ravella SR, Kumar N, Dhewa T, Kumar R. 2015. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. *J Integ Agr* 14:550–560.

Purushe J, Fouts DE, Morrison M, White BA, Mackie RI, the North American Consortium for Rumen Bacteria, Coutinho PM, Henrissat B Nelson KE. 2010. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: Insights into Their Environmental Niche. *Microb Ecol* 60:721–729.

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

Ricke SC, Martin SA, Nisbet DJ. 1996. Ecology, metabolism, and genetics of ruminal selenomonads. *Crit Rev Microbiol.* 22:27-56.

Roberfroid M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 137:830S-837S.

Rodríguez F. 2003. Control of lactate accumulation in ruminants using *Prevotella bryantii*. Retrospective Theses and Dissertations. Paper 615.

<http://lib.dr.iastate.edu/rtd/615>.

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.

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

Seo JK, Kim S-W, Kim MH, Upadhaya SD, Kam DK, Ha JK. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australian J Anim Sci* 23:1657-16679.

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.

Sizova MV, Muller PA, Stancyk D, Panikov NS, Mandalakis M, Hazen A, Hohmann T, Doerfert SN, Fowle W, Earl AM, Nelson KE, Epstein SS. 2015. *Oribacterium parvum* sp. nov. and *Oribacterium asaccharolyticum* sp. nov., obligately anaerobic bacteria from the human oral cavity, and emended description of the genus *Oribacterium*. Int J Syst Evol Microbiol 64:2642-2649

Soto EC, Molina-Alcaide E, Khelil H, Yáñez-Ruiz DR. 2013. Ruminant microbiota developing in different *in vitro* simulation systems inoculated with goats' rumen liquor. Anim Feed Sci Technol 185:9-18.

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

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

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

Stock R, Britton RA. 1993. Acidosis in feedlot cattle. En: Scientific Update on Rumensin/Tylan for the Professional Feedlot Consultant. Indianapolis, IN. Elanco Anim Health: A1-A16.

Storm E, Ørskov ER. 1983. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. Br J Nutr 50:463-470

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.

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.

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, Zaragoza M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? Gac Sanit 16:109-12.

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

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.

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

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

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

Wu S, Baldwin 6th RL, Li W, Li C, Connor EE, Li RW. 2012. The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. Metagenomics 1:1-11.

Yang W Z, Beauchemin K A, Vedres D D, Ghorbani G R, Colombatto D, Morgavi D P. 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Anim Feed Sci Technol* 114:179–193.

Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, Troegeler-Meynadier A, Enjalbert F. 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 504–514.

Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

**12. ANEXO Artículos: Fraga et al. 2013; Fraga et al. 2015**