



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

### **GANADERÍA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Streptococcus bovis* Y  
ESTUDIO INICIAL PARA AISLAMIENTO DE SU BACTERIOFAGO**

**SERAFÍN JACOBO LÓPEZ GARRIDO**

### **T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

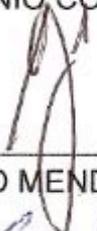
2008

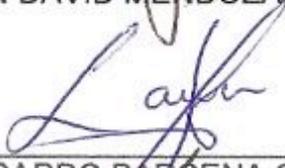
La presente tesis, titulada: **Aislamiento y caracterización de *Streptococcus bovis* y estudio inicial para el aislamiento de su bacteriófago**, realizada por el alumno: **Serafín Jacobo López Garrido**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO   
DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR   
DR. GERMAN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

ASESOR   
DR. RICARDO BARCENA GAMA

ASESOR   
DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Edo de México, julio de 2008.

# **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Streptococcus bovis* Y ESTUDIO INICIAL PARA AISLAMIENTO DE SU BACTERIÓFAGO**

**Serafín Jacobo López Garrido**

**Colegio de Postgraduados, 2008**

El objetivo del presente estudio fue obtener un cultivo puro de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis* a partir de líquido ruminal de ovinos alimentados con una dieta alta en sorgo (70 % en base seca). Además, se analizó su actividad fermentativa (producción de AGV y lactato) y el proceso de liofilizado como método de conservación, y se realizaron ensayos para expresar su bacteriófago. Para el aislamiento se usó un medio comercial para *Streptococcus spp.* (Merck) preparado bajo anaerobiosis. Para la identificación se usó el sistema API 20 Strep, reacción catalasa, morfología celular y tinción de Gram. Con la prueba API 20 Strep se comprobó que la bacteria aislada pertenece a la especie *S. bovis*. Esta bacteria tiene forma esférica a ovoide, de 0.8 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, es Gram positiva, no mótil, no forman esporas, catalasa negativo y se agrupa en pares o en cadenas de cuatro a ocho células. Su tiempo de generación en un medio a base de glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR) fue de 14 min. En medio GCA-FR, esta bacteria presentó una fermentación láctica-acética después de 4 h de incubación, con una producción de acetato, propionato, butirato y lactato de 17.48, 0.88, 0.54 y 39.93 mmol, respectivamente. La concentración total de la bacteria *S. bovis* fue de  $25 \times 10^{10}/\text{g}$  y de  $20 \times 10^{10}/\text{g}$  antes y después del proceso de liofilización; con una viabilidad bacteriana de 80 %, lo que permite concluir que el proceso de liofilizado es un excelente método de conservación. Se usó mitomicina (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de medio de cultivo) y cloroformo (1 mL/5 mL de medio) para inducir la expresión del bacteriófago contra *S. bovis*. Aunque se logro inducir unidades formadoras de placas (UFPL) con ambos reactivos, la mitomicina dio mejores resultados ( $1.4 \times 10^4$  UFPL/mL de medio de cultivo). Sin embargo, no siempre se logro inducir la fase lítica del bacteriófago, por tanto se sugiere evaluar una concentración mayor de mitomicina en los medios de cultivo.

**Palabras clave:** rumen, *Streptococcus bovis*, aislamiento, liofilización, bacteriófago.

# ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Streptococcus bovis*, AND INITIAL STUDIES FOR ITS BACTERIOPHAGE ISOLATION

Serafín Jacobo López Garrido

Colegio de Postgraduados, 2008

The objective of this study was obtain a pure culture of the rumen bacteria *Streptococcus bovis* from the rumen liquid of lambs fed a high sorghum grain diet (70 % dry matter basis). Also, the fermentative activity (VFA and lactate production) the freeze dry process as method of bacteria conservation were analyzed and assays to express its bacteriophage were analyzed. A commercial medium for *Streptococcus spp.* (Merk) made under anaerobic conditions was used for isolation. The API 20 Strep, catalase reaction, cell morphology and Gram reaction were used for bacteria identification. It was confirmed that the isolated bacteria belongs to the species *S. bovis* with the API 20 Strep test. This bacterium is spherical or ovoid in shape, 0.8 to 1.5  $\mu\text{m}$  in diameter, Gram positive, non motile, non sporing, catalase negative, occurring in pairs or in chains containing 4-8 cells. Its generation time was 14 min in a glucose, cellobiose, starch, and ruminal fluid medium (GCS-RF). After 4 h of incubation in GCS-RF medium this bacteria showed a lactate-acetate fermentation, with an acetate, propionate, butyrate and lactate production of 17.48, 0.88, 0.54 and 39.93 mmol, respectively. The *S. bovis* concentration was  $25 \times 10^{10}/\text{g}$  and  $20 \times 10^{10}/\text{g}$  before and after the lyophilization process; with 80 % of cell viability, it is concluded that the lyophilization process is an excellent method for conservation. Mytomicin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and chloroform (1mL/5mL of culture medium) were used to induce the bacteriophage against *S. bovis*. With both reactives it was produced plaque forming units (PLFU), but mytomicin gave better results ( $1.4 \times 10^4$  PLFU/mL of culture medium). However, not always it was possible to induce the bacteriophage lytic phase, it is suggested to evaluate a high concentration of mytomicin in the culture medium.

**Key words:** rumen, *Streptococcus bovis*, isolation, lyophilization, bacteriophage

*Eres lo que tu más profundo y vigoroso  
deseo es.  
Como es tu deseo, es tu voluntad.  
Como es tu voluntad, son tus actos.  
Como son tus actos, es tu destino.  
-Brihadaranyaka Upanishad IV. 4.5*

Dedico esta tesis a:

Dios, por otorgarme la vida y permitirme gozar de las maravillas de este mundo, por todos los momentos de felicidad, de esperanza y de tristeza que me hicieron crecer como ser humano; por permitirme alcanzar una meta importante más de mi vida.

Dedico este trabajo a todas las personas que han compartido parte de su vida conmigo. Muy especialmente a mi esposa: Martina Ruiz Mercado, que sin dudar ha sido mi compañera y guía durante este viaje, por su profunda comprensión y su amor sin límites.

A mis hijos: Fidel Jacobo, José Roberto, Rocío Trilce y Alma Carolina que son el tesoro más valioso de mi vida y sus vidas llenas de esperanza iluminan el sendero que camino.

Como un homenaje a mis padres: Roberto López Trejo y Margarita Garrido Lobato que con su gran amor y ejemplo me han enseñado que los sueños no tienen límites y cuando uno lo decida se hacen realidad.

A mis hermanos: Albertina, Alicia+, Luis, Jovita, Crescencio y Pablo, que me han entregado su amor y cariño, y desde niño con ternura guiaron mis primeros pasos.

A mis suegros: Ángel Ruiz Chávez y Catalina Mercado Soto, y cuñados que me han brindado todo su cariño y comprensión y por estar siempre pendiente de mi familia.

A mis amigos: MVZ. Lorenzo Quiroz, Dr. Mario Cobos, Dr. Raúl Ricalde+, Dr. Germán Mendoza, David Hernández Sánchez, Enrique Guerra y Carlos , que han sido un ejemplo a seguir y sus enseñanzas ya forman parte de mi existencia. A mis compañeros: Alejandro, Marcos (Sato) y José Luis que compartimos esperanza, deseos de superación con profunda esperanza y alegría.

A mis demás familiares y a las personas que ya han partido de este mundo, pero que han dejado una marca imborrable en mi corazón.

Por todo el amor que me han dado a veces sin merecerlo...

Gracias por haberme regalado parte de su vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México por su nobleza, por darme la oportunidad de superarme a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados que han financiado parte de mi formación profesional. Al fondo sectorial SAGARPA – CONACYT, por su apoyo económico para la realización de esta investigación a través del proyecto SAGARPA – 2002 – C01- 1149 “Tratamiento de acidosis ruminal subclínica en ganado lechero de carne mediante el uso de un bacteriófago específico contra *Streptococcus bovis*”.

A las personas integrantes de mi Consejo Particular: Al Dr. Mario A. Cobos Peralta, por orientarme en una de las etapas culminantes de mi formación profesional, por compartir generosamente su sabiduría, a quien admiro por su sencillez y profesionalismo, por ser más que un amigo y enseñarme que el ser humano a pesar de las adversidades puede alcanzar todas las metas que se proponga.

Al Dr. Germán Mendoza Martínez, que admiro por su entrega y pasión a la ciencia pecuaria y por su trabajo que ha trascendido las fronteras del país, por su constante búsqueda e innovación.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gama, por poner en alto nivel el trabajo del profesionista del campo y por buscar los espacios de jerarquía que le corresponden a los profesionistas de las ciencias agropecuarias.

A mi hermano Pablo por brindarme su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

Al Dr. David Hernández Sánchez, que es un ejemplo a seguir por su constante superación mediante el trabajo, pasión y entrega.

Al Sr. Agustín Hernández Romero, encargado del laboratorio de Microbiología Ruminal por su apoyo incondicional y su interés en el trabajo de laboratorio.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	2
Características generales de las bacterias del género <i>Streptococcus</i>	2
Características de la bacteria ruminal <i>Streptococcus bovis</i> .....	4
Interacción de <i>Streptococcus bovis</i> con otras bacterias.....	7
Degradación del almidón.....	9
Trastornos que produce a los rumiantes el alto consumo de carbohidratos de fácil fermentación.....	12
Importancia económica de la acidosis.....	16
Control de la acidosis ruminal en dietas altas en granos.....	16
Amortiguadores y alcalinizantes de pH.....	16
Ionóforos.....	17
Monensina.....	17
Lasalocida.....	17
Efecto de los ionóforos en la población del rumen.....	19
Efecto de los ionóforos en el pH ruminal.....	20
Aditivos microbianos.....	20
Inóculos microbianos.....	21
Vacunas.....	22
Fagoterapia.....	22

Bacteriófagos presentes en el rumen.....	23
Estimulación de la actividad bacteriófaga.....	24
Agentes mutagénicos.....	25
La mitomicina C.....	25
Rayos ultravioleta.....	25
Bacteriófagos en la industria de derivados lácteos fermentados....	26
Medios de cultivo para <i>Streptococcus bovis</i> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
Experimento 1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas utilizando una dieta alta en grano.....	31
Experimento 2. Aislamiento, caracterización, curva de crecimiento, tiempo de generación y conservación mediante el proceso de liofilizado de la bacteria ruminal <i>Streptococcus bovis</i> .....	34
Aislamiento de bacterias del género <i>Streptococcus</i> del rumen.....	34
Caracterización e identificación de microorganismos aislados.....	38
Identificación bioquímica de los <i>Streptococcus</i> aislados.....	39
Conservación del cultivo de <i>Streptococcus bovis</i> aislado y viabilidad del liofilizado.....	40

Curva de crecimiento y tiempo de generación de la bacteria ruminal <i>Streptococcus bovis</i> aislada.....	43
Experimento 3. Evaluación del tiempo de reactivación en la viabilidad de un cultivo liofilizado de <i>S. bovis</i> y la inducción de bacteriófagos contra esta bacteria.....	45
Primera etapa. Determinar el tiempo de reactivación en la viabilidad y el comportamiento de un cultivo liofilizado de la bacteria <i>S. bovis</i> .....	45
Tratamientos experimentales.....	45
Variables.....	45
Concentración de la bacteria <i>Streptococcus bovis</i> .....	45
pH.....	46
Concentración de lactato.....	46
Concentración de AGV.....	46
Segunda etapa. Inducción del bacteriófago de la bacteria <i>Streptococcus bovis</i> .....	47
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	47
Inducción de bacteriófagos con Mitomicina C.....	47
Tratamientos experimentales.....	48
Variables.....	49
Análisis estadístico.....	50
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	51
Experimento 1.....	51

Experimento 2.....	59
Experimento 3.....	68
Primera etapa.....	68
Segunda etapa.....	73
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Efecto del tipo de sustrato sobre la actividad amilolítica de bacterias ruminales.....	6
Cuadro 2. Velocidad de degradación, pH y producción de ácido láctico de varios granos durante su fermentación <i>in vitro</i> .....	15
Cuadro 3. Medio de cultivo basal para la bacteria ruminal <i>Streptococcus bovis</i> .....	28
Cuadro 4. Medio de cultivo sólido selectivo para el aislamiento de <i>Streptococcus</i> spp. (Merck®).....	35
Cuadro 5. Solución para realizar diluciones.....	36
Cuadro 6. Caldo de cultivo selectivo para el crecimiento de <i>Streptococcus bovis</i> (Merck®).....	37
Cuadro 7. Pruebas y reacciones contenidas en la prueba API 20 Strep.....	39
Cuadro 8. Medio anaerobio (GCA – FR) usado para liofilizar la bacteria <i>Streptococcus bovis</i> .....	41

Cuadro 9. pH de los medios a diferentes horas de incubación.....	51
Cuadro 10. Concentración (mM) de ácidos grasos volátiles y lactato a las seis horas de incubación.....	54
Cuadro 11. Concentración de bacterias totales ( $10^{10}$ /ml) a tres y seis horas de incubación.....	56
Cuadro 12. Concentración de bacterias celulolíticas ( $10^4$ /mL) a tres y seis horas de incubación.....	57
Cuadro 13. Concentración de bacterias productoras de lactato ( $10^6$ /mL) a tres y seis horas de incubación.....	57
Cuadro 14. Caracterización bioquímica de un <i>Streptococcus</i> ruminal con el uso del API 20 Strep.....	60
Cuadro 15. Valores de absorbancia, concentración de bacterias y pH obtenidos durante la curva de crecimiento de <i>Streptococcus bovis</i> .....	64
Cuadro 16. Concentración de <i>Streptococcus bovis</i> ( $10^8$ mL <sup>-1</sup> ) en los tratamientos evaluados después de 72 h de incubación.....	69

Cuadro 17. pH y concentración ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) de lactato en los tratamientos evaluados a las 72 horas de incubación.....	70
Cuadro 18. Concentración ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) de ácidos grasos volátiles después de 72 horas de incubación.....	70
Cuadro 19. Concentración de bacteriófagos (por $\text{mL}^{-1}$ de cultivo) de la bacteria <i>Streptococcus bovis</i> en los distintos tratamientos.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Dimensiones de la Cámara Petroff-Hausser.....	43
Figura 2. Curva de crecimiento de un cultivo de <i>Streptococcus bovis</i> con base a su absorbancia .....	62
Figura 3. Curva de crecimiento de un cultivo de <i>Streptococcus bovis</i> , con base a su concentración de bacterias por mL de medio de cultivo .....	63
Figura 4. Apariencia de las placas de lisis producidas por el bacteriófago de <i>Streptococcus bovis</i> ( 0.9 – 1.2 mm de diámetro) .....	74
Figura 5. Placas de lisis producidas por el bacteriófago de <i>Streptococcus bovis</i> (0.2 – 0.4 mm de diámetro).....	75

## INTRODUCCIÓN

*Streptococcus bovis* es una bacteria ruminal que se encuentra en baja concentración en animales que consumen dietas con alta cantidad de forrajes, pero, cuando en la dieta se suministran altas cantidades de almidón, la bacteria crece rápidamente, produce ácido láctico y causa disminución del pH, lo que provoca acidosis ruminal subclínica (ARS). *Streptococcus bovis* se ha aislado del rumen en medios de cultivo a base de glucosa, celobiosa almidón y fluido ruminal (GCA – FR) mediante técnicas para microorganismos anaerobios. Sin embargo, es posible, utilizar medios de cultivo comerciales usados en microbiología humana aunque estos no han sido propiamente evaluados. Una de las técnicas más utilizadas para la conservación de las bacterias es el proceso de liofilizado; sin embargo, tampoco se sabe el efecto de la liofilización y de la forma de rehidratar el cultivo sobre la viabilidad de *S. bovis* la bacteria. En el contenido ruminal existen bacteriófagos específicos contra *S. bovis*. Experimentalmente en cultivos *in vitro* de *S. bovis* los bacteriófagos en estado lisogénico suelen inducirse al estado lítico por agentes mutagénicos como rayos ultravioleta y mitomicina C.

En el presente estudio, se aisló a partir de líquido ruminal de ovinos la bacteria *Streptococcus bovis* y se identificó mediante el sistema de identificación API 20 Strep, la bacteria se caracterizó con base a su perfil bioquímico, curva de crecimiento y tasa de generación. El estudio se realizó a nivel de laboratorio, incluyó el efecto del tiempo de reactivación de un cultivo liofilizado de *S. bovis* y la inducción de la fase lítica del bacteriófago de esta bacteria.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Características generales de las bacterias del género *Streptococcus*.**

Los *Streptococcus* son microorganismos Gram positivos de forma esférica ovalada con un diámetro de 0.8 hasta cerca de 2.0  $\mu\text{m}$ , no tienen motilidad, se presentan en pares o en cadenas cuando proliferan en medios líquidos. El largo de las cadenas varía dependiendo de la especie y de la composición del medio de cultivo. Las cadenas pueden contener hasta 50 células bacterianas (Sneath *et al.*, 1986).

Los *Streptococcus* no forman endosporas, son quimiorganotrofos con metabolismo fermentativo, su fermentación es de tipo homoláctica y son catalasa negativos. La composición de la pared celular es característica de una bacteria Gram positiva, constituida principalmente de peptidoglicano el cual está enlazado a diferentes carbohidratos, ácido teicóico (lipoteicóico) y proteínas antigénicas. La pared celular contiene amino azúcares como ácido N-acetil - glucosamina, ácido murámico, en tanto que, galactosamina es un componente variable (Joklik *et al.*, 1997; Madigan *et al.*, 1998).

El crecimiento de los *Streptococcus* aumenta en medios sólidos adicionados con sangre, suero o glucosa; las colonias en agar sangre miden usualmente de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, requieren una temperatura óptima de 37° C, su máximo crecimiento se produce durante las primeras 24 horas, después de este tiempo presentan poco o ningún crecimiento. El crecimiento en medios líquidos es incrementado por la adición de glucosa, pero el rápido descenso en el pH detiene su crecimiento. La mayoría de las especies de *Streptococcus* son anaerobios

facultativos, mientras que, algunas cepas de las especies *S. mutans*, *S. milleri* y *S. pneumoniae* requieren para su crecimiento de una atmósfera que contenga 5% de CO<sub>2</sub> (Schlegel *et al.*, 2003).

Todos las especies de *Streptococcus* fermentan carbohidratos dando como productos finales ácido láctico y en menor cantidad ácido fórmico, ácido acético y CO<sub>2</sub>. Sus requerimientos nutricionales incluyen aminoácidos como serina y arginina, péptidos, purinas y pirimidinas. Para su óptimo crecimiento en medios líquidos es necesario adicionar carbohidratos fermentables, aunque, algunas especies fermentan ácidos orgánicos como cítrico y málico. *Streptococcus bovis* es capaz de utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno (Russell, 1985). Numerosas especies de *Streptococcus* producen bacteriocinas que inhiben una amplia gama de bacterias Gram positivas (Hiao *et al.*, 2004). Serológicamente es de importancia la clasificación e identificación de los *Streptococcus* por el tipo de antígenos; los grupos de antígenos conocidos son polisacáridos (A, B, C, F y G) asociados a la pared celular o al ácido teicóico (D y N), situados entre la región de la membrana celular y el interior de la superficie de la pared celular; en algunos casos la naturaleza química del grupo antigénico es conocida, en el grupo A los polisacáridos son N-acetilglucosamina, mientras que el grupo C es N-acetilglucosamina ligada a ramanosa (Joklik *et al.*, 1997; Schlegel *et al.*, 2003).

Uno de los esquemas más útiles para la clasificación preliminar de los estreptococos se basa en el tipo de hemólisis que se produce en las placas de agar sangre. Algunos estreptococos producen una zona clara de hemólisis ( $\beta$ -hemólisis) alrededor de la colonia como consecuencia de la lisis total de los glóbulos rojos.

Otros estreptococos producen una zona de hemólisis parcial con una coloración verdosa ( $\alpha$ -hemólisis) del medio, en tanto, que otras especies como *Streptococcus bovis* no son hemolíticas y no producen hemólisis en agar sangre (Joklik *et al.*, 1997).

Los *Streptococcus* se establecen en las mucosas de las membranas del tubo digestivo, respiratorio, genitourinario, y en la piel del hombre y animales; también, se encuentran presentes en la leche y sus productos como quesos y yogur, así como, en suelos y aguas contaminadas con heces fecales (Davis *et al.*, 1976; Sneath *et al.*, 1986).

Los estreptococos del grupo D han sido tradicionalmente divididos en dos subgrupos, las especies de enterococos (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*), y los no enterococos (*Streptococcus equinus* y *Streptococcus bovis*). Los estreptococos del grupo D proliferan como diplococos o en cadenas cortas, los microorganismos de este grupo se diferencian de los otros estreptococos por su capacidad de proliferar a 45° C y de soportar temperaturas superiores a los 60°C. Además proliferan en presencia de bilis al 40 % e hidrolizan la esculina y pueden dar reacción alfa o gamma hemolítica en agar sangre. El antígeno del grupo D no es un carbohidrato de la pared celular, sino un poliglicerol fosfato asociado al ácido lipoteicoico presente en la membrana citoplasmática (Joklik *et al.*, 1997).

### **Características de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis***

*Streptococcus bovis* es una bacteria ovoide de 0.8 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, forma pares frecuentemente y cadenas largas en forma moderada. Puede crecer en

presencia de oxígeno, algunas cepas anaeróbicas son capaces de desarrollarse en medios con un pH de hasta 9.6, o con contenidos de 6.5 % de NaCl. Es una bacteria no motil; hidroliza almidón en maltosa y glucosa mediante una enzima del tipo  $\alpha$ -amilasa. Fermenta glucosa, fructosa, galactosa, manosa y disacáridos como lactosa, maltosa y sucrosa; existen evidencias de que los disacáridos son fosforilados y transportados hacia el interior de la bacteria (Martín y Russell, 1987; Schlegel *et al.*, 2003). El producto final de la fermentación de glucosa es ácido láctico.

Algunas cepas de *Streptococcus bovis* pueden sobrevivir a temperaturas elevadas de hasta 60° C durante 30 minutos, y a una temperatura mínima de 22 °C. Algunas cepas pueden utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno. Russell y Robinson (1984) determinaron los requerimientos nutritivos de distintas cepas de *S. bovis* (JB1, 26, 581AXY2, 21096C Y 45S1) y reportaron que requieren una temperatura de 45 °C para un óptimo desarrollo, crecen adecuadamente en medios con 2 % de cloruro de sodio que contienen carbohidratos de fácil fermentación.

*Streptococcus bovis* es una bacteria que normalmente se encuentra en una concentración de  $10^7$  mL<sup>-1</sup> de fluido ruminal en rumiantes que consumen dietas con altas proporción de forrajes; sin embargo, su concentración puede incrementarse hasta  $10^{10}$  mL<sup>-1</sup> cuando la dieta contiene más de 60 % de almidón en forma de granos (Martín y Rusell, 1987).

Varias bacterias del rumen fermentan almidón, por ejemplo: *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinomonas amylolytica* (Mountfort y Asher, 1988), pero de acuerdo a Cotta (1988) *S. bovis* tiene una tasa de crecimiento superior al de otras bacterias cuando los carbohidratos de fácil fermentación se encuentran en

exceso (Cuadro 1). En el mismo estudio se demuestra que la actividad amilolítica de *S. bovis* es menor cuando el medio contenía glucosa y mayor cuando el almidón y la maltosa se usaron como sustratos.

**Cuadro 1. Efecto del tipo de sustrato sobre la actividad amilolítica de bacterias ruminales.**

Especie	Sustrato	Tasa de crecimiento K h <sup>-1a</sup>	Actividad unidades/ mg proteína <sup>b</sup>
<i>Ruminococcus amylophilus</i> H 118	Glucosa	No hubo crecimiento	--
	Maltosa	1.06	16.91
	Almidón	1.30	18.21
<i>Bacteroides ruminicola</i> 23	Glucosa	0.39	0.10
	Maltosa	0.30	0.75
	Almidón	0.38	0.99
<i>Streptococcus bovis</i> J B1	Glucosa	2.07	1.20
	Maltosa	1.38	14.46
	Almidón	1.98	16.55

<sup>a</sup> K h<sup>-1</sup> = tasa de crecimiento por unidad de tiempo en horas

<sup>b</sup> Unidad enzimática = 1 mol de glucosa formada por minuto

Adaptado de Cotta (1988).

*Streptococcus bovis* no utiliza como fuente de energía productos de la degradación de polisacáridos como pentosas (producto de la degradación de los xilanos), ni ácidos urónicos (productos de la degradación de la pectina), pero si puede utilizar celulodextrina (producto de la hidrólisis de la celulosa). En medios de cultivo cerrados, el crecimiento máximo o exponencial lo alcanza en

aproximadamente 2 h, su tiempo de generación en el cual dobla su población es de 21 min; mientras que, en cultivos continuos es de 3 h y su tiempo de generación de 14 min (Russell y Robinson, 1984; Cotta y Whitehead, 1993; Stone, 2004).

Por otra parte, se ha realizado una reclasificación taxonómica de los estreptococos de grupo D, mediante una clasificación genética, delimitando diferentes grupos de ADN aislados de humanos (*Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius*) y de animales (*Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus alactolyticus*). En particular la especie *S. bovis* se ha separado en diferentes biotipos I, II y II.2 (Schlegel *et al.*, 2003)

#### **Interacción de *Streptococcus bovis* con otras bacterias.**

Existe interdependencia nutricional entre las bacterias ruminales que degradan almidón y bacterias no amilolíticas. Distintas especies de bacterias amilolíticas como *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Prevotella ruminicola* al hidrolizar el almidón producen maltooligosacáridos y parte de estos son utilizados por otras bacterias no amilolíticas como sustratos para su crecimiento.

Cotta (1992) realizó cocultivos de *Streptococcus bovis* con *Selenomonas ruminantium* en medios con alto contenido de almidón y determinó que los maltooligosacáridos producidos por *S. bovis* fueron utilizados por *S. ruminantium* para su crecimiento, también reporta que las bacterias *B. fibrisolvens* y *P. ruminicola* compiten por estos sustratos.

Una de las interacciones más importantes que se ha descubierto, es la de *S. bovis* con bacterias ruminales utilizadoras de lactato como *Megasphaera elsdenii* y

*Selenomonas ruminantium*; estas bacterias son capaces de utilizar el L-lactato producido por *S. bovis* lo cual evita su acumulación en rumen y su posterior absorción a través de la pared ruminal. Sin embargo, si la producción de L-lactato excede la tasa de utilización, el pH del rumen puede descender a tal punto que el animal puede presentar estasis del rumen (Russell y Strobel, 1989). Entre las bacterias que utilizan lactato se ha confirmado que *M. elsdenii* tiene una mayor capacidad que *S. ruminantium* para transformar lactato en ácido propiónico mediante la vía del acrilato (Counotte *et al.*, 1983).

Por otra parte Kung y Hession (1994) inocularon un cultivo de *Megasphaera elsdenii* a una concentración baja ( $8.7 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) y alta ( $8.7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) en un medio que contenía altas proporciones de carbohidratos de rápida fermentación como almidón y glucosa, y determinaron que en los cultivos no inoculados (tratamiento testigo) la producción de lactato fue mayor a 40 mM; mientras que, en los cultivos inoculados con una baja dosis de *Megasphaera elsdenii*, la máxima producción de lactato fue de 25 mM después de 5 horas de fermentación y disminuyó a menos de 5 mM a las 7 horas de fermentación. Cuando se inoculó una dosis alta de *M. elsdenii* la producción de lactato no excedió de 2 mM durante todo el periodo de incubación; estos autores concluyeron que un inoculo de *Megasphaera elsdenii* puede ser utilizado para prevenir la acumulación de lactato en rumen y reducir el tiempo de adaptación animal a dietas con alto contenido de cereales.

## Degradación del almidón

Cuando *S. bovis* crece en medios que contienen almidón, se activa la producción de alfa-amilasas y produce maltooligosacáridos que posteriormente son fermentados, esta habilidad es superior hasta en un 30 % con relación a otras especies de bacterias amilolíticas ruminales (Cotta y Withehead, 1993).

El almidón es hidrolizado en el rumen por amilasas microbiales como:  $\alpha$ -amilasa, (EC3.2.1.1,  $\alpha(1,4)$ -glucano-glucanohidrolasa); glucoamilasa, (EC3.2.1.1,  $\alpha(1,4)$ -glucano-glucanohidrolasa); isoamilasa, (EC3.2.1.68, glucogeno 6-glucanohidrolasa) y pululanasa, (EC3.2.1.41, puluan 6-glucanohidrolasa), (Swinkels, 1985).

Los principales microorganismos amilolíticos del rumen son *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica* y los protozoarios del rumen (Mountfort y Asher, 1988; Mendoza y Ricalde, 1993). Durante la degradación microbial del almidón se obtienen distintas cantidades de glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa, maltohexosa, maltoheptosa y  $\alpha$  dextrinas. Estos últimos son oligosacaridos ramificados que contienen de 1 a 3 enlaces  $\alpha$  1-6, uno ó más enlaces adyacentes  $\alpha$  1-4 y una mezcla heterogénea con grados de polimerización de 4 a 10 unidades de glucosa.

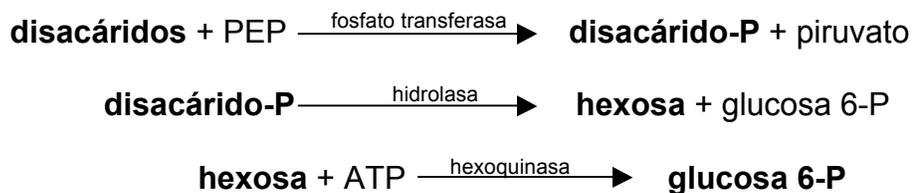
La  $\alpha$ -amilasa es una endohidrolasa y actúa predominantemente sobre enlaces glucosídicos  $\alpha$  1-4, de oligosacáridos y polisacáridos, y produce oligosacáridos de bajo peso molecular (Cotta y Whitehead, 1993).

La glucoamilasa es una exohidrolasa que ataca principalmente enlaces  $\alpha$  1-4 a partir del extremo no reductor del almidón y de los fragmentos del almidón

(oligosacáridos) producidos por acción de la  $\alpha$ -amilasa. La glucoamilasa también puede romper enlaces  $\alpha$  1-6 en forma limitada. La enzima  $\alpha$ -amilasa hidroliza en forma aleatoria, mientras que, la  $\beta$ -amilasa hidroliza en forma escalonada enlaces internos del polímero, liberando unidades de maltosa. La  $\beta$ -amilasa es una exohidrolasa que actúa en el grupo final no reductor de la molécula (Reilly, 1985)

Bajo las condiciones anaeróbicas del rumen, el piruvato (producto de la glucólisis) es convertido hasta lactato para regenerar el NAD usado en la glucólisis. *Streptococcus bovis* es una bacteria homoláctica que produce dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP por mol de glucosa o fructosa fermentada, produce la enzima aldolasa la cual degrada la fructosa bifosfato a triosa fosfato. Debido a su eficiente producción de ATP, produce el doble de masa celular que las bacterias heterolácticas (Madigan *et al.*, 1998). *S. bovis* es una bacteria que posee dos amilasas ligadas a la célula y una amilasa extracelular que es liberada durante el crecimiento (Mountfort y Asher, 1988).

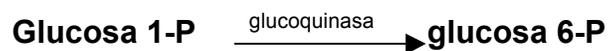
Martín y Russell (1987) reportaron que la hidrólisis de disacáridos como maltosa, sucrosa y celobiosa por *S. bovis*, es dependiente de la presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) quien dona su fosforo en reacciones conocidas por ejemplo:



El pirofosfato (Pi) puede ser el donador de fósforo cuando no se encuentran disponible el PEP, la enzima fosforilasa es la que cataliza la reacción y esta es inducida por la presencia de maltosa:



En la siguiente reacción la glucosa 1-P se transforma en glucosa 6-P por acción de las enzimas glucoquinasa y fosfoglucomutasa presentes en la célula bacteriana:



Cuando los carbohidratos de fácil fermentación se encuentran en exceso, proporcionan un medio de cultivo óptimo para el desarrollo de *S. bovis*, que resulta en su intensa multiplicación y una gran producción de L-lactato, cuya acumulación ocasiona la disminución del pH ruminal a valores de 5.0 y 5.5; a estos niveles de acidez se afecta el desarrollo de las bacterias celulolíticas y disminuye la digestión de la celulosa, si continúan estos niveles de acidez se produce una disminución en la frecuencia e intensidad de las contracciones rumino-reticulares atonía ruminal e incluso la muerte del animal (Slyter, 1976).

La producción de lactato por *Streptococcus bovis* es afectada por la actividad de las enzimas LDH (lactato deshidrogenasa) y PFL (piruvato formato-liasa). La actividad de estas dos enzimas puede ser afectada de dos formas: primera, la enzima LDH de *S. bovis* es activada por la presencia de fructosa 1,6- bifosfato, y la enzima PFL es inhibida por la dihidroxiacetona fosfato y D-gliceraldehido 3-fosfato; la

concentración intracelular de estos intermediarios de la glucólisis afecta la actividad de ambas enzimas.

En *S. bovis* la producción de lactato incrementa por un estímulo en la síntesis de LDH y una disminución en la síntesis de la enzima PFL (Asanuma y Hino, 2002).

### **Trastornos que produce a los rumiantes el alto consumo de carbohidratos de fácil fermentación**

Los microorganismos ruminales fermentan carbohidratos produciendo ácidos grasos volátiles (AGV) y en menor cantidad lactato. Los AGV se absorben a través de la pared ruminal y son metabolizados principalmente en el hígado, el L-lactato también es metabolizado en el hígado como fuente alternativa para la producción de glucosa. Cuando se suplementa la dieta con altas cantidades de carbohidratos solubles, aumenta la producción de lactato con relación a la de AGV; el lactato ruminal puede producirse a partir de la fermentación láctica del almidón, maltosa, rafinosa, sucrosa, celobiosa, fructosa, glucosa y del propionato; en general la fermentación de las hexosas genera más cantidad de ácido láctico que la fermentación de las pentosas (Bach, 2002; Krauze y Oetzel 2006).

En dietas con altas concentraciones de forrajes, el lactato está presente en el rumen en una concentración, menor a 7 mM; pero, cuando existe un consumo excesivo de almidones el lactato incrementa rápidamente y alcanza concentraciones en rumen de hasta 100 mM, lo que puede originar un cuadro de acidosis ruminal (Owens *et al.*, 1998).

La acidosis se puede definir como un estrés bioquímico y fisiológico causado por una rápida producción ruminal y absorción vía sanguínea de ácidos grasos volátiles (AGV) y de ácido láctico. Los AGV se absorben del rumen a la sangre por difusión pasiva, a mayor gradiente de concentración entre el líquido ruminal y la sangre, mayor es la velocidad de absorción; la difusión pasiva es más eficaz cuando el AGV está en forma no disociada (carga neutra), que en forma disociada (Bach, 2002; Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003).

La acidosis ruminal es un trastorno metabólico asociado a distintos problemas entre los que se pueden encontrar laminitis, poliencfalomalacia, ruminitis, abscesos hepáticos, síndrome de no consumo, síndrome de mala absorción e infecciones clostridiales (Britton, 1991).

Existen dos tipos de acidosis aguda y subaguda (subclínica), la forma aguda presenta riesgo de mortalidad, se presenta cuando los animales tienen acceso a granos de fácil fermentación sin suficiente adaptación y el pH ruminal puede reducir a 5.2.

En la forma subclínica existe un menor consumo de carbohidratos de fácil fermentación, el principal signo clínico es una reducción en el consumo de alimento (Owens *et al.*, 1998). Los animales se observan aparentemente sanos, sin embargo un signo evidente es la tasa respiratoria, ya que un animal en condiciones de acidosis metabólica trata de mantener el pH sanguíneo mediante una mayor tasa respiratoria y un incremento en la actividad metabólica del riñón (Huber 1976; Slyter, 1976; Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003). En casos de acidosis aguda se ha determinado una concentración de 75 mg de ácido láctico en 100 mL de orina. La

concentración de ácido láctico en sangre a un pH de 7.0 es de  $17.7 \text{ mM L}^{-1}$ , pero cuando el pH desciende por abajo de estos niveles la concentración de ácido láctico puede llegar a  $30.6 \text{ mM L}^{-1}$  (Huber, 1976; Gozho *et al.*, 2005).

Por otra parte Brown *et al.* (2000) reportan que en la acidosis ruminal subclínica, además de la disminución del pH y aumento en la concentración de lactato en sangre, existen otros cambios importantes, incluyendo disminución de calcio, potasio y magnesio en el plasma debido a un incremento en la excreción urinaria de estos minerales, atrofia del epitelio secretor del páncreas, desgranulación y atrofia de las células beta del páncreas, disminución de glicógeno en las vacuolas hepáticas, hipertrofia y desgranulación de células secretoras de catecolaminas en la médula de las glándulas adrenales y enfisema de los pulmones. Además, en la acidosis ruminal subclínica cuando disminuye el pH ruminal entre 5.2 y 5.6, se produce un aumento en la concentración de lipopolisacáridos producidos por algunas bacterias Gram negativas; la acidez del rumen y el aumento de la presión osmótica provocan el transporte de los lipopolisacáridos del epitelio del rumen hacia el torrente sanguíneo, lo que resulta en una respuesta inflamatoria que produce el síndrome acidosis-laminitis (Gozho *et al.*, 2005).

Otra variable ruminal que puede afectarse con la acidosis ruminal es la osmolaridad. La osmolaridad normal del rumen varía de 240 a  $265 \text{ mOsm L}^{-1}$  con dietas a base de forrajes, en dietas altas en granos la osmolaridad alcanza valores de 280 a  $300 \text{ mOsm L}^{-1}$  (Owens *et al.*, 1998). Los ácidos grasos volátiles y el lactato producidos incrementan la osmolaridad del fluido ruminal cuando aumenta su producción en rumen; en condiciones de acidosis la osmolaridad ruminal es de 285 –

310 mOsm, que es mayor a la osmolaridad de la sangre (260 mOsm), en tales condiciones el agua de los vasos sanguíneos atraviesa la pared del rumen y provoca deshidratación en el animal. Un aumento en la presión osmótica ruminal también puede estimular los osmoreceptores localizados en el retículo y se inhibe la ingestión de alimento, una osmolaridad mayor de 350 mOsm también puede afectar la actividad de microorganismos ruminales, ya que, inhibe la degradación bacteriana de la fibra y del almidón (Brake y Hutcheson, 1996; Stone, 2004).

Para formular raciones para ganado bovino de alta producción es aconsejable usar ingredientes que contienen almidones de fermentación lenta como el maíz y el sorgo. Por otro lado el trigo y la cebada predisponen más a problemas de acidosis ruminal (Bach, 2002; Cuadro 2).

**Cuadro 2. Velocidad de degradación, pH y producción de ácido láctico de varios granos durante su fermentación *in vitro*.**

Ingrediente	Tasa Degradación h <sup>-1</sup>	Almidón, % MS	pH del medio	Ácido láctico mM
Sorgo, harina	0.08	71.0	5.0	1.2
Maíz, harina	0.25	70.5	4.8	8.0
Trigo, harina	0.40	64.5	4.9	110
Cebada	0.30	56.0	4.6	124
Cebada, copos	0.40	56.1	4.6	126

Bach (2002).

## **Importancia económica de la acidosis.**

En la acidosis ruminal subclínica se reduce la ingestión del alimento y se reduce la ganancia de peso en más del 10 % en bovinos en corrales de engorda; mientras que en ganado lechero la producción de leche disminuye en 8%, lo que origina pérdidas considerables en la producción de carne y leche sobre todo en países que utilizan dietas altas en granos, como Estados Unidos de Norteamérica, Canada, Europa, Japón y Sudáfrica (Nagaraja y Chengappa, 1998; Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003). En México la frecuencia de acidosis ruminal subclínica (ARS) es de 36 % en vacas lecheras altas productoras y la producción suele disminuir entre un a 30 % (Paasch *et al.*, 1997; Krause y Oetzel, 2006).

## **Control de la acidosis ruminal en dietas altas en granos**

### **Amortiguadores y alcalinizantes de pH**

Se han utilizado diversos amortiguadores para reducir la acidosis ruminal subclínica en animales alimentados con dietas altas en granos; sin embargo, las respuestas han sido muy variables (Britton, 1991). Los amortiguadores de pH más usados son bicarbonato de sodio, a dosis de 0.75 % de la MS de la dieta, carbonato de calcio a dosis de 1.0 % de MS de la dieta, y bentonita de sodio a dosis de 1 % de la MS de la dieta.

Por otro lado, cuando se ha utilizado el óxido de magnesio como alcalinizante este compuesto solo aumenta el pH ruminal, pero no tiene capacidad amortiguadora; la dosis recomendada es de 0.3 a 0.4 % de la MS; niveles más elevados de óxido

magnesio puede ocasionar problemas de gustocidad y una consecuente disminución del consumo del alimento (Bach, 2002; Calsamiglia *et al.*, 2005) .

### **Ionóforos**

También se han utilizado antibióticos ionóforos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas en el rumen. Los ionóforos son sustancias altamente lipofílicas que son tóxicas para algunas bacterias, protozoarios y hongos, tienen un peso molecular de 500 a 2000; el exterior de la molécula es hidrofóbica y el interior es hidrofílica y capaz de enlazar cationes. Algunos ionóforos enlazan un catión en particular, otros son capaces de enlazar más de un catión (Sumano y Ocampo, 1988; Russell y Strobel, 1989; Schwingel *et al.*, 1989).

**Monensina.** Pertenece al grupo de compuestos conocidos como ionóforos carboxílicos, se produce a partir del microorganismo *Streptomyces cinnamonensis*. La monensina es un compuesto activo en el transporte de cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y es particularmente eficaz en el transporte de  $\text{Na}^+$  al interior de las células (Elsasser, 1984; Russell, 1987; Osborne *et al.*, 2004).

**Lasalocida.** Es un ionóforo polieter, es producido por el microorganismo *Streptomyces lasaliensis*. Se presenta como cristales incoloros, es soluble en disolventes orgánicos e insoluble en agua (excepto en su presentación de sal sódica), su peso molecular es de 590.8. La lasalocida tiene afinidad por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por lo que alteran la distribución de estos cationes en la membrana al modificar su permeabilidad (Pressman, 1976; Sumano y Ocampo, 1988).

Tanto la monensina como la lasalocida han sido los ionóforos más utilizados en la alimentación de rumiantes, algunos estudios demuestran que la monensina es

más potente que la lasalocida, lo cual parece estar asociado a las características iónicas selectivas de cada ionóforo. La lasalocida es más lipolítica que la monensina, lo que ocasiona que penetre menos ionóforo a través de la membrana celular de la bacteria. A la vez, concentraciones bajas de monensina han sido más efectivas contra *Fibrobacter succinogenes* que la lasalocida (Henderson *et al.*, 1969; Russel, 1987; Chow y Russell, 1992). Estudios *in vitro* han demostrado que tanto la monensina sódica como la lasalocida reducen los niveles de lactato y elevan el pH ruminal indirectamente al reducir la población de *Streptococcus bovis* que en condiciones de acidosis aguda puede llegar a concentraciones de  $10^{10}$  bacterias por mL de fluido ruminal (Cotta y Whitehead, 1993). Sin embargo, es importante enfatizar que los ionóforos no tienen un efecto constante para prevenir la acidosis subaguda; por ejemplo, Burrin y Britton (1986) utilizaron monensina en becerros en corrales de engorda a concentraciones de 150 a 300 mg animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y evitaron la acumulación de ácido láctico en rumen por tan solo un periodo de 12 h. Mientras que en otro estudio *in vitro* se determinó que la monensina inhibió a la bacteria *S. bovis*, solamente cuando se agregó a una dosis elevada de 350 mg por animal<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Muir y Barreto, 1979).

En un estudio *in vitro* Mantovani y Russell (2001) determinaron que la adición de nisina a dosis de 1  $\mu$ M inhibió el desarrollo de *S. bovis* cepa JB1; sin embargo, en un estudio posterior observaron que las bacterias que lograron sobrevivir a estas dosis, se volvieron resistentes a dosis superiores, incluso a dosis de 10  $\mu$ M de nisina, por lo cual concluyeron que bajas concentraciones de nisina (1  $\mu$ M) inhiben la

acidosis, pero con el tiempo la bacteria *S. bovis* JB1 se vuelve resistente a dicho antibiótico.

### **Efecto de los ionóforos en la población bacteriana del rumen**

Los ionóforos afectan más a las bacterias Gram positivas que a las Gram negativas. La mayor resistencia de las bacterias Gram negativas a los ionóforos se debe a que estas bacterias tienen la capacidad para producir ATP vía fosforilación a nivel substrato y fosforilación no oxidativa, ligada a la fuerza motriz de protones. Además, la membrana celular de las bacterias Gram negativas está conformada por un complejo de multicapas separadas por una capa rígida de peptidoglicano, lo que las hace más resistentes a los ionóforos. Aunque, existen bacterias ruminales Gram negativas como *Butyrivibrio fibrisolvens* sensibles a la monensina y a la lasalocida debido a que su pared celular es similar a la de bacterias Gram negativas (Dennis *et al.*, 1981). También el crecimiento microbiano y la actividad metabólica de otras especies Gram negativas como *Prevotella ruminicola*, son afectadas por la monensina (Elsasser, 1984; Morehead y Dawson, 1992; Osborne *et al.*, 2004).

Como se mencionó *Streptococcus bovis* es inhibido por la monensina y la lasalocida, aunque los cultivos reincubados con concentraciones bajas de monensina presentan un crecimiento rápido, en tanto que los cultivos reincubados con lasalocida crecen más lentamente. Los resultados obtenidos sugieren que la lasalocida tiene mayor afinidad por la membrana celular bacteriana que la monensina (Mitchel, 1961; Chow *et al.*, 1994). Bajo ciertas condiciones experimentales, los protozoarios y hongos ruminales también son sensibles a los ionóforos. Algunos estudios

demuestran que la monensina disminuye del 4 al 63 % el número de protozoarios (Schelling, 1984; Newbold *et al.*, 1993). Cann *et al.* (1993) encontraron que el crecimiento *in vitro* de una mezcla de hongos ruminales fue suprimido por salinomycin, monensina y portomicina; además, observaron que el efecto fungistático de los ionóforos es mayor en hongos del género *Piromona* que en el género *Neocallimastix*.

### **Efecto de los ionóforos en el pH ruminal**

La lasalocida y la monensina tienen un efecto directo en el pH ruminal al inhibir el crecimiento y actividad de bacterias Gram positivas productoras de lactato (Dennis *et al.*, 1981). *Streptococcus bovis* es una bacteria Gram positiva de rápido crecimiento muy sensible a la monensina. También tiene un efecto indirecto al favorecer el crecimiento y actividad de *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* bacterias utilizadoras de lactato que son resistentes a la monensina, por lo que algunos autores le han atribuido a los ionóforos un efecto sinérgico en el control de la acidosis ruminal (Dennis *et al.*, 1981; Nagaraja *et al.*, 1982; Bergen y Bates, 1984; Russell y Strobel, 1989; Chow *et al.*, 1994; Wallace, 1994; Beauchemin *et al.*, 2003).

### **Aditivos microbianos**

Los aditivos microbianos a base de levaduras más su medio de cultivo también han sido usados para combatir la acidosis ruminal subclínica. Los resultados han sido diversos y a veces contradictorios. Los microorganismos más utilizados son cepas

del hongo *Aspergillus oryzae* y de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*. Aunque son anaerobias facultativas son incapaces de sobrevivir en el rumen, por lo que, el uso adecuado de las levaduras se basa en una suplementación diaria. Se tiene evidencia de que las levaduras ayudan a mantener el pH ruminal entre 6.5 y 6.8 mediante un estímulo en el crecimiento de bacterias ruminales que fermentan el ácido láctico como *M. elsdenii* y *S. ruminantium* (Calsamiglia *et al.*, 2005).

Ayala *et al.* (2003) evaluaron la adición de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* en dietas de pre y post parto en vacas Holstein, utilizaron una dosis de 10 g por vaca día<sup>-1</sup> y determinaron un aumento de 23 Kg de leche por vaca d<sup>-1</sup> en la producción a los 100 días de lactación. Por otra parte, Putman *et al.* (1997) determinaron que cuando se adicionó la levadura *S. cerevisiae* en una dieta baja en proteínas, la producción de leche por vaca se incrementó, pero no se obtuvo respuesta cuando la levadura fue incluida en dietas altas en proteína cruda.

### **Inóculos microbianos**

Con los avances en el conocimiento de los microorganismos del rumen, se han descubierto importantes interacciones entre microorganismos, por ejemplo, entre *Streptococcus bovis* y *Megasphaera elsdenii*. Cuando el pH ruminal baja a niveles de 5.0, por la acumulación del ácido láctico producido por *S. bovis*, se favorece el desarrollo de microorganismos utilizadores de ácido láctico como *M. elsdenii*, la cual evita la acumulación del ácido. En ganado lechero se ha determinado que *M. elsdenii* puede transformar a propionato del 60 a 80 % de lactato presente en el rumen (Wallace, 1994). Se han desarrollando experimentalmente inóculos ruminales

con la bacteria *M. elsdenii* para prevenir la acumulación de lactato y de esta manera evitar la acidosis en rumiantes alimentados con dietas altas en granos. Kung y Hession (1994) reportan que *M. elsdenii* además de fermentar lactato puede utilizar glucosa y maltosa y competir con *Streptococcus bovis* por dichos sustratos. Otras bacterias ruminales utilizadoras de ácido láctico que se han evaluado experimentalmente son *Selenomonas ruminantium* (Bach, 2002) y *Anaerovibrio lipolítica* (Caja *et al.*, 2003).

### **Vacunas**

La inmunización contra *S. bovis* de animales alimentados con dietas altas en granos es un método experimental novedoso para reducir la incidencia de acidosis láctica. El método consiste en producir anticuerpos específicos para *S. bovis* las vacunas experimentales se producen con bacterias inactivadas (muertas), o atenuadas (vivas) de *S. bovis*. Las vacunas de bacterias vivas han tenido mejores resultados debido a que se han determinado niveles elevados de anticuerpos en saliva, líquido ruminal y suero sanguíneo de los animales inmunizados; esta técnica ha funcionado en ovinos, sin embargo, en bovinos no ha demostrado efectividad (Gill *et al.*, 2000).

### **Fagoterapia**

Desde el descubrimiento de los fagos de manera independiente por D'Herelle en 1917 y Twort en 1915, se ha experimentado con el uso de bacteriófagos para combatir algunas enfermedades infecciosas (Barrow y Soothill, 1997; Ronda *et al.*,

2003). Sin embargo, el uso generalizado de los antibióticos después de la II Guerra Mundial condujo al abandono de la fagoterapia. No obstante, la investigación en fagoterapia ha continuado en países como Polonia y Georgia (Sulakvelidze *et al.*, 2001). En este último país, el centro de investigación de Tiflis, fundado por D'Herelle y Eliava en 1923, ha continuado produciendo diferentes cepas de fagos.

Por otra parte, algunos investigadores polacos del Instituto Hirszfield, fundado en 1953, han reportado resultados sobre el tratamiento de 550 casos de infecciones bacterianas supurativas, enfisemas, peritonitis, osteomielitis entre otras. En su mayoría se ha usado para el tratamiento de casos crónicos en los que estaban implicadas bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos comúnmente disponibles. Entre estos microorganismos se encontraban: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. La fagoterapia también se ha usado exitosamente en el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas* en personas con quemaduras. Los fagos en estos casos se administraron tópicamente o por vía oral, previo tratamiento de los pacientes con antiácidos y gelatina para proteger a los fagos de la acidez gástrica y facilitar su entrada al torrente sanguíneo (Smith *et al.*, 1987; Sulakvelidze *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2002).

### **Bacteriófagos presentes en el rumen**

Se ha determinado una concentración de bacteriófagos ruminales que oscila entre  $2 \times 10^7$  hasta  $1.6 \times 10^{10}$  partículas por ml de fluido ruminal (Klieve y Bauchop, 1988; Klieve y Swain, 1993; Swain *et al.*, 1996).

Los bacteriófagos representan un potencial para manipular genéticamente a las bacterias ruminales; sin embargo, el conocimiento que se tiene de estos virus y su efecto en el desarrollo de las bacterias del rumen en la nutrición y producción del animal aun se desconocen (Klieve y Swain, 1993; Styriak *et al.*, 2005).

### **Estimulación de la actividad bacteriófaga en los virus**

Una vez que los bacteriófagos infectan a su célula huésped pueden destruir (estado lítico) a las células que infectan, o bien, pueden entrar en un estado llamado lisogenia en la que la mayor parte de los genes del virus no se expresa y el genoma viral se replica en sincronía con el cromosoma bacteriano, y pasan de una generación de bacterias a la siguiente. Bajo algunas condiciones, por ejemplo: disminuciones a 5.5 del pH del medio de cultivo o durante crecimiento exponencial del cultivo bacteriano, la fase lisogénica es inactivada, se producen nuevos viriones y finalmente hay una lisis de la membrana de la célula hospedadora, lo que permite la salida de los bacteriófagos (Maramorosch y Kurstak, 1971; Fox *et al.*, 2000).

Los agentes que inducen el estado lítico en los bacteriófagos son agentes que dañan el ADN de la célula hospedera, tales como la radiación ultravioleta, los rayos-X y algunos compuestos químicos como la mitomicina C. Estos compuestos interfieren con la función del represor, cuando ocurre daño en el ADN se activa un mecanismo de defensa del hospedador llamado respuesta "SOS", en el cual se activa un conjunto de 20 genes bacterianos que ayudan a la bacteria a resistir el daño; una de las consecuencias del daño del ADN es que una proteína bacteriana

funciona como proteasa y participa en la destrucción del represor. Una vez inactivado el represor desaparece el control bacteriano ejercido para este y se inicia la lisis de la célula bacteriana (Teuber y Lembke, 1983; Reed y Rehm, 1983).

### **Agentes mutagénicos, que estimulan expresión de bacteriófagos**

**La mitomicina C.** Es un antibiótico con actividad citotóxica y antibacteriana, derivada de una estructura denominada mitosana producida por *Streptomyces caespitosus*. Su estructura química es compleja incluye un grupo uretano, un grupo quinona y un anillo de aziridina. La mitomicina C actúa como agente alquilante que produce mutaciones al reaccionar directamente con el ADN, origina cambios químicos en la cadena del ADN lo que ocasiona apareamientos erróneos de las bases, es capaz de introducir cambios directos incluso en el ADN que no se está replicando. También forma enlaces transversales entre las cadenas de la doble hélice, lo que impide el desenrollamiento del ADN, inhibe la acción de la enzima ADN polimerasa, introduce cambios en el ADN al momento de la reparación por daños en el ADN durante la replicación; mientras que, en el ADN viral no se inhibe la replicación (Diener, 1987).

La mitomicina C a dosis de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de medio de cultivo se ha utilizado ampliamente para provocar la fase lítica en diferentes bacteriófagos de bacterias ruminales (Klieve *et al.*, 1989; Klieve y Swain, 1993).

**Rayos Ultravioleta.** Las bases púricas y pirimídicas absorben la radiación UV con un máximo de absorción a 260nm para ADN y ARN. Los rayos ultravioleta elevan

los niveles energéticos de los átomos haciéndolos menos estables, ello provoca la inducción de dímeros en el ADN, (debido a la unión covalente de timinas adyacentes en la cadena), lo que provoca que durante la replicación del ADN, la ADN polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en tal posición. En el rumen existe una fuente importante de bacteriófagos en estado lisogénico. En cultivos de *Streptococcus bovis* los bacteriófagos lisogénicos suelen iniciar al estado lítico, de forma espontánea después de la inducción por rayos ultravioletas. (Tarakanov 1974; Styriak *et al.*, 2005).

### **Bacteriófagos en la industria de derivados lácteos fermentados**

El ataque de bacteriófagos es un problema frecuente en la fermentación industrial de la leche; la contaminación por bacteriófagos virulentos provoca la lisis de los cultivos de bacterias iniciadoras y causan problemas en la fermentación y en consecuencia la pérdida del producto (Brussow *et al.*, 1994). Los bacteriófagos pueden ser aislados con relativa facilidad de las alcantarillas y del suero de las industrias procesadoras de la leche, estos pueden ser diseminados por medio de corrientes de aire y algunos procesos que favorecen la formación de partículas del suero o del agua de lavado que se diseminan con el aire (Teuber y Lembke, 1983). Los primeros problemas por bacteriófagos en la industrialización de la leche fueron reportados en 1930 y su presencia se ha relacionado con la falta de esterilidad de los sustratos y equipos utilizados, así como, una mala higiene del personal (Sturino y Klaenhammer, 2004).

Los microorganismos más susceptibles al ataque de los bacteriófagos son las bacterias lácticas termófilas indispensables en la elaboración de quesos y yogur como *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus thermophilus*. También se ha determinado una interacción entre bacterias, de manera que la lisis de *Streptococcus thermophilus* puede ser estimulada por la producción de ácido láctico de *Lactobacillus bulgaricus* (Monteville *et al.*, 1994; Sturino y Klaenhammer, 2004).

En la industria de productos ácidos de la leche, la presencia de bacteriófagos es un problema, sin embargo, la experiencia que se ha logrado a través de los años puede ser útil en la búsqueda de alternativas para controlar la acidosis ruminal subclínica.

### **Medios de cultivo de *Streptococcus bovis***

Se han utilizado diferentes medios de cultivo para el estudio específico de *S. bovis*, en el cuadro 3, se presentan los componentes de un medio de cultivo reportado por Martín y Russell (1987), en el cual *S. bovis* fue cultivada bajo estrictas condiciones anaeróbicas.

Switzer y Evans (1974) evaluaron diferentes medios para aislar *Streptococcus bovis*, incluyendo: caldo para Enterococos, agar para *Mitis salivarius*, caldo estreptosel, agar para enterococos, agar para enterococos con Twin 80 y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Los autores mencionados determinaron que el medio para enterococos en caldo y en agar presentó el mayor crecimiento de colonias. Por otra parte, se ha reportado que cuando *S. bovis* fue crecida en un medio definido sin tripticasa y con poca proporción

de aminoácidos la proteína bacteriana se sintetizó a partir de amoníaco (Atasoglu *et al.*, 1998).

Se tiene evidencia de que la concentración de carbohidratos fermentables en los medios de cultivo pueden ser una limitante para el adecuado crecimiento de *S. bovis*, algunas investigaciones mencionan que las fuentes de energía pueden ser

**Cuadro 3. Medio de cultivo basal para la bacteria ruminal *Streptococcus bovis***

Componente	Cantidad por Litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mg)	292
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg)	292
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mg)	480
NaCl (mg)	480
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (mg)	100
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O (mg)	64.0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mg)	4.00
Cisteína hidrociorada (mg)	600
Tripticasa (mg)	1.00
Resazurina (mg)	1.00
Extracto de levadura (mg)	500
Ácido acético (mmol)	28.3
Ácido propiónico (mmol)	8.10
Ácido butírico (mmol)	3.40
Ácido valérico (mmol)	1.00
Ácido isovalérico (mmol)	1.00
Ácido isobutírico (mmol)	1.00
Ácido 2-metilbutírico (mmol)	1.00
Glucosa (g)	6.00

Martín y Russell (1987)

glucosa o lactosa a una concentración de 3 y 4 g L<sup>-1</sup> (Mantovani y Russell, 2001; Asanuma *et al.*, 2004). Cuando los medios de cultivo para *Streptococcus bovis* contienen una concentración de glucosa de 5 ó 6 g L<sup>-1</sup> el crecimiento es óptimo a un pH de 6.5, además se ha reportado que *S. bovis* también puede crecer en sucrosa, lactosa y almidón (Cotta y Whitehead, 1993). Por otra parte, Goad *et al.* (1998) han aislado *S. bovis* en agar para enterococos proporcionando una atmósfera anaerobia mediante jarras de anaerobiosis.

A pesar de que *S. bovis* es una bacteria ruminal, no se encontraron reportes que utilicen medios a base de glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA + FR) el cual fue desarrollado por Hungate (1969) y es ampliamente utilizado en el estudio de diferentes bacterias ruminales.

Se han utilizado medios selectivos para el aislamiento de diferentes especies de *Streptococcus* a partir de muestras contaminadas con otras bacterias. Pike (1945) utilizó un medio sólido selectivo y caldo de enriquecimiento para *Streptococcus sp.* y determinó en una prueba de control de calidad que el crecimiento de *Streptococcus bovis* fue bueno en ambos medios debido a que los medios de cultivo contenía azida y sulfito sódico, que inhibieron el crecimiento de bacterias Gram negativas; mientras que las bacterias Gram positivas fueron inhibidas por la concentración de violeta cristal, en tanto *Streptococcus bovis* no fue perjudicada por esta sustancia.

Existen escasos reportes del aislamiento de *S. bovis* en medio sólido selectivo para *Streptococcus sp.* y caldo de enriquecimiento para *Streptococcus sp.*, por lo que es factible el aislamiento de la bacteria *S. bovis* en estos medios a partir del rumen de animales alimentados con dietas altas en granos.

## OBJETIVOS

1. Evaluar *in vitro* del efecto de dos amortiguadores y un ionóforo sobre pH, variables fermentativas y microbiológicas utilizando una dieta alta en grano.
2. Evaluar el medio de cultivo comercial sólido selectivo para *Streptococcus sp.* (Merck) para aislar la bacteria *Streptococcus bovis* de líquido ruminal fresco de ovinos alimentados con una dieta con 70 % de grano de sorgo molido.
3. Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas.
4. Establecer la curva de crecimiento y tiempo de generación de *Streptococcus bovis*.
5. Evaluar el proceso de liofilización como método para conservar el cultivo de *Streptococcus bovis*.
6. Realizar pruebas para la expresión de un bacteriófago específico contra *Streptococcus bovis*.

## HIPÓTESIS

1. La adición de dos amortiguadores sólo o mezclados con un ionoforo en una dieta alta en grano, disminuyen la producción de ácido láctico y el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico.
2. Se puede utilizar el medio de cultivo comercial sólido selectivo para *Streptococcus sp.* (Merck) para aislar la bacteria *Streptococcus bovis*, del rumen de ovinos; dado que este medio contiene azida sódica y sulfito sódico, que inhiben bacterias Gram negativas, y violeta cristal que inhibe otras bacterias Gram positivas.

3. Los bacteriófagos que infectan a la bacteria *Streptococcus bovis* ya están presentes en la bacteria, y se puede demostrar mediante el uso de la mitomicina C.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal del Programa en Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Esta investigación se dividió en tres experimentos. En el primer experimento se evaluó (*in vitro*) la adición de dos amortiguadores de pH y un ionóforo en una dieta alta en grano, sobre variables microbiológicas y fermentativas. En el segundo experimento se aisló y conservó la bacteria *Streptococcus bovis* mediante liofilizado. El tercer experimento se dividió en dos etapas, la primera etapa relacionada con la evaluación de la viabilidad de un cultivo liofilizado de *S. bovis* y la segunda con la inducción *in vitro* de bacteriófagos de *S. bovis*.

**Experimento 1. Evaluación *in vitro* del efecto de dos amortiguadores y un ionóforo sobre pH, variables fermentativas y microbiológicas utilizando una dieta alta en grano.**

### **Tratamientos experimentales**

Se evaluaron seis tratamientos: T1 = Testigo (70 % sorgo más 30 % alfalfa); T2 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica; T3 = T1 + 1.5 % sesquicarbonato de sodio; T4 = T1 + 1.5 % bicarbonato de sodio; T5 = T3 + 30 ppm de lasalocida sódica; T6 =

T4 + 30 ppm de lasalocida sódica. Las concentraciones utilizadas de los amortiguadores y el ionóforo corresponden a dosis recomendadas en rumiantes. Las incubaciones anaerobias *in vitro* se hicieron por triplicado en matraces de 1000 mL, a los cuales se agregó 500 mL de medio y 25 g de una mezcla de grano de sorgo (70 %) y alfalfa (30 %) en base seca, molidos con criba de 1.0 mm. Los medios se inocularon con 15 mL de líquido ruminal fresco, extraído en condiciones anaeróbicas, de un borrego fistulado alimentado con la misma proporción de sorgo y alfalfa. El líquido ruminal contenía la mezcla de microorganismos que iniciaron el proceso de fermentación. Los medios se incubaron en baño orbital LAB-LINE a 38 °C con agitación continua (85 ciclos min<sup>-1</sup>), por ocho horas, y solo se abrieron para tomar las muestras (bajo flujo de CO<sub>2</sub>) que se utilizaron para realizar los análisis correspondientes.

## **Variables**

### **pH**

La lectura de pH, se realizó cada hora, durante ocho horas, con un potenciómetro ORION modelo 250A, calibrado a dos buffers (pH 4.0 y 7.0).

### **AGV**

Para el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV) se tomaron 0.2 µL de cada una de las muestras y se inyectaron en un cromatógrafo marca HP modelo 5890 serie II, con columna de formeryl y superóxido de 1.2 µm, un flujo de N<sub>2</sub> de 3 mL min<sup>-1</sup> y una

temperatura de columna, detector e inyector de 120, 150 y 130 °C, respectivamente.

### **Lactato**

La concentración de lactato, se determinó siguiendo la metodología de lactato deshidrogenasa (Sigma, 1994), mediante el KIT No. DG1340-K, a la hora tres y seis de incubación. La lectura se hizo en un espectrofotómetro UV-VIS a 340 nm.

### **Concentración de bacterias totales**

La estimación de la concentración de bacterias totales, se realizó por el método del número más probable (Harrigan y McCance, 1979). Para esto se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-14}$  en un medio de cultivo glucosa-celobiosa-almidón-fluido ruminal (GCA-FR) de acuerdo a la metodología descrita por Cobos y Yokoyama (1995) y Hungate (1969).

### **Concentración de bacterias celulolíticas y productoras de lactato**

Para bacterias celulolíticas y productoras de lactato, las diluciones fueron  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  y el conteo se hizo a las horas tres y seis.

### **Análisis estadístico**

El diseño experimental empleado fue un completamente al azar, las unidades experimentales (matraces que contenían los medios de cultivo) se distribuyeron aleatoriamente en seis tratamientos con tres repeticiones por tratamiento. Los

resultados obtenidos se analizaron con PROG GLM (SAS, 2001) y la comparación de medias se hizo mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

## **Experimento 2. Aislamiento, caracterización, curva de crecimiento, tiempo de generación y conservación (liofilizado) de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis*.**

### **Aislamiento de bacterias del género *Streptococcus* del rumen**

**Líquido ruminal.** La fuente de inóculo fue líquido ruminal fresco obtenido de tres ovinos machos de raza criolla con un peso vivo promedio de 25 Kg, los cuales fueron alimentados con una dieta que contenía grano de sorgo (70 %) y heno de alfalfa (30 %). El líquido ruminal fue extraído vía esófago mediante una sonda y bajo condiciones anaeróbicas. Se extrajeron de 150 a 200 mL por animal entre 3 y 6 horas post alimentación. El líquido ruminal obtenido fue llevado inmediatamente al laboratorio; se filtró con una gasa quirúrgica, se burbujeó con CO<sub>2</sub> y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos para precipitar partículas de alimento y protozoarios; el sobrenadante, que contenía la mezcla de bacterias ruminales se mantuvo a 39 °C en matraces Erlenmeyer de fondo plano de 500 mL de capacidad, previamente esterilizados por 15min a 121°C.

**Medio de cultivo.** El aislamiento de las bacterias ruminales del género *Streptococcus*, se realizó con un medio de cultivo sólido selectivo para *Streptococcus* sp. (Merck). La composición del medio de cultivo se presenta en el cuadro 4 y se preparó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, que consisten en agregar

43 g de medio por litro de agua destilada, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min, el medio presentó un pH final de 7.1.

De acuerdo a la metodología descrita por Goad *et al.* (1998) se depositaron aproximadamente 20 mL de medio de agar fundido tibio (45 °C) para estreptococos en cajas de Petri estériles, bajo flama de mechero y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

**Cuadro 4. Medio de cultivo sólido selectivo para el aislamiento de *Streptococcus* spp. (Merck®).**

Componente	Cantidad g /Litro
Peptona de caseína	14.4
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	4.0
Glucosa	5.0
Citrato de sodio	1.0
L-cisteína	0.2
Sulfito de sodio	0.2
Azida sódica	0.2
Violeta cristal	0.0002
Agar-agar	13.0

Las cajas de Petri con el medio de cultivo solidificado se introdujeron en una jarra de anaerobiosis y se sometieron a prueba de esterilidad a 38 °C por 24 horas antes de su uso.

**Diluciones.** Para realizar las diluciones se preparó una solución mineral a base de solución mineral I y II más resarzurina (Cuadro 5); bajo condiciones anaeróbicas de acuerdo a la metodología descrita por Cobos y Yokoyama (1995).

Se depositaron 4.5 mL de la solución mineral para diluciones en tubos de cultivo (13 x100 mm.) estériles, bajo flujo de CO<sub>2</sub>. De cada una de las diferentes muestras de líquido ruminal se tomaron 0.5 mL y se utilizó como inóculo para la primera dilución (10<sup>-1</sup>); las diluciones fueron 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup>. Se realizaron tres series de diluciones por cada muestra analizada, obteniéndose un total de nueve series.

**Cuadro 5. Solución para realizar diluciones**

Componente	Cantidad mL por 100 mL
Solución mineral I <sup>1</sup>	5.0
Solución mineral II <sup>2</sup>	5.0
Solución de resarzurina al 0.1 %	0.1
Agua	89.9

<sup>1</sup>Contiene por 1000 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0 g

<sup>2</sup>Contiene por 1000 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.0 g; NaCl, 12 g; MgSO<sub>4</sub>, 2.45 g; y CaCl 2H<sub>2</sub>O, 1.6 g.

De cada serie de dilución se tomaron 100 µL y se inocularon mediante la técnica de rastrilleo en las cajas de Petri que contenían el medio para *Streptococcus* sp. Una vez inoculados los medios se incubaron en jarra de anaerobiosis a 38 °C durante 48 horas. En las cajas de Petri que se observó desarrollo de colonias, se seleccionó la dilución 10<sup>-4</sup>, se eligieron diferentes colonias que de acuerdo a su

morfología presentaron dominancia y repetibilidad, con respecto a las otras series. Cada una de las colonias seleccionadas se tomaron con una asa bacteriológica estéril y se sembraron por triplicado en tubos de 18 x 150 mm que contenían 9 mL de medio líquido para estreptococos estéril (Merck, cuadro 6), los tubos inoculados se burbujearon con CO<sub>2</sub> bajo flama de mechero, se sellaron y se incubaron a 38°C

**Cuadro 6. Caldo de cultivo selectivo para el crecimiento de *Streptococcus bovis* (Merck®).**

Componente	Cantidad g L <sup>-1</sup>
Peptona de caseína	14.4
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	4.0
Glucosa	5.0
Citrato de sodio	1.0
L-cisteína	0.2
Sulfito de sodio	0.2
Azida sódica	0.2
Cristal de violeta	0.0002

durante 48 horas, el crecimiento se determinó por la turbidez del medio (Goad *et al.*,1998). Posteriormente estos cultivos se resembraron nuevamente en cajas de

Petri que contenían medio sólido para *Streptococcus sp.* para proceder al aislamiento de cultivos puros.

### **Caracterización e identificación de microorganismos aislados**

**Morfología de colonias.** Se caracterizaron tres colonias de acuerdo a su morfología tamaño, color, superficie y bordes, se utilizó un microscopio estereoscópico y observación directa para caracterizar las colonias bacterianas que crecieron en el medio de cultivo sólido para *Streptococcus sp.*

Las bacterias aisladas a partir de estas colonias fueron caracterizadas de acuerdo a los métodos descritos a continuación:

**Morfología de las bacterias.** Directamente de las cajas de Petri se tomó una colonia con una asa bacteriológica, se realizó un frotis y se observó al microscopio de contraste con el objetivo 100 X.

**Prueba de catalasa.** Se realizó un frotis y se colocó el reactivo directamente sobre el cultivo y después de unos segundos se obtuvo la reacción.

**Tinción de Gram.** Se preparó un frotis y se fijó la muestra a temperatura ambiente y con calor, inicialmente se añadió el cristal violeta, después de un minuto se lavó con agua corriente y se añadió yodo, después de un minuto se secó la muestra y se agregó el etanol y finalmente se añadió la safranina, la muestra se lavó y se secó. La muestra se observó al microscopio de contraste con el objetivo de 100 X (Harrigan y McCance, 1979).

## Identificación bioquímica de los *Streptococcus* aislados

La identificación las especies de estreptococos aislados se realizó empleando la técnica semiautomatizada API 20 Strep (bioMérieux) ver Cuadro 7.

**Cuadro 7. Pruebas y reacciones contenidas en la prueba API 20 Strep.**

Nombre de la celdilla	Reactivo	Reacción
VP	Piruvato	Producción de acetoina
HIP	Hipurato	Hidrólisis
ESC	Esculina	$\beta$ glucosidasa
PYRA	Pirrolidonil-2-naftilamida	Pirrolidonilarilamidasa
$\alpha$ GAL	6 Br 2 naftil $\alpha$ D galactopiranosida	$\alpha$ galactosidasa
$\beta$ GUR	Naftol SABIH $\beta$ glucuronato	$\beta$ glucoronidasa
$\beta$ GAL	2 naftil $\beta$ D galactopiranosida	$\beta$ galactosidasa
PAL	2 naftilfosfato	Fosfatasa alcalina
LAP	L-leucil 2 naftilamida	Leucinaarilamidasa
ADH	Arginina	Arginina dehidrolasa
RIB	Ribosa	Acidificación
ARA	L-arabinosa	Acidificación
MAN	Manitol	Acidificación
SOR	Sorbitol	Acidificación
LAC	Lactosa	Acidificación
TRE	Trehalosa	Acidificación
INU	Inulina	Acidificación
RAF	Rafinosa	Acidificación
AMD	Almidón	Acidificación
GLYG	Glucógeno	Acidificación

La prueba consiste en la identificación de *Streptococcus sp*, enterococos y puede diferenciar especies taxonómicamente afines. La prueba API 20 Strep comprende una galería que contiene 20 celdillas.

Las primeras celdillas (VP – LAP) comprenden reacciones enzimáticas, el resto (ADH – GLYG) son pruebas de acidificación de sustratos.

Las colonias aisladas de cultivo puro se tomaron de las cajas de Petri con un hisopo estéril y se depositaron en 2 mL de agua deionizada estéril, hasta que la solución tomó una turbidez mayor a 4.0 de McFarland, posteriormente con esta solución se inocularon las celdillas de la primera parte de la galería (VP a ADH) con 100  $\mu$ L; para inocular las celdillas de la segunda parte de la galería se mezcló la solución sobrante (0.5 ml) con una ampolleta de API GP Medium, la solución se homogenizó y se inocularon 200  $\mu$ L en las celdillas (ADH a GLYG); las anteriores celdillas se sellaron con aceite de parafina. El cultivo inoculado fue cultivado previamente por 24 horas en medio sólido para *Streptococcus sp*. Las galerías inoculadas se incubaron durante 24 horas a 38 °C. A las 4 horas se agregaron los reactivos reveladores y se hizo la primera lectura; a las 24 horas se realizó la segunda lectura, las pruebas se registraron como positivas o negativas de acuerdo al cambio en coloración especificado para cada sustrato, según el catalogo de procedimientos para esta prueba.

## **Conservación del cultivo de *Streptococcus bovis* aislado y viabilidad del liofilizado.**

### **Proceso de liofilizado.**

Una vez aislada e identificada la bacteria *Streptococcus bovis*, se realizó el proceso de liofilizado como método de conservación. Se utilizaron matraces de bola con capacidad de 1L con tapón de hule negro, que contenían 600 mL de medio de cultivo para bacterias totales que contenía glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA - FR) (Cobos y Yokoyama, 1995), modificado con la adición de 0.5 % de glucosa previamente esterilizada (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Medio anaerobio (GCA – FR) usado para liofilizar la bacteria *Streptococcus bovis*.**

Componente	Cantidad en 100 mL
Extracto de levadura, g	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.2
Glucosa, mg	500
Celobiosa, mg	60
Almidón, mg	60
Solución mineral I <sup>1</sup> , mL	5.0
Solución mineral II <sup>2</sup> , mL	5.0
Líquido ruminal clarificado <sup>3</sup> , mL	30.0
Solución de cisteína-sulfido <sup>4</sup> , mL	2.0
Sol. de carbonato de sodio al 8 %, mL	5.0
Agua destilada, mL	52.6
Solución de resarzurina al 0.1 %, mL	0.1

<sup>1</sup>Contiene por 1000 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0 g.

<sup>2</sup>Contiene por 1000 mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO<sub>4</sub>, 2.45 g y Ca Cl 2H<sub>2</sub>O, 1.6 g.

<sup>3</sup>Previamente filtrado a través de gasa y centrifugado a 23 000 g por 20 minutos a 8°C y esterilizado a 15 psi por 15 minutos.

<sup>4</sup>Se disolvieron 2.5 g de L-cisteína- HCL•2H<sub>2</sub>O en 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada, ajustando el pH de la mezcla a 10 con NaOH (2N); se agregaron 2.5 g de Na<sub>2</sub>S•9H<sub>2</sub>O y se aforó a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada; la solución estuvo en ebullición por 5 minutos con flujo de N<sub>2</sub> y se depositó en tubos con tapón de hule.

Los medios de cultivo se inocularon con la bacteria *Streptococcus bovis* aislada y fueron incubados a 39 °C durante 48 h, se comprobó la pureza del cultivo mediante observaciones al microscopio de contraste. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación diferencial a 13,000 g durante 5 min. La masa bacteriana se volvió a diluir con agua destilada estéril y se depositó en frascos serológicos de vidrio de 100 mL a razón de 40 mL por frasco; los frascos se mantuvieron en congelación durante 72 horas; posteriormente los microorganismos se liofilizaron en una liofilizadora Labconco ( Freeze Dry System, Frezone 4.5) a -30°C durante 72 h, de acuerdo a la metodología descrita por Hernández (2000).

### **Bacterias viables en el cultivo liofilizado**

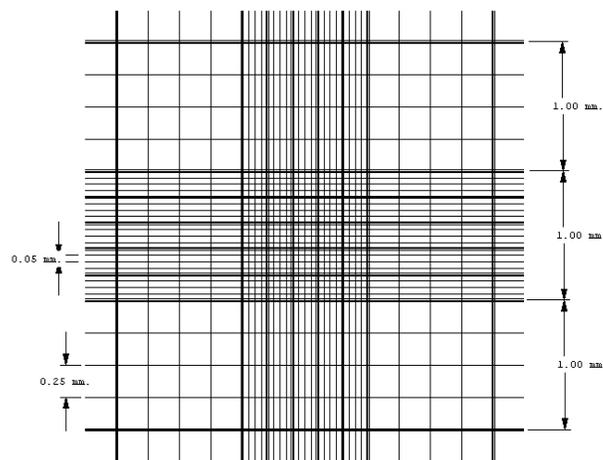
La concentración de bacterias viables de *Streptococcus bovis* en muestras frescas y liofilizadas se determinó por el método de número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979). El cultivo de *S. bovis* se utilizó después de 15 días de realizado el liofilizado. Para ello se elaboró el medio de cultivo anaeróbico GCA – FR (Cuadro 8) en tubos de cultivo 18 x 150 mm que contenían 9.9 ml de medio de cultivo, se inocularon por triplicado con 0.1 g de la bacteria *S. bovis* liofilizada, se agitó con un vortex y se realizaron diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-14}$ ; las diferentes diluciones se incubaron durante 72 horas a 39 °C. Posteriormente se tomaron lecturas de crecimiento, tomando como positivos aquellos medios que presentaron turbidez.

## Curva de crecimiento y tiempo de generación de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis* aislada.

### Determinación de la curva de crecimiento

Se utilizó como fuente de inóculo un cultivo liofilizado de *S. bovis*, el cual se inoculó a razón de 0.1 g por cada 9.9 ml de medio de cultivo anaerobio GCA-FR (Cuadro 8), se agitó hasta disolver el liofilizado. Los tubos inoculados fueron incubados a 39°C durante 24 horas para reactivar el cultivo liofilizado. El estudio se repitió por cuadruplicado. Posteriormente los tubos inoculados se incubaron durante 12 horas a 39°C, cada hora se retiraron los tubos de la incubadora y se midió la concentración de bacterias por mL de medio de cultivo, la absorbancia y el pH. La concentración de bacterias por mL de medio de cultivo se cuantificó en una cámara de Petroff-Hausser y un microscopio de contraste marca ZEISS con el objetivo 100 X. La concentración de bacterias se estimó en un volumen de  $5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$  de acuerdo a la siguiente fórmula, derivada de las dimensiones de la cámara Petroff-Hausser, ver

Figura 1:



**Figura 1. Dimensiones de la cámara Petroff-Hausser**

Bacterias por ml = promedio de bacterias contadas X Factor de dilución X 50 000

Para monitorear el crecimiento bacteriano y establecer la curva de crecimiento se midió la absorbancia directamente en los tubos de cultivo inoculados e incubados a 39°C durante 12 horas a 39°C, cada hora durante 12 horas; al término de cada hora de incubación, se retiraron los tubos de la incubadora con sus respectivas repeticiones, se vertieron en celdas de cuarzo y se realizó la lectura en un espectrofotómetro UV-VIS modelo LAMDA 40, Perkin Elmer calibrado a una longitud de onda de 600 nm; el pH también se midió cada hora con un potenciómetro portátil ORION Modelo 250.

### **Tiempo de generación de la bacteria *Streptococcus bovis***

Con los resultados obtenidos en la curva de crecimiento, se calculó el tiempo de generación de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis* en la fase de crecimiento exponencial, de acuerdo a la metodología descrita por Hernández, (2000):

$$n = (\text{Log}_{10} N_t - \text{Log}_{10} N_0) / 0.301t$$

Donde:

No: Absorbancia inicial (unidades Klett)

N: Absorbancia en tiempo posterior

t: Longitud de tiempo desde No a Nt expresada en horas o minutos

n: Número de generaciones en la fase exponencial

Además se calculó el tiempo de generación, tiempo (1/n), que es el tiempo requerido para que la población bacteriana se duplique.

**Experimento 3. Evaluación del tiempo de reactivación en la viabilidad de un cultivo liofilizado de *Streptococcus bovis* y la inducción de bacteriófagos contra esta bacteria.**

### **Primera etapa**

**Efecto del tiempo de reactivación en la viabilidad y el comportamiento de un cultivo liofilizado de la bacteria *Streptococcus bovis*.**

La reactivación del cultivo liofilizado de *Streptococcus bovis* se realizó en el medio de cultivo anaerobio para bacterias totales GCA – FR (Cobos y Yokoyama, 1995) con mayor concentración de glucosa (Cuadro 8). Se inocularon por triplicado con 0.1 g de cultivo liofilizado tubos de cultivo de 18 x 150 mm que contenían 9.9 ml de medio de cultivo y se realizaron diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-14}$ . Las diferentes diluciones fueron incubadas a 39 °C durante diferentes tiempos de acuerdo con los siguientes tratamientos:

### **Tratamientos experimentales**

Los tratamientos (T) para estimar el efecto del tiempo de hidratación del cultivo liofilizado fueron los siguientes: T1 = 0 h de incubación; T2 = 1 h de incubación; T3 = 2 h de incubación; T4 = 4 h de incubación. Los tratamiento 2, 3 y 4, se realizaron utilizando la dilución  $10^{-1}$  del T1.

### **Variables**

**Concentración de la bacteria *Streptococcus bovis*.**

En cada uno de los tratamientos se determinó la concentración total de bacterias *Streptococcus bovis* utilizando la técnica del número más probable (NMP), por medio de diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-14}$  con tres repeticiones por dilución, se incubaron durante 24 horas a 39 °C (Harrigan y McCance, 1979).

### **pH**

Las muestras de los distintos tratamientos se homogenizaron con un vortex, el pH se midió con un potenciómetro ORION Modelo 250A, calibrado a pH 4.0 y 7.0.

### **Concentración de lactato**

La concentración de lactato, se realizó siguiendo la metodología de lactato deshidrogenasa (Sigma, 1994), mediante el KIT No. DG1340-K , desde la hora cero hasta la hora cuatro de incubación. La lectura de las muestras se hizo en un espectrofotómetro modelo UV-VIS modelo LAMDA 40, Perkin Elmer UV-VIS calibrado a una longitud de onda de 340 nm.

### **Concentración de AGV**

Las distintas muestras se homogenizaron en un vortex, se centrifugaron a 3,500 g x 10 min, se separó el sobrenadante y se agregó ácido metafosfórico en una proporción 4:1 mL de muestra : ácido metafosfórico, respectivamente; las muestras se conservaron en congelación a  $-4$  °C hasta su posterior análisis. El contenido de AGV de las muestras se determinó por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961). Para medir AGV se tomaron 0.2  $\mu$ L de cada muestra y se inyectaron en un

cromatógrafo marca HP modelo 5890 serie II, con columna de formeril y superóxido de 1.2  $\mu\text{m}$ , un flujo de  $\text{N}_2$  de 3  $\text{mL min}^{-1}$  y una temperatura de columna, detector e inyector de 120, 150 130  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

## **Segunda etapa**

### **Inducción del bacteriófago específico de la bacteria *Streptococcus bovis*.**

**Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.** En esta etapa del experimento se utilizó el cultivo liofilizado de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis* previamente aislada. Para el crecimiento de la bacteria se utilizó el medio de cultivo para bacterias totales GCA – FR (Cobos y Yokoyama, 1995) + la adición de 0.5 % de glucosa (Cuadro 8); el cultivo fue incubado a 39  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas (hasta la fase exponencial).

**Inducción de bacteriófagos con Mitomicina C.** Se utilizó la metodología descrita por Klieve *et al.* (1989). Para inducir la fase lítica del bacteriófago se adicionó al cultivo de *Streptococcus bovis* en fase exponencial una solución de Mitomicina C, a una concentración final de 2  $\mu\text{g}$  por ml de medio, posteriormente el cultivo se incubó durante 24 horas a 39 $^{\circ}\text{C}$  .

**Detección y titulación de los bacteriófagos.** El cultivo de *Streptococcus bovis* inducido con Mitomicina C se centrifugó a 6000 x g en viales estériles durante 20 minutos para precipitar las bacterias lizadas y obtener del sobrenadante la solución de bacteriófagos, el sobrenadante se filtró en una membrana de disco de 0.20  $\mu\text{m}$  de poro. La presencia de bacteriófagos se determinó usando el método de

sembrado en medio sólido de la doble capa (Terzhaghi y Sandine, 1975; Madigan *et al.*, 1998), el sembrado se realizó por quintuplicado, en cada caja de Petri se dejó solidificar 15 mL de medio sólido para *Streptococcus sp.* (Cuadro 4), posteriormente en tubos de cultivo de 100 x 16 mm se preparó una solución que contenía 3 mL de agar blando para *Streptococcus sp.* (0.8 % de agar ), se dejó enfriar a 40 °C y se le agregó 100 µL de cultivo de *S. bovis* en fase de crecimiento exponencial y 100 µL de solución de bacteriófagos, la solución así preparada se mezcló con un vortex y se vertió en cada caja de Petri que contenía 15 mL de medio solidificado. Las cajas de Petri se mantuvieron durante 30 minutos a temperatura ambiente para facilitar la solidificación de la segunda capa de medio que contenía el bacteriófago y finalmente se incubaron a 39°C durante 48 horas en jarras de anaerobiosis.

### **Tratamientos experimentales**

Los tratamientos (T) empleados para esta fase del experimento fueron los siguientes: T 1 = inducción del bacteriófago con Mitomicina C (a una concentración de 2 µg por ml de medio) en una sola inducción; T 2 = inducción del bacteriófago con Mitomicina C (a una concentración de 2 µg por ml de medio), usando una solución concentrada de bacteriófagos de acuerdo a la técnica de Vargas y Zúñiga (1998). Para esto, luego de una incubación durante 24 horas a 39°C , el cultivo se centrifugó a 6000 x g en viales estériles durante 20 minutos, el sobrenadante se filtró y posteriormente se inoculó a razón de 0.5 mL del filtrado obtenido a un siguiente cultivo de *Streptococcus bovis* en fase exponencial y se incubó a 39 °C durante 24 horas. En total se realizaron cuatro transferencias hasta obtener una solución

concentrada de bacteriófagos. De la solución concentrada de bacteriófagos se realizaron diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ , en solución de extracto de levadura. Las cajas de Petri se dividieron en 8 cuadrantes, en cada uno de los cuadrantes se inoculó una microgota de aproximadamente 5  $\mu$ L de cada dilución de la solución concentrada de bacteriófagos; T 3 = inducción del bacteriófago con cloroformo de acuerdo a la técnica de Watson *et al.* (1987), para lo cual, en un tubo de 13 x 100 mm se colocaron 2 mL de caldo para *Streptococcus sp.* y 2 ml de cultivo de *Streptococcus bovis* en fase de crecimiento exponencial se mezclaron y se centrifugaron a 6000 x g durante 10 min; posteriormente se recuperó el sobrenadante en otro tubo y se agregó 1 ml de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 6000 x g durante 10 min para obtener el lisado fágico; después se realizaron diluciones, se tomaron 0.5 ml del lisado fágico y se mezclaron en un tubo de 15 x 150 mm con 4.5 mL de caldo para *Streptococcus sp.* (Cuadro 6), se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ; posteriormente para cada dilución se utilizó la técnica de la doble capa (Terzhaghi y Sandine, 1975; Madigan *et al.*, 1998), para detectar la presencia de bacteriófagos.

## **Variables**

### **Presencia de bacteriófagos**

Se determinó la presencia de bacteriófagos considerando la ausencia de crecimiento del cultivo bacteriano mediante la formación de un halo transparente en las placas inoculadas, o unidades formadoras de placa de lisis (UFPL) por mL de medio de cultivo de acuerdo a la metodología descrita por Terzaghi y Sandine, (1975).

### **Análisis estadístico**

Para la primera etapa del experimento 3, se utilizó un diseño completamente al azar, las unidades experimentales (tubos de ensayo con el medio de cultivo que contenían las diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-14}$ ) se distribuyeron aleatoriamente en cuatro tratamientos con tres repeticiones por tratamiento; para determinar diferencias entre tratamientos sobre la concentración de *Streptococcus bovis*, se calculó el intervalo de confianza (95 %) para la técnica del NMP, con la siguiente fórmula (Harrigan y McCance, 1979):

$$\text{Numero de bacterias ( intervalo) } = \text{NMP}/4.68 \text{ a } \text{NMP} \times 4.68.$$

En la segunda etapa del experimento 3, se empleó un diseño completamente al azar, las unidades experimentales (cajas de Petri que contenían el cultivo de *S. bovis*) se distribuyeron aleatoriamente en tres tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento.

El modelo estadístico para las dos fases del experimento 2, fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \xi_{ij}$$

**Donde:**  $\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento

$\xi_{ij}$  = Error experimental

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento Proc GLM del paquete estadístico SAS (2001) y las medias de tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Experimento 1. Evaluación *in vitro* del efecto de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas utilizando una dieta alta en grano.**

### pH del medio

Con línea punteada dentro del Cuadro 9, se marca la hora de incubación en que los diferentes tratamientos mantuvieron un pH en el límite inferior del rango óptimo (6.2 a 7.0) que requieren las bacterias ruminales para mostrar su máxima eficiencia fermentativa.

**Cuadro 9. pH de los medios a diferentes horas de incubación.**

Hora	T1	T2	T3	T4	T5	T6	EEM
0	6.81a	6.82a	6.81a	6.82a	6.81a	6.81a	0.015
1	6.75c	6.77b	6.81a	6.81a	6.82a	6.80b	0.016
2	6.44b	6.50b	6.78a	6.80a	6.82a	6.72a	0.046
3	6.22c	6.18c	6.75a	6.79a	6.76a	6.66b	0.042
4	5.78b	5.81b	6.50a	6.55a	6.61a	6.51a	0.059
5	5.44c	5.46c	6.04b	6.22b	6.21b	6.35a	0.091
6	5.35c	5.35c	5.19c	5.64b	5.66b	5.95b	0.073
7	5.32c	5.32c	5.17c	5.39b	5.45b	5.59a	0.067
8	5.27a	5.31 <sup>a</sup>	5.15c	5.23b	5.17c	5.26a	0.043

a, b, c: medias con literales distintas en la misma hilera, son diferentes ( $p < 0.05$ ).  
T1 = Tratamiento testigo (70 % sorgo más 30 % alfalfa). T2 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica. T3 = T1 + 1.5% sesquicarbonato de sodio. T4 = T1 + 1.5% bicarbonato de sodio. T5 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5% de bicarbonato de sodio. T6 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de bicarbonato de sodio.  
EEM= Error estándar de la media.

A la hora tres hubo disminución en el pH del medio de los tratamientos 1 y 2 ( $p < 0.05$ ) a un valor cercano al límite mínimo requerido para actividad bacteriana. Los tratamientos 3, 4, 5 y 6 mantuvieron un efecto amortiguador similar ( $p > 0.05$ ) hasta las cuatro h de incubación. A la hora cinco de incubación, solamente T4, T5 y T6 mantuvieron un pH superior a 6.2. Aunque, T6 mostró la mejor respuesta ( $p < 0.05$ ) comparado con T4 y T5.

Tanto el bicarbonato de sodio como el sesquicarbonato de sodio tienen un efecto amortiguador y evitan la disminución del pH del medio causada por la actividad fermentativa de las bacterias ruminales, lo que concuerda con la mayoría de los reportes al respecto (Kohn y Dunlap, 1998; Ruyet y Tucker, 1992). Sin embargo, el bicarbonato de sodio (T4) presentó una mejor actividad amortiguadora en los diferentes horarios de incubación evaluados. La adición del ionóforo (T2) no tuvo efecto benéfico y el pH disminuyó en forma similar al tratamiento testigo (T1), indicando que su actividad bacteriostática contra bacterias productoras de ácido láctico (Cuadro 13) no es suficiente para evitar la disminución del pH ruminal como se ha reportado (Owens, *et al.*, 1998). La adición del ionóforo con los amortiguadores, solamente mostró un efecto sinérgico en la mezcla con bicarbonato de sodio, con respecto al tratamiento sin lasalocida (T6 vs T4). El resultado obtenido es similar al reportado en un estudio *in vivo*, realizado por Phy y Provenza (1998).

A la hora cinco de incubación solamente T6 evitó la disminución del pH por debajo de 6.2. Sin embargo, a las seis h de incubación, todos los tratamientos

tuvieron un pH inferior a 6.2. Lo anterior es el resultado de la degradación microbiana de los carbohidratos de fácil fermentación y la acumulación de lactato (Nagaraja *et al.*, 1987). En otros estudios, se han reportado resultados variables, ya que ha sido necesario adicionar desde 0.8% (Kilmer *et al.*, 1981) hasta 5.6% de bicarbonato de sodio (Esdale y Satter, 1972) para mantener el pH ruminal igual o mayor a 6.2. Lo mismo ha ocurrido con la adición de lasalocida, ya que se ha reportado tanto una respuesta positiva (Nagaraja *et al.*, 1987), como negativa (Nagaraja *et al.*, 1982) en el pH y concentración de lactato en rumen. Aunque existen pocos estudios, se ha reportado que la adición de bicarbonato de sodio (5%) y monensina (33 ppm) a una dieta para terneros con 50 % concentrado y 50 % ensilado de maíz, mantuvo el pH ruminal en 6.69 por 5.5 h después de ofrecer el alimento (Rogers y Davis, 1982).

### **Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)**

La producción de acetato, propionato y AGV totales fue mayor en T4 y T6 ( $p < 0.05$ ), y la proporción acetato:propionato fue menor en los mismos tratamientos ( $p < 0.05$ , Cuadro 11). Es importante señalar que el tratamiento testigo (T1) presentó la menor producción de acetato y AGV totales, a pesar de que fue en este tratamiento, en el que se determinó el pH más ácido a partir de las tres horas de incubación (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Concentración (mM) de ácidos grasos volátiles y lactato a las seis horas de incubación.**

Variable	T1	T2	T3	T4	T5	T6	EEM
Acetato	3.07c	5.09b	5.04b	7.76a	4.5b	6.05a	1.18
Propionato	0.67b	0.96b	1.13b	2.97a	1.2b	2.12a	0.86
Butirato	0.36b	0.44b	0.63b	1.23a	0.81a	0.60b	0.40
Total	4.11c	6.49b	6.71b	11.95a	6.59b	9.12a	2.23
Acet:prop	4.58a	5.30a	4.46a	2.61c	3.75b	2.85c	0.84
Lactato	42.95a	38.44a	40.75a	23.13b	22.04b	13.15c	3.14

a, b, c: medias con literales distintas en la misma hilera, son diferentes ( $p < 0.05$ ).

T1 = Tratamiento testigo (70 % sorgo más 30 % alfalfa). T2 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica. T3 = T1 + 1.5 % sesquicarbonato de sodio. T4 = T1 + 1.5 % bicarbonato de sodio. T5 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de sesquicarbonato de sodio. T6 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5% de bicarbonato de sodio. EEM = Error estándar de la media.

La concentración de acetato, propionato y AGV totales fue mayor ( $p < 0.05$ ) en T4 y T6. En general, se menciona que el bicarbonato de sodio aumenta la producción total de AGV en rumen (Rogers y Davis, 1982). Con respecto a los ionóforos, se ha reportado un aumento en la producción de propionato (Fuller y Johnson, 1981), o de acetato y propionato (Nagaraja *et al.*, 1987) sin que aumente la producción total de AGV.

### **Concentración de lactato**

T6 tuvo la concentración más baja ( $p < 0.05$ ), seguida de T4 y T5, mientras que la concentración más alta se obtuvo en T1, T2 y T3, sin diferencias ( $p > 0.05$ ) entre ellos (Cuadro 10). Relacionando estos resultados con los obtenidos en pH, se

observa que la disminución del pH en los medios de cultivo a las tres y seis h está más relacionada con la concentración de lactato que con la de AGV totales.

En los tratamientos T4 y T6 se determinó la más baja ( $p < 0.05$ ) producción de ácido láctico, lo que explica que en estos tratamientos se mantuviera un  $\text{pH} > 6.2$  por una mayor período de tiempo. Contrario al reporte de McGuffey *et al.* (2001), los resultados obtenidos indican que la disminución del pH en los medios de cultivo está más relacionada con un aumento en la producción de ácido láctico, que con el aumento en la producción de AGV, dado que, es estos últimos incrementaron su concentración sin que disminuyera el pH en T4 y T6.

Russell y Chow (1993) mencionan que la acción del bicarbonato de sodio se puede explicar en gran parte por los efectos indirectos que produce en los animales que lo consumen, como por ejemplo, un aumento en: el consumo de agua, la dilución del fluido ruminal y el porcentaje de almidón no degradado en rumen. Sin embargo, en este estudio se utilizó un sistema cerrado, por lo que el efecto del bicarbonato se relaciona directamente con su capacidad amortiguadora.

### **Concentración de bacterias totales (BT)**

A las tres h de incubación, la concentración más alta de BT se tuvo en T1. No se encontraron diferencias entre los tratamientos 2, 5 y 6 ( $p < 0.05$ ) que fueron los tratamientos en los que se adicionó lasalocida (Cuadro 11). Los tratamientos 3 y 4 presentaron la concentración más baja de BT por mL de medio ( $45$  y  $75 \times 10^{10}$  respectivamente). Comparando la hora tres y seis de incubación, se determinó que en los tratamientos 1, 2 y 6 disminuyó la concentración de BT, mientras que en T3, T4 y T5 aumentó.

**Cuadro 11. Concentración de bacterias totales ( $10^{10}$ /ml) a tres y seis horas de incubación.**

Hora	T1	T2	T3	T4	T5	T6
3	1400a	150b	45c	75c	115b	115b
6	200b	95c	1400a	300b	1100a	30c

a, b, c: medias con distinta literal en la misma hilera, son diferentes ( $p < 0.05$ ).

T1 = Tratamiento testigo (70 % sorgo más 30 % alfalfa). T2 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica. T3 = T1 + 1.5 % sesquicarbonato de sodio. T4 = T1 + 1.5 % bicarbonato de sodio. T5 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de sesquicarbonato de sodio. T6 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de bicarbonato de sodio.

### **Concentración de bacterias celulolíticas (BC)**

En los tratamientos 1, 2 y 3 se determinó la menor concentración de BC a las tres h de incubación (Cuadro 12), mientras que, T4 mostró la mayor concentración de BC ( $p < 0.05$ ). Con excepción del tratamiento testigo, en todos los tratamientos se determinó una disminución en la concentración de BC a las seis h de incubación, sin embargo, fue más significativo ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos 2 y 6. Lo que indica que el efecto está más relacionado con la adición de la lasalocida, y no con el pH del medio, dado que en T6 se obtuvo el mejor pH a la hora seis de incubación.

**Cuadro 12. Concentración de bacterias celulolíticas ( $10^4$ /mL) a tres y seis horas de incubación.**

Hora	T1	T2	T3	T4	T5	T6
------	----	----	----	----	----	----

3	25c	25c	25c	1400a	150b	95b
6	25b	4c	15b	250a	20b	9c

a, b, c: medias con literales distintas en la misma hilera, son diferentes ( $p < 0.05$ ).  
T1 = Tratamiento testigo (70 % sorgo más 30 % alfalfa). T2 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica. T3 = T1 + 1.5 % sesquicarbonato de sodio. T4 = T1 + 1.5 % bicarbonato de sodio. T5 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de sesquicarbonato de sodio. T6 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de bicarbonato de sodio.

### Concentración de bacterias productoras de lactato (BPL)

La concentración más baja de BPL (Cuadro 13), se tuvo en el tratamiento 2 (con ionóforo) y 4 (con bicarbonato de sodio) a la hora tres de incubación ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en los tratamientos 5 y 6 en los cuales se adicionó lasalocida no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) con el tratamiento testigo. A la hora seis no hubo diferencia entre tratamientos ( $p > 0.05$ ), lo permite estimar que la actividad del ionóforo se limitó a las primeras tres h de incubación.

**Cuadro 13. Concentración de bacterias productoras de lactato ( $10^6$ /mL) a tres y seis horas de incubación.**

Hora	T1	T2	T3	T4	T5	T6
3	110a	25b	140a	25b	140a	110a
6	140a	110a	140a	140a	140a	140a

a, b: medias con literales distintas en la misma hilera, son diferentes ( $p < 0.05$ ).  
T1 = Tratamiento testigo (70 % sorgo más 30 % alfalfa). T2 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica. T3 = T1 + 1.5 % sesquicarbonato de sodio. T4 = T1 + 1.5 % bicarbonato de sodio. T5 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de sesquicarbonato de sodio. T6 = T1 + 30 ppm de lasalocida sódica + 1.5 % de bicarbonato de sodio.

En todos los tratamientos, la concentración de bacterias totales estimada, se encuentra dentro del rango normal (Yokoyama y Johnson, 1988). Sin embargo, es importante señalar que la inclusión del ionóforo sólo o en combinación con bicarbonato (T2 y T6), disminuyó ( $p < 0.05$ ) la concentración de BT a las tres y seis h de incubación. Se sabe que la concentración de bacterias celulolíticas disminuye cuando el pH del medio es menor a 6.2 (Mould y Orskov, 1983), o en dietas altas en almidón, aunque el pH del medio sea mayor a 6.2 (EL-Shazly *et al.*, 1961; Goad *et al.*, 1998); por tanto, se puede considerar como normal la concentración de BC calculada ya que se simuló una dieta con una proporción alta en grano (70%) y baja en forraje (30%). De cualquier manera, es importante señalar que al igual que con BT, la adición de la lasolacida (T2) o de lasalocida más bicarbonato de sodio (T6) disminuyeron ( $p < 0.05$ ) la concentración de BC con respecto al tratamiento testigo. El ionóforo mostró su actividad contra bacterias productoras de ácido láctico (T2), sin embargo, en combinación con los amortiguadores (T5 y T6) no tuvo efecto. Además, la disminución en la concentración de BPL sólo se detectó a las tres h de incubación, ya que, a las seis horas de incubación no se detectó diferencia ( $p > 0.05$ ) en la concentración de BPL entre los diferentes tratamientos, lo que permite suponer que su efecto es limitado con relación al tiempo de dosificación. De cualquier manera, la concentración determinada de BPL, tanto a las tres como a las seis h de incubación es alta. La concentración normal de BPL en rumen es de  $10^7 \text{ mL}^{-1}$ ; mientras que en animales con ARS, es de  $10^{10} \text{ mL}^{-1}$  (Martín y Rusell, 1987; Goad *et al.*, 1998). Por tanto, se estima que la concentración del ionóforo utilizada en este estudio, no evito el crecimiento excesivo de este tipo de bacterias.

**Experimento 2. Aislamiento, caracterización, curva de crecimiento, tiempo de generación y conservación mediante el proceso de liofilizado de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis*.**

**Aislamiento y caracterización.** La bacteria ruminal *Streptococcus bovis* se logró aislar en un medio comercial sólido para *Streptococcus sp.* (Merk). También se logró expresar su crecimiento en un medio de cultivo anaerobio para bacterias totales GCA – FR, (Cobos y Yokoyama, 1995) + la adición de 0.5 % de glucosa.

**Identificación.** La prueba API 20 Strep, permitió comprobar que la bacteria aislada del rumen de ovinos pertenece a la especie *Streptococcus bovis* (Cuadro 15). La prueba API 20 Strep también permitió identificar otros *Streptococcus* que desarrollaron colonias en el medio sólido usado (Cuadro 5) como *Enterococcus avium*, *Enterofacium* y *Aerococcus viridians*. La especie *Streptococcus bovis* aislada, presentó las siguientes características: forma ovoide (0.8 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro) Gram positiva, no motil, no forman endosporas, catalasa negativo, se agrupa en pares, pero generalmente forma cadenas largas en forma moderada de cuatro, seis y hasta ocho células. *S. bovis* es un microorganismo anaerobio ruminal, y forma parte de la flora natural de las mucosas del tubo digestivo, respiratorio y genitourinario de numerosos mamíferos (Sneath *et al.*, 1986; Joklik *et al.*, 1997; Schlegel *et al.*, 2003), esta bacteria es ácido resistente y puede proliferar a un pH ácido menor a 5.0 (Asanuma y Hino, 2004).

*Streptococcus bovis* desarrolló colonias en forma circular con un diámetro de 1.0 a 2.0 mm en diluciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ , en la superficie del agar presentó un color

blanco cremoso, la elevación de la colonia es convexa con la superficie brillante y el borde entero.

En el comportamiento metabólico, los resultados obtenidos de la prueba API 20 Strep (Cuadro14), revelaron que la bacteria *Streptococcus bovis* puede utilizar ribosa, manitol, lactosa, trehalosa, rafinosa, almidón y glucogeno; hidroliza esculina,  $\alpha$ -galactosa y leucina.

**Cuadro 14. Caracterización bioquímica de un *Streptococcus* ruminal con el uso del API 20 Strep**

Tiempo h	VF	HIP	ESC	PYRA	$\alpha$ GAL	$\beta$ GUR	$\beta$ GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	
4	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24			+							-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
VT																					
4	5			2			4			0			0			0			0		
24	5			2			4			2			5			5			3		
Código*	<b>5242553</b>																				
Repetición																					
4	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24			+							-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
VT																					
4	2			2			5			0			0			0			0		
24	6			2			5			0			4			4			3		
Código*	<b>6250443</b>																				

VP, Piruvato ; HIP, hidrólisis de hipurato; ESC, hidrólisis de esculina; PYRA, pirrolidoni- arilamidasa;  $\alpha$ GAL, alfa galactosidasa;  $\beta$ GUR, beta glucoronidasa;  $\beta$ GAL, beta galactosidasa; PAL, fosfatasa alcalina; LAP, leucina arilamidasa; ADH, Arginina; RIB, ribosa; ARA, arabinosa; MAN, manitol; SOR, sorbitol; LAC, lactosa; TRE, trehalosa; INU, inulina; RAF, rafinosa; AMD, almidón; GLYG, glucogeno.  
+ = reacción positiva; - = reacción negativa; VT = valor total para obtener el código

**\*El código 5242553 y 6250443 corresponde a la especie *Streptococcus bovis***

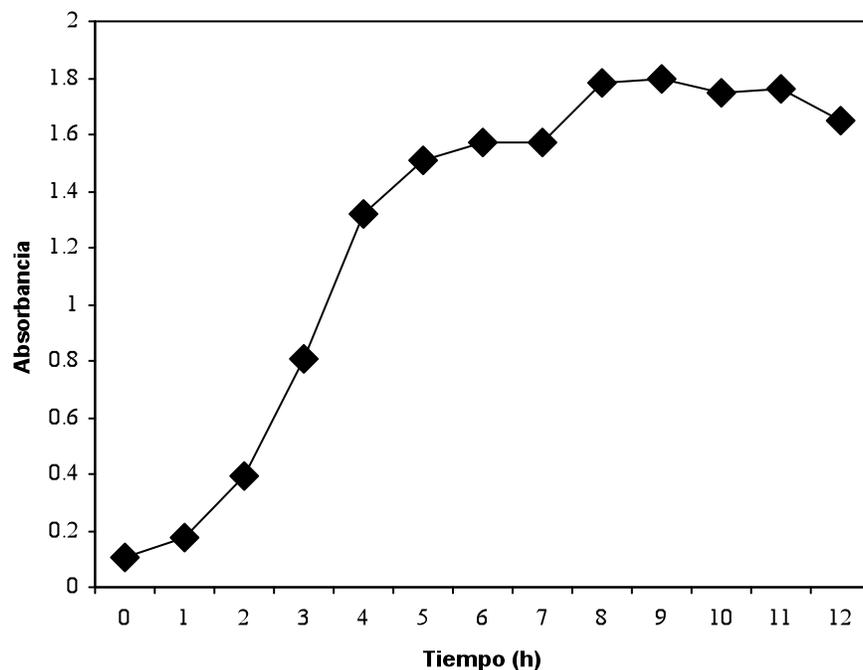
Los resultados en la identificación bioquímica de *Streptococcus bovis* (Cuadro 14) coinciden con los obtenidos por Russell y Robinson (1984); Russell (1985),

quienes determinaron que *S. bovis* utiliza celobiosa y cadenas cortas hidrosolubles de celulodextrinas liberadas por bacterias ruminales celulolíticas. Por otra parte, en investigaciones anteriores presentadas por Russell y Baldwin (1978) indicaron que *S. bovis* tiene mayor afinidad por sucrosa y maltosa que por glucosa o celobiosa. Es importante destacar la capacidad de *S. bovis* para hidrolizar el almidón (originando maltosa y glucosa), mediante una enzima similar a una alfa amilasa; además, tiene la capacidad de utilizar disacáridos como lactosa, maltosa, y sucrosa. Existen evidencias de que los disacáridos son fosforilados y transportados hacia el interior de la bacteria (Martín y Russell, 1987; Sneath *et al*, 1986). En general, se sabe que *Streptococcus bovis* no utiliza como fuente de energía productos de la degradación de polisacáridos como pentosas (producto de la degradación de los xilanos), y ácidos urónicos (producto de la degradación de la pectina). Sin embargo, de acuerdo al perfil metabólico determinado con la prueba API 20 Strep, se determinó que la especie de *S. bovis* aislada es capaz de fermentar galactosa, ácido glucorónico, manosa (ver Cuadro 14) que están presentes en hemicelulosa de los forrajes. Los azúcares solubles y las pectinas se degradan rápidamente en menos de una hora (Cotta y Withehead, 1993; Mantovani y Russell, 2001; Krauze y Oetzel, 2006). Por su parte Asanuma *et al.* (2004), han demostrado que *Streptococcus bovis* utiliza preferentemente glucosa con relación a la lactosa, indicando con ello que la bacteria posee un sistema de represión catabólica para la utilización de lactosa.

En este estudio se confirma la posibilidad de aislar especies de bacterias ruminales del género *Streptococcus* y en particular de *S. bovis*, utilizando un medio de cultivo comercial sólido selectivo para estreptococos (Merk), o un medio anaerobio

a base de GCA – FR, comúnmente utilizado en el estudio de bacterias ruminales (Hungate, 1969; Cobos y Yokoyama, 1995). Lo cual resulta muy favorable, en comparación con el medio de cultivo propuesto por Martin y Russell (1987), el cual requiere un mayor número de ingredientes para su preparación (ver Cuadro 3).

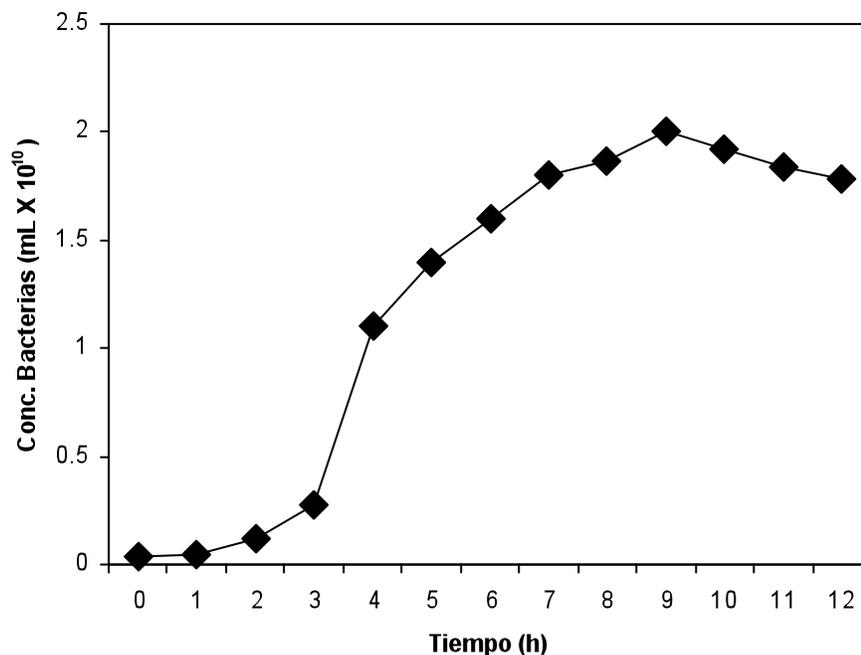
La curva de crecimiento obtenida de la bacteria *S. bovis* se ilustra en las Figuras 2 (absorbancia) y 3 (bacterias por mL) .



**Figura 2. Curva de crecimiento de un cultivo de *Streptococcus bovis*, con base a su absorbancia**

La fase lag se presentó durante las dos primeras horas de incubación, esta fase representa el periodo de adaptación de la bacteria al reconocimiento de los sustratos del medio de cultivo y el tiempo requerido para que inicie la síntesis de

enzimas específicas para degradar los sustratos del medio (Brown *et al.*, 2000). A partir de las 3 h inició el crecimiento exponencial y continuó así sostenido hasta las 9 h de incubación que fue cuando alcanzó el máximo crecimiento microbiano; a partir de las 9 h de incubación los valores de absorbancia se mantienen hasta las 12 h de incubación (fase de latencia), y se estima que la población bacteriana inicia su fase de muerte a partir de las 12 h de incubación. El tiempo de generación calculado, tomando como referencia los valores de absorbancia de la fase exponencial de la curva de crecimiento de la bacteria (entre la hora 3 y 9) fue de 14 min.



**Figura 3. Curva de crecimiento de un cultivo de *Streptococcus bovis*, con base a su concentración de bacterias por mL de medio de cultivo**

El comportamiento de la curva de crecimiento estimada por absorbancia (Figura

2) y por concentración de bacterias por mL de medio de cultivo (Figura 3) fue muy similar y se estableció una correlación de 0.9835 con una  $R^2$  de 0.9674, lo que indica que ambos métodos usados para estimar el crecimiento microbiano son equiparables considerando que los valores de absorbancia, son más fáciles de medir se sugiere el uso de esta técnica en futuros experimentos en los que se requiere medir la concentración de bacterias por mL de medio de cultivo.

Durante el desarrollo de la curva de crecimiento de la población de *S. bovis* se observó un descenso del pH (Cuadro 15) a partir de las 5 h, disminuyendo

**Cuadro 15. Valores de absorbancia, concentración de bacterias y pH obtenidos durante la curva de crecimiento de *Streptococcus bovis*.**

Tiempo de incubación h	Absorbancia a 600 nm	Bacterias por mL ( $10^{10}$ )	pH
0	0.1053	0.034	7.12
1	0.1757	0.044	7.08
2	0.3924	0.120	7.15
3	0.8061	0.280	7.12
4	1.3160	1.100	6.98
5	1.5106	1.400	6.75
6	1.5726	1.600	6.51
7	1.5740	1.800	6.35
8	1.7800	1.870	6.12
9	1.8000	2.000	5.86
10	1.7500	1.920	5.75
11	1.7600	1.840	5.69
12	1.6500	1.780	5.64

continuamente hasta las 9 h, registrándose un valor de pH menor a 6.0 a partir de las 9 h de incubación. Después de esta hora el descenso de pH fue menos marcado

registrando un valor de 5.64 a las 12 h. El descenso de pH fue propiciado por la acumulación de ácidos grasos volátiles producto de la fermentación bacteriana y por la producción de ácido láctico producto del metabolismo de los carbohidratos utilizados por *S. bovis* (Keunen *et al.*, 2002).

Los resultados de la curva de crecimiento (Figura 2 y 3) son similares con los obtenidos por Cotta y Withehead (1993) quienes determinaron que la tasa de crecimiento en cultivos continuos es de  $3\text{h}^{-1}$ , con una tasa de generación de 14 min (tiempo para que el cultivo bacteriano doble su población); mientras que, en medios de cultivo cerrados la tasa de crecimiento fue de aproximadamente de  $2\text{h}^{-1}$ , con una tasa de generación de 21 min. Por lo anterior, se estima que el medio de cultivo usado permite que la especie *Streptococcus bovis* aislada desarrolle una rápida tasa de crecimiento, lo cual coincide con otros reportes en los que se han usado medios de cultivo estandar o con un exceso de nutrientes (Martín y Rusell, 1987; Asanuma y Hino, 2004).

Durante la curva de crecimiento, *Streptococcus bovis* puede incrementar su masa bacteriana en pocas horas desde una concentración de  $10^7$  por mL a  $10^{10}$  bacterias por mL con la consiguiente acumulación de ácido láctico, lo que causa un descenso de pH del medio cercano a 5.0. Se ha reportado que en periodos de rápido crecimiento de *S. bovis*, el pH del medio puede llegar a valores entre 4.0 y 4.5, a este pH se inhibe la tasa de crecimiento de esta bacteria (Rusell y Robinson, 1984; Cotta y Withehead 1993; Stone, 2004). Por lo anterior, y de acuerdo a la disminución del pH que se obtuvo (ver Cuadro 15), se considera que el mejor tiempo para recuperar bacterias en fase de crecimiento, en sistemas cerrados, es antes de las 9 h de

incubación. Los resultados obtenidos en pH (Cuadro 15) coinciden con los observados durante el crecimiento de bacterias en sistemas continuos, donde la máxima fermentación ocurre entre las 4 y 8 h de incubación, observándose la acumulación de productos metabólicos bacterianos como AGV y ácido láctico (Wallace, 1994; Owens *et al.*, 1998; Asanuma y Hino, 2004). Además, Krauze *et al.* (2002) mencionan que la disminución del pH es el resultado de la pérdida de la capacidad amortiguadora (buffer) en el rumen, como consecuencia de un desequilibrio entre la producción de protones y de su eliminación del medio ruminal. El pH ruminal depende fundamentalmente de 3 factores, la producción de ácidos, la capacidad amortiguadora del medio ruminal y la eliminación de protones por absorción a través de la pared ruminal o por flujo al tracto digestivo posterior. La fermentación produce varios compuestos orgánicos, siendo los AGV y el ácido láctico los más importantes. La constante de disociación (pKa) de los AGV es baja, siendo de 4.76; 4.87, y 4.81 para acético, propiónico y butírico respectivamente; cuando el pH ruminal es normal (6.4 – 7.2), los AGV se encuentran mayormente disociados, cediendo un protón al medio y provocando una disminución en el pH. Sin embargo, como se mencionó, la disminución del pH ruminal, no solo es el resultado de la cantidad de ácidos producidos, sino también, de otros factores como la capacidad amortiguadora, y la tasa de pasaje del contenido ruminal hacia el tracto posterior. En el presente estudio, se utilizó un sistema de cultivo cerrado, por lo que para controlar la caída del pH del medio de cultivo, solo se pudo adicionar amortiguadores de pH (ver Cuadro 8), mientras que la eliminación de los ácidos producidos no se pudo evitar (Calsamiglia y Ferret, 2002).

**Viabilidad del liofilizado.** La concentración total de bacterias *Streptococcus bovis* (por gramo) fue de  $25 \times 10^{10}$  antes del proceso de liofilizado y  $20 \times 10^{10}$  después del liofilizado. Estos resultados indican una viabilidad en el producto liofilizado de 80 %, lo que permite estimar que el proceso de liofilizado es un método de conservación de la masa bacteriana muy eficiente para conservar la viabilidad bacteriana.

Algunas bacterias son sensibles a este método de conservación, y sus niveles de supervivencia disminuyen significativamente después de ser sometidas al proceso de liofilizado, e incluso su almacenamiento prolongado hace que la viabilidad celular disminuya aún más (Tsukamura 1984; Nomura *et al.*, 1998).

La preservación de cultivos microbianos puros mediante el proceso de liofilizado debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos. La conservación debe garantizar la supervivencia de al menos el 70 % de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original; de igual manera, debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y la pureza del cultivo (Weng *et al.*, 2005). Distintos factores pueden afectar la viabilidad de los microorganismos liofilizados, entre los que destacan la naturaleza de la cepa, las condiciones de cultivo, la fase de la curva de crecimiento en que fueron recolectados y el modo de rehidratación. Otro factor importante que se debe considerar es la concentración bacteriana a liofilizar, lo más adecuado es liofilizar suspensiones microbianas con una concentración entre  $10^8$  a  $10^9$  bacterias por mL (Delgado *et al.*, 1995). Además se ha sugerido el uso de sustancias como la leche descremada, peptonas, glutamato de sodio y ciertos azúcares como

protectores para mantener una alta la viabilidad de cultivos bacterianos liofilizados durante el proceso de congelación, sublimación y el almacenamiento prolongado (Moreira *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1995). En el presente estudio, no se agregó ninguna sustancia o compuesto para mejorar la recuperación de bacterias viables, y se logró una viabilidad de 80 %, por lo que se estima que la especie de *S. bovis* aislada es altamente resistente al proceso de liofilizado.

### **Experimento 3. Evaluación del tiempo de reactivación en la viabilidad de un cultivo liofilizado de *Streptococcus bovis* y la inducción de bacteriófagos *in vitro* contra esta bacteria.**

#### **Primera etapa**

#### **Efecto del tiempo de reactivación en la viabilidad y el comportamiento de un cultivo liofilizado de la bacteria *Streptococcus bovis*.**

Para este ensayo, se utilizó el cultivo aislado de *S. bovis* 40 días después del liofilizado. En cuanto al tiempo de reactivación del cultivo liofilizado de *Streptococcus bovis*, la concentración de las bacterias del tratamiento T4 (4 h de rehidratación del cultivo liofilizado) fue la mayor ( $p < 0.05$ ), obteniéndose  $45 \times 10^{10}$  bacterias viables  $g^{-1}$  de liofilizado (Cuadro 16), no se presentaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos T1, T2 y T3. La mayor concentración de bacterias que se determinó en T4 lo que indica que el cultivo bacteriano liofilizado es sensible al tiempo de rehidratación, por tanto su supervivencia y actividad es mejorada cuando se da al menos 4 h de hidratación (Tsukamura 1984; Nomura *et al.*, 1998).

**Cuadro 16. Concentración de *Streptococcus bovis* ( $10^8 \text{ ml}^{-1}$ ) en los tratamientos evaluados después de 72 h de incubación**

Tratamiento	Concentración	Intervalo de confianza
T1	2.0 a	4 - 93
T2	4.5 a	9 - 210
T3	15.0 a	32 - 700
T4	4500 b	900 - 21000

a, b: Medias con distinta literal en la columna son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

T1 = 0 horas de hidratación. T2 = 1 hora de hidratación. T3 = 2 horas de hidratación. T4 = 4 horas de hidratación.

Intervalo de confianza a 95 %.

Los valores de pH en los distintos tratamientos (Cuadro 17) fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) obteniendo un pH menor en el T4 de 5.11, lo que resulta lógico, si se considera que este tratamiento tuvo el mayor tiempo de rehidratación (4) del cultivo liofilizado y se logró un mayor crecimiento bacteriano (Cuadro 17), dando como resultado de la fermentación una mayor acumulación de AGV y lactato causado por la actividad fermentativa de *S. bovis*; lo que originó el descenso del pH del medio de cultivo (ver Cuadro 17 y 18).

La concentración más alta de lactato ( $p < 0.05$ ; Cuadro 17), se obtuvo en el T3 y T4 respectivamente, la concentración más baja se obtuvo en el T1 y T2, los cuales presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre ellos.

**Cuadro 17. pH y concentración (mmol L<sup>-1</sup>) de lactato en los tratamientos evaluados a las 72 h de incubación**

Variable	T1 <sup>†</sup>	T2	T3	T4	EEM
pH	6.86 a	6.18 b	5.83 c	5.11 d	0.042
Lactato	6.88 d	13.44 c	22.72 b	46.81 a	0.501

a, b, c, d: Medias con literal distinta en una hilera, son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

T1 = 0 horas de hidratación. T2 = 1 hora de hidratación. T3 = 2 horas de hidratación.

T4 = 4 horas de hidratación.

EEM = Error estándar de la media.

La concentración de acetato y AGV totales fue mayor ( $p < 0.05$ ) en T3 y T4 (cuadro 18). Por otra parte T1 y T2 produjeron la menor proporción de acetato y AGV. En general, se observó que a medida que se aumenta el tiempo de hidratación del cultivo liofilizado de *S. bovis*, su crecimiento y metabolismo es más eficiente. Por tanto se recomienda que antes de iniciar pruebas microbiológicas con cultivos de *S. bovis* conservados por liofilización, se debe rehidratar el cultivo por 4 horas.

**Cuadro 18. Concentración (mmol L<sup>-1</sup>) de ácidos grasos volátiles después de 72 horas de incubación.**

Variables	T1	T2	T3	T4	EEM
Acetato	27.06 c	28.92 bc	36.40 b	44.54 a	1.72
Propionato	6.01 a	7.14 a	7.08 a	6.89 a	0.27
Butirato	3.24 c	3.67 bc	4.23 a	3.78 ab	0.11
Total	33.07 d	39.73 c	47.71 b	55.21 a	0.75

a, b, c: Medias con literal distinta en una hilera, son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

T1 = 0 horas de hidratación. T2 = 1 hora de hidratación. T3 = 2 horas de hidratación.

T4 = 4 horas de hidratación.

EEM = Error estándar de la media

Distintos factores pueden afectar la viabilidad de microorganismos conservados por liofilización, entre los que destacan los componentes del medio de cultivo, el modo de rehidratación y la concentración inicial de bacterias por gramo de liofilizado. Se considera que para que un cultivo bacteriano liofilizado tenga un desarrollo adecuado, se requiere concentración mínima inicial de  $10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  (Borrego *et al.*, 2001).

En el presente estudio se determinó que cuando no se da un proceso de hidratación a la masa bacteriana liofilizada (ver Cuadro 16, T1), se obtiene una concentración de  $2 \times 10^8$  bacterias por mL de cultivo. Dicha concentración, cumple la observación hecha por Delgado *et al.* (1995) y Borrego *et al.* (2001). Sin embargo, en este estudio se demuestra que un proceso de hidratación de 4 h (T4), mejora significativamente ( $p < 0.05$ ) la cantidad de bacterias viables por gramo de masa bacteriana liofilizada ( $4,500 \times 10^8$ ) con respecto al tratamiento que no tuvo un proceso de hidratación (T1).

La disminución del pH en los distintos tratamientos (Cuadro 17) se debe a la fermentación microbiana de los carbohidratos de fácil fermentación y a la acumulación de AGV y lactato en el medio de cultivo (Nagaraja *et al.*, 1982). Por lo tanto, en sistemas de cultivo cerrados el control del pH es importante para el mantenimiento de una fermentación equilibrada; la disminución del pH es el resultado de la pérdida de la capacidad amortiguadora del medio de cultivo, causada por un aumento o acumulación excesiva de protones ( $\text{H}^+$ ), lo que produce una saturación del sistema amortiguador del medio de cultivo (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Por lo anterior, se estima que la hidratación del liofilizado de *S. bovis* por 4 horas resulta en una mayor concentración de bacterias viables por mL de medio de cultivo (Cuadro 16), lo que a su vez, causa una mayor disminución en el pH del medio (Cuadro 17); por tanto, se sugiere incrementar la capacidad amortiguadora del medio de cultivo usado para el estudio de *S. bovis*. Esto se puede lograr incrementando la concentración molar del fosfato de potasio monobásico y dibásico en el medio de cultivo anaerobio GCA-FR (ver Cuadro 8).

Cuando se relacionan los resultados de lactato con los valores obtenidos de pH (Cuadro 17), se observa una relación inversa, a medida que disminuye el pH en los distintos tratamientos, aumentó la concentración molar de ácido láctico, lo cual concuerda con lo reportado por Cobos *et al.* (2005), y Owens *et al.* (1998). Quienes reportan que en medios ricos en almidón la producción de lactato incrementa rápidamente y alcanza concentraciones de hasta 100 mM, mientras que, la disminución del pH a valores ácidos inicia cuando la concentración molar de lactato alcanza valores de 50 mM/mL de medio de cultivo. En estudios realizados por Asanuma *et al.* (2004) se estima que la producción de lactato por *Streptococcus bovis* está regulada por las enzimas lactato dehidrogenasa (LDH) y piruvato formatoliasa (PFL), el incremento en la producción de lactato se da por incremento en la síntesis de LDH y simultáneamente disminuye la producción de formato por la disminución de la síntesis de PFL en respuesta al descenso del pH del medio y a un exceso de energía. Por tanto, se puede esperar que en un sistema de cultivo cerrado, rico en carbohidratos de fácil fermentación, continúe la producción de lactato y la acidificación del medio de cultivo, hasta que la acidez del medio de cultivo inhiba

el crecimiento y actividad de *S. bovis*. Los AGV producidos durante este experimento influyeron para disminuir el pH en los distintos tratamientos (Cuadro 18), lo cual concuerda con lo reportado por McGuffey *et al.* (2001). En contraste Calsamiglia y Ferret, (2002) reportan que existe una baja correlación entre la concentración de AGV y el pH ruminal, además indican que otros factores ajenos a la concentración de AGV son importantes en la determinación del pH, entre los que destacan la capacidad amortiguadora del medio ruminal. En rumiantes, la capacidad amortiguadora del rumen depende de tres factores principales: la cantidad de saliva segregada, la capacidad amortiguadora de los alimentos ingeridos y la capacidad amortiguadora de los productos de la fermentación.

## **Segunda etapa**

### **Inducción del bacteriófago en contra de la bacteria *Streptococcus bovis*.**

Se realizó la inducción de un bacteriófago específico de la bacteria *Streptococcus bovis*, usando inducción directa con mitomicina C (T1); una solución concentrada de bacteriófagos (T2) y la inducción con cloroformo (T3).

Los resultados indican que hubo diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ; Cuadro 19). El T2 fue el que presentó la mayor concentración de bacteriófagos reportados como unidades formadoras de placa de lisis (UFPL) y T3 tuvo la menor concentración. T2 presentó una concentración de  $1.4 \times 10^4$  UFPL  $\text{mL}^{-1}$ , cuyo valor es bajo en comparación a lo reportado por Iverson y Millis (1977) de  $1 \times 10^6$  UFPL  $\text{mL}^{-1}$ .

**Cuadro 19. Concentración de bacteriófagos (por mL<sup>-1</sup> de cultivo) de la bacteria *Streptococcus bovis* en los distintos tratamientos.**

Tratamiento	Concentración UFPL
T1	3.7 x 10 <sup>3</sup> a
T2	1.4 x 10 <sup>4</sup> b
T3	1.0 x 10 <sup>2</sup> a
EEM	6.54 X 10 <sup>2</sup>

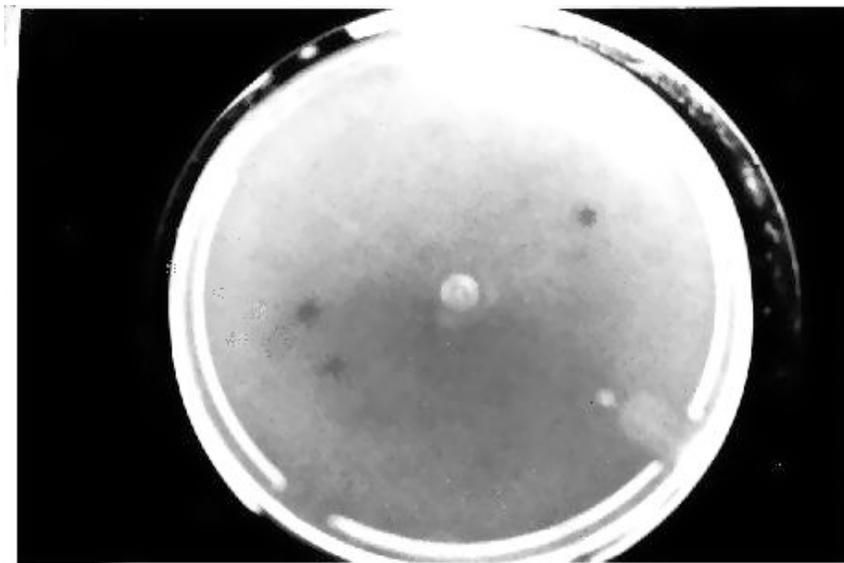
a, b: Medias con distinta literal en la columna son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

T1 = Una sola inducción del bacteriófago con Mitomicina C a una concentración de 2  $\mu\text{g}$  por ml de medio; T2 = Serie de cuatro inducciones del bacteriófago con Mitomicina C a una concentración de 2  $\mu\text{g}$  por ml de medio (solución concentrada de bacteriófagos); T3 = Inducción del bacteriófago con cloroformo

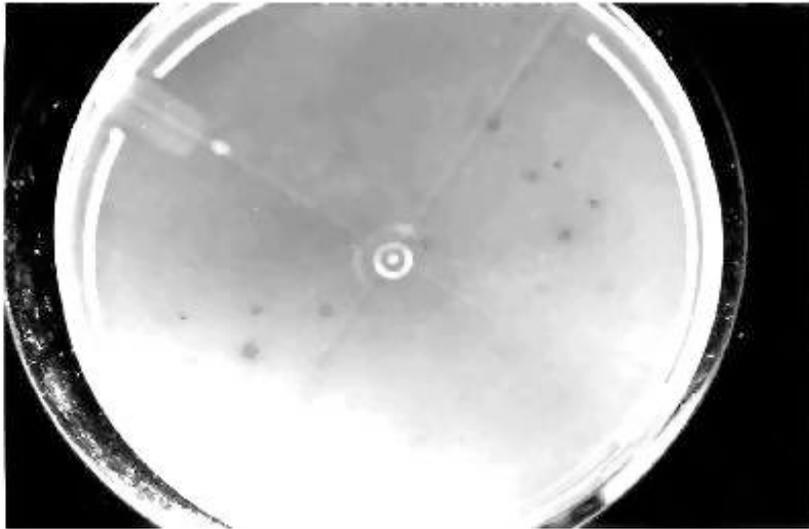
UFPL = Unidades formadoras de placa de lisis.

EEM = Error estándar de la media.

La mayoría de las placas producidas por el bacteriófago de *Streptococcus bovis* en los distintos tratamientos fueron claras y pequeñas con un diámetro de 0.2 – 0.4 mm; también se observaron algunas placas turbias de 0.9 – 1.2 mm de diámetro (ver Figura 4 y 5).



**Figura 4. Apariencia de las placas de lisis producidas por el bacteriófago de *Streptococcus bovis* (0.9 – 1.2 mm de diámetro).**



**Figura 5. Placas de lisis producidas por el bacteriófago de *Streptococcus bovis* (0.2 – 0.4 mm de diámetro).**

Aunque se logró aislar bacteriófagos contra *S. bovis* con los tres tratamientos evaluados, la concentración obtenida por mL de medio de cultivo fue escasa, incluso en T2 en el cual se logró una concentración de  $1.4 \times 10^4$  UFPL/mL de medio de cultivo. La baja concentración de bacteriófagos obtenida en el presente experimento puede ser explicada con las observaciones de Styriak *et al.* (2005), quienes mencionan que la sobrevivencia de los bacteriófagos de *Streptococcus bovis* suele ser menor a 18 horas cuando se usa líquido ruminal esterilizado en los medios de cultivo. Otra conclusión de los mismos autores es que el número de bacteriófagos que se adhieren a las bacterias decrece significativamente con las transferencias. Lo anterior pudo haber influido en este experimento por el uso de líquido ruminal esterilizado para la preparación de los medios para *Streptococcus bovis*. Otra de las

posibles causas de la baja concentración de bacteriófagos obtenida en este experimento es explicado por Klieve y Bauchop (1991), quienes reportan que en el ecosistema ruminal existen bacterias resistentes a los bacteriófagos. La metodología usada en el presente estudio no permite estimar si la especie de *S. bovis* aislada presenta resistencia a la infección de bacteriófagos por lo que debe ser considerado en futuros experimentos. Hashem y Angle (1988) reportan que la concentración de bacteriófagos pueden incrementarse de forma importante mediante un método de transferencias similar al usado en este estudio para preparar el T2. Sin embargo, en el laboratorio de microbiología ruminal fue la primera vez que se trabajo con métodos de aislamiento e inducción de bacteriófagos y es posible que la falta de experiencia limitó la concentración mayor de bacteriófagos por mL de medio de cultivo. También se ha observado una dependencia entre la tasa de crecimiento de la bacteria hospedera y el tiempo de aparición del halo lítico; por ejemplo, en cepas bacterianas de crecimiento lento los halos líticos aparecen después de 48 h de incubación, en tanto que en cepas bacterianas de crecimiento rápido aparecen a las 24 horas (Staniewski, 1987). En el presente estudio se realizaron observaciones a las 24 h. La baja concentración de UFPL obtenidas en T3, se pudo deber a que los bacteriófagos contra *S. bovis* son sensibles a la concentración de cloroformo utilizada. La mayoría de las placas producidas por el bacteriófago de *Streptococcus bovis* en los distintos tratamientos fueron claras y pequeñas con un diámetro de 0.2 – 0.4 mm; también se observaron algunas placas turbias de 0.9 – 1.2 mm de diámetro; lo que coincide con los datos reportados por Styriak *et al.* (2005). Tarakanov (1974) ha confirmado que en el rumen existe una fuente importante de

bacteriófagos en estado lisogénico en diferentes bacterias ruminales. En particular, se ha demostrado en cultivos de *Streptococcus bovis* aislados del rumen, que los bacteriófagos lisogénicos pueden inducirse al estado lítico después de la exposición a rayos ultravioleta. Sin embargo, Klieve *et al.* (1989) recomiendan el uso de mitomicina C, debido a que los bacteriófagos líticos no son muy comunes en el rumen. Lo anterior parece estar relacionado con la habilidad de los bacteriófagos para reconocer los sitios de adherencia presentes en la membrana de las bacterias (Attwood y Klieve, 1999). Otro de los factores que puede afectar negativamente presencia de UFPL, de acuerdo a Attwood y Klieve, (1999) es que existe una amplia fluctuación en la concentración de bacteriófagos ruminales en el transcurso de 24 h. Estos autores reportan que en rumiantes la detección de bacteriófagos inicia aproximadamente dos horas después de la alimentación y alcanza su máxima concentración entre 8 y 10 h después de la alimentación; para declinar lentamente entre las 14 y 16 h post alimentación. En este estudio, la toma de muestras del líquido ruminal usado para aislar bacteriófagos se realizó 3 h post alimentación. Por tanto, es posible que la presencia de bacteriófagos en la bacteria *S. bovis* aislada, fuera escasa desde un inicio, lo que resultó en una pobre detección de UFPL.

## CONCLUSIONES

La adición en una dieta con 70 % de grano, de bicarbonato de sodio (1.5 % de la dieta) solo o combinado con el ionóforo lasalocida (30 ppm), es apropiada para evitar la caída del pH y la acumulación de lactato. Sin embargo, la adición del ionóforo sin el amortiguador de pH, no tiene la misma eficacia.

La bacteria aislada de acuerdo a la caracterización morfológica y bioquímica, y mediante el sistema de identificación semiautomática API 20 Strep se identificó como *Streptococcus bovis*.

*Streptococcus bovis* presentó una curva de crecimiento clásica de tipo sigmoideal iniciando la fase exponencial a las tres horas, alcanzando su máximo crecimiento a las 9 h de incubación. A partir de las 9 h de incubación inició la fase de latencia lo que coincidió con la acidificación del medio de cultivo.

El proceso de liofilización permitió una adecuada conservación de la bacteria ruminal aislada lográndose una viabilidad del 80 %. Se recomienda dar un periodo de hidratación de 4 horas (hidratación de la masa bacteriana liofilizada) con el fin de aumentar la concentración de bacterias viables por gramo de cultivo liofilizado de *S. bovis*.

En el ensayo de la inducción de los bacteriófagos de *Streptococcus bovis*, el método de cuatro inducciones consecutivas fue el que presentó la mayor

concentración de unidades formadoras de placa de lisis, debido a que la Mitomicina C suele inducir al estado lítico de los bacteriófagos lisogénicos de forma espontánea. Sin embargo, se obtuvo una baja concentración de bacteriófagos, por lo que se sugiere en estudios posteriores evaluar una concentración mayor de mitomicina C en los medios de cultivo.

En general, en esta investigación se realizó la validación de las técnicas para la determinación de AGV, lactato, bacterias totales, celulolíticas y productoras de lactato y el uso de un medio de cultivo comercial (Merck) para *Streptococcus sp.* para el aislamiento de la bacteria ruminal *Streptococcus bovis*, y es uno de los pocos estudios en los que se han evaluado diferentes métodos para aislar bacteriófagos. También se comprobó que el método de liofilización es un método eficaz para conservar *Streptococcus bovis* sin que se pierda su viabilidad durante el proceso. La experiencia lograda en esta investigación es un avance en los métodos de aislamiento y conservación de bacterias ruminales y en métodos para expresar bacteriófagos específicos contra *Streptococcus bovis*.

## LITERATURA CITADA

- Asanuma, M. and T. Hino. 2002. Fructose bisphosphate aldolase activity and glycolytic intermediate concentrations in relation to lactate production in *Streptococcus bovis*. *Anaerobe* 8: 1-8.
- Asanuma, N., T. Yoshii and T. Hino. 2004. Molecular characterization of CcpA and involvement of this protein in transcriptional regulation of lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5244-5251.
- Atasoglu, C., C. Valdes, N. D. Walker, C. J. Newbold. 1998. De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 2836 – 2843.
- Attwood, G. T. and A. V. Klieve. 1999. Molecular techniques for monitoring bacterial and bacteriophage populations in the rumen. *Molecular Ecology in Gastrointestinal Systems. In: Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology.* Bell C. R. Brylinsky M., Johnson-Green P. (eds). Halifax, Canada.
- Ayala, O. J., S. C. Apodaca, S. R. Rangel, M. J. Armendáriz, V. A. Gomez y L. L. Carreño. 2003. Adición de *Sacharomyces cerevisiae* o lasalocida a dietas de pre y post parto en vacas Holstein. *In: XXVII Congreso Nacional de Buiatria.* Villahermosa, Tabasco, 12 al 14 de junio de 2003.
- Bach, A. 2002. Trastornos ruminales en el vacuno lechero: Un enfoque práctico. *In: XVIII Curso de Especialización FEDNA.* Barcelona, 4 y 5 de noviembre de 2002. pp.1119-139.
- Barrow, P. A. and J. S. Soothill. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends Microbiol* 5: 268-271
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, and W. Kautz and J. A. Z. Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1628–1640.
- Bergen, W. G. and D. B. Bates. 1984. Ionophores: their effect on production, efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58: 1465-1883.
- Bevans, D. W., K. A. Beauchemin, K. S. Schwartzkopf-Genswein, J. J. McKinnon, and T. A. McAllister. 2005. Effect of rapid adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 83:116-1132.

- Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powel, R. Carlton, C. R. Merrill. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70:587-598.
- Borrego, S., M. E. Espinosa, M. E. Carballo, T. Moreira, E. Martí, y A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Biotecnología aplicada*. 18: 85-87.
- Brake, C. and J. Hutchenson. 1996. Lactic acidosis and associated nutritional problems in feedlot cattle: 1 Causes and management. *Topics in Veterinary Medicine. Features* 1 (1) : 1-7.
- Britton, R. A. 1991. D-Lactic Acidosis, myth or fact. Animal Science Department, University of Nebraska-Lincoln. Ed. Elanco Products Company.
- Brown, M. S., C. R. Krehbiel, M. L. Galgean, M. D. Remenga, J. P. Peters, B. Hibbard, J. Robinson and W. M. Moseley. 2000. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. *J. Anim. Sci.* 78:3155-3168.
- Brussow, H., M. Fremont, A. Bruttin, J. Sidoti, A. Constable and V. Fryder. 1994. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4537-4543.
- Burrin, G. and R. A. Britton. 1986. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *J. Anim. Sci.* 63: 888-893.
- Caja, G., E. González, C. Flores, M. D. Carro y E. Albanell. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de Especialización FEDNA, Barcelona, España, Investigación en Rumiantes, Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Producción Animal, Universidad de León. 23 y 24 de Octubre. pp. 183 – 212.
- Calsamiglia, S. y A. Ferret. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. XVIII Curso de Especialización FEDNA, Barcelona, España, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 97-115
- Calsamiglia, S., L. Castillejos y M. Busquet. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. *In: XXI Curso de Especialización FEDNA*. Madrid, 7 y 8 de Noviembre. pp.161- 185

- Cann, I.K., Y. Kobayashi, A. Onada, M. Wakita and S. Hoshino. 1993. Effects of some ionophore antibiotics and polyoxins on the growth of anaerobic rumen fungi. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 127-133.
- Cobos, P. M. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimps carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In*: Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (ed.) *Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of a Workshop held at ILRI, Addis Ababa, Ethiopia.* pp.151-162.
- Cotta, M. A. 1988. Amilolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 772-778.
- Cotta, M. A. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 48-54.
- Cotta, M. A. and T. R. Whitehead. 1993. Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 189-196.
- Counotte, H. M., A. Lankhorst and R. A. Prins. 1983. Role of DL-lactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 56: 1223-1235.
- Chow, J.M., and J. B. Russell. 1992. Effect of pH and monensin on glucose transport by *Fibrobacter succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. *App. Microbiol.* 58:1115-1120.
- Chow, J.M., J. A. S. Van Kessel and J. B. Russell. 1994. Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. *J. Anim. Sci.* 72:1630-1635.
- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg y W. B. Wood. 1976. *Tratado de Microbiología.* Salvat Editores S. A. Barcelona España. 1478 pp.
- Delgado, H., T. Moreira, L. Luis, H. García, T. K. Martino and A. Moreno. 1995. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters* 16: 91-109.
- Dennis, S.M., T. G. Nagaraja and E. E. Bartley. 1981. Effects of lasalocid or monensin on lactate producing or using rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 52: 418-426.
- Diener, T. O. 1987. *The viroids.* Plenum Press. New York and London. 344 p.

- Elsasser, T. H. 1984. Potential interactions of ionophore drugs with divalent cations and their function in the animal body. *J. Anim. Sci.* 59: 845-853.
- El-Shazly, K., B.A. Dehority and R.R. Johnson. 1961. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 20:268-273.
- Erwin, E. S., G. J. Marco , and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1776.
- Esdale, W. J. and L. D. Satter. 1972. Manipulation of ruminal fermentation and effect of altering ruminal pH on volatile fatty acid production. *J. Dairy Sci.* 55:964- 972.
- Fox, P. F., Guinee T. P., Cogan T. M. and McSweeney P. H. L. 2000. Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers Gaithersburg M D. 280 pp.
- Fuller, J. R. and D. E. Johnson. 1981. Monensin and lasalocid effects on fermentation in vitro. *J. Anim. Sci.* 53:1575-1580.
- Gill, H. S., Q. Shu and R. A. Leng. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine* 18:2541-2548.
- Goad, D. W., D. L. Goad and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76: 234-241.
- Gozho, G. N., J. C. Plaizier, D. O. Krause, A. D. Kennedy, and K. M. Wittenberg. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399–1403.
- Harrigan, W. F. and E. M. McCance. 1979 Laboratory methods in microbiology of foods and milk products. Ed. Academia. Leon, Spain. Pp32-35, 361-366.
- Hashem, F., and J. Angle. 1988. Rhizobiophage effects on *Bradyrhizobium japonicum*, nodulation and soybean growth. *Soil biol. Biochem.* 20: 69-69.
- Henderson, P. J. F., J. D. McGivan, and J. B. Chappell. 1969. The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. *Biochem. J.* 11: 521-530.
- Hernández, S. D. 2000. Desarrollo de dos inóculos de bacterias cecales y efecto de su empleo en la respuesta productiva y fermentación cecal en conejos en crecimiento. Tesis de Doctorado. IREGEP, Especialidad de Ganadería.

Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo Texcoco, Edo de México.

- Hiao, H., X. Chen, M. Chen, S. Tang, X. Zhao and L. Huan. 2004. Bovicin HJ50, a novel antibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*. 150: 103-108.
- Huber, T. L. 1976. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 43: 903-909.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation strict anaerobes. In: Norris J. L. and Ribbons D. W. (ed.), *Methods in Microbiology*. Academic Press Inc., New York, USA. pp 117 - 132
- Iverson, W. G., and N. F. Millis. 1977. Succession of *Streptococcus bovis* strain with differing bacteriophage sensitivities in the rumens of two fistulated sheeps. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 810-813.
- Joklik, W. K., H. P. Willett, D. B. Amos and C. M. Wilfert. 1997. *Zinzer Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. 20<sup>a</sup> ed. Buenos Aires Argentina, 1696 p.
- Keunen, J. E., J. C. Plaizier, L. Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M. Widowski, M. I. Lindinger, and B. W. McBride. 2002. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:3304–3313.
- Keunen, J. E., J. C. Plaizier, I. Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M. Widowski. M. I. Lindinger and B. W. McBride. 2003. Effect of subacute ruminal acidosis on free-choice intake of sodium bicarbonate in lacting dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 954-957.
- Kilmer, L. H., D. L. Muller, and T. J. Snyder. 1981. Addition of sodium bicarbonate to rations of post partum dairy cows: Physiological and metabolic effects. *J. Dairy Sci.* 64:2357-2364.
- Klieve, A. V., and T. Bauchop. 1988. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1637-1641.
- Klieve, A. V., and T. Bauchop. 1991. Phage resistance and altered growth habit in a strain of *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiology Letters*. 80: 155- 60.
- Klieve, A. V., P. A. Bain, M. T. Yokoyama, D. Ouwerkerk, R. J. Foster and A. F. Turner. 2004. Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 333-338.

- Klieve, A. V., J. F. Hudman, and T. Bauchop. 1989. Inducible bacteriophages from ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1630-1634.
- Klieve, A. V., and R. A. Swain. 1993. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed field gel electrophoresis and laser densitometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2299-2303.
- Kohn, R.A. and T.F. Dunlap. 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 76:1702-1709.
- Kung, L., and A. O. Heisson. 1994. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 73: 250-256.
- Krause, K. M., D. K. Combs, and K. A. Beauchemin. 2002. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. *J. Dairy Sci.* 85:1947–1957.
- Krause, M. K., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 126: 215-236.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 1998. *Brock Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall, España 8<sup>a</sup> ed. 986 p.
- Mantovani, H. C. and J. B. Russell. 2001. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:808-813.
- Maramorosch, K. and E. Kurstak. 1971. *Comparative virology*. Academic Press, New York, USA. 584 p.
- Martín, S. A. and J. B. Russell. 1987. Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2388-2393
- McGuffey, R. K., L. F. Richardson, and J. I. D. Wilkinson. 2001. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. *J. Dairy Sci. (Suppl.)* 84: E194-E203.
- Mendoza, M. G. D. y R. V. Ricalde. 1993. Alimentación de ganado bovino con dietas altas en granos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. 97 pp.
- Mitchell. P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature.* 191: 144-148.

- Monteville, R. M., B. Ardestani and B. L. G  ller. 1994. Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for absorption and ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3204-3211.
- Morehead, M. C., and K. A. Dawson. 1992. Some growth and metabolic characteristics of monensin-resistant strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1617-1623.
- Moreira, T., E. Iglesias y H. Delgado. 1995. Preservation of *Neisseria meningitidis* group B by freeze-drying. *J. Microbiol. Met.* 23:343-346.
- Mould, F.L. and E.R. Orskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis *in sacco*, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- Mounfort, D. P. and R. A. Asher. 1988. Production of alpha amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2293.
- Muir, L. A., and A. Barreto Jr. 1979. Sensitivity of *Streptococcus bovis* to various antibiotics. *J. Anim. Sci.* 48:468-473.
- Nagaraja, T.G., T. B. Avery, E. E. Bartley, S. K. Roof, and A. D. Dayton .1982. Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 54: 649-654.
- Nagaraja, T. G., M. B. Taylor, D. M. Harmound, and J. E. Boyer. 1987. *In vitro* lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. *J. Anim. Sci.*65:1064-1076.
- Nagaraja, T. G. and M. M. Chengapa. 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76: 287-298.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, and N. D. Walker. 1993. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore-resistant bacteria in the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 129-134.
- Nomura, Y., M. Yamamoto, K. Matsushita, and Y. H. Kumagai. 1998. Preparation and preservation of freeze-dried cells of acetic acid bacteria with aldehyde oxidase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1134-1137.

- Osborne, J. K., T. Mutsvangwa, O. Alzahal, T. F. Duffield, R. Bagg, P. Dick, G. Vessie, and B. W. McBride. 2004. Effects of monensin on ruminal forage degradability and total tract diet digestibility in lactating dairy cows during grain-induced subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Sci.* 87:1840–1847
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76: 275-286.
- Paasch, M. L., J. Bouda, O. V. Velasquez, y O. A. Yabuta. 1997. Acidosis ruminal crónica y hallazgos patológicos en vacas lecheras de alta producción. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatria. México D. F. pp: 170-174.
- Phy, T.S., and F.D. Provenza. 1998. Eating barley too frequently or in excess decreases lambs preference for barley but sodium bicarbonate and lasalocid attenuate the response. *J. Anim. Sci.* 76:1578-1583.
- Pike, R. M. 1945. The isolation of hemolytic streptococci from throat swabs: experiments with sodium azide and crystal violet in enrichment broth. *Am. J. Hyg.* 41:211-220.
- Pressman, B.C. 1976. Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 501-529.
- Putnam, D.E., C. G. Schwab, M. T. Socha, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead and D. B. Grathwaite. 1997. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *J. Dairy Sci.* 80: 374 - 379.
- Reed, G., and H. J. Rehm. 1983. *Biotechnology a comprehensive treatise. Food and feed production with microorganisms.* Verlag chemie. Weinheim, Federal Republic of Germany. V 5. 631 p.
- Reilly, P. J. 1985. Enzymatic degradation of starch. In: G. M. A. VanBeyunm and J. A. Roels (Ed.) *Starch Conversion Technology.* Marcel Dekker, Inc. New York. 260 pp.
- Ronda, C., M. Vásquez, y R. López. 2003. Los bacteriofagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *AquaTIC* 18: 3-10.
- Russell, J. B., and R. L. Baldwin. 1978. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 319-329.
- Russell, J. B., and P. H. Robinson, 1984. Composition and characteristics of strains of *Streptococcus bovis*. *J. Dairy Sci.* 67: 1525-1531.

- Russell, J. B. 1985. Fermentation of cellulodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 572-576.
- Russell, J. B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. *J. Anim. Sci.* 64: 1519-1525.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1988. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram positive antibiotic. *J. Anim. Sci.* 66: 552-558.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophoros on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1-6.
- Russell, J.B., and J.M. Chow. 1993. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. *J. Dairy Sci.* 76:826-830.
- Kohn, R.A. and T.F. Dunlap. 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 76:1702-1709.
- SAS. 2001. SAS User's Guide Statics. SAS Inst. Inc. Cary North Carolina, USA.
- Schlegel, L., F. Grimont, E. Ageron, P.A.D. Grimont and A. Bouvet. 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis* *Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International J. of Sys. and Evol. Microbiol.* 53 : 631 – 645.
- Schelling, G.T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58: 1518-1527.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, and T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E149–E158.
- Schwingel, W. R., D. B. Bates, S. C. Denham, and D. K. Beede. 1989. Lasalocid-catalyzed proton conductance in *Streptococcus bovis* as affected by extracellular potassium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:259-260.
- SIGMA. 1994. KIT Lactato Deshidrogenasa No DG1340-K. Catalogo Sigma Diagnostics. pp. 2218.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43: 910-929.

- Smith, H. W., M. B. Huggins, and K. M. Shaw. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. J. Gen. Microbiol. 133: 1111-1126
- Sneath, P. H., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore USA. V 2. 1599 pp.
- Staniewski, R. 1987. Morphology and general characteristics of phages active against *Rizobium*. J. Basic. Microbiol. 27: 155- 165.
- Steel, R.G.D., y J.H. Torrie. 1988. Bioestadística: Principios. Mc Graw Hill. México. 622 p.
- Stone, W. C. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. J. Dairy Sci. 87:(E. Suppl.):E13–E26.
- Sturino, J. M., and T. R. Klaenhammer. 2004. Antisense RNA targeting of primase interferes with bacteriophage replication in *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1735–1743.
- Styriak, I., A. Spanova., and R. Zitnan. 2005. Partial characterization of two ruminal bacteriophages with similar restriction patterns and different capsids morphology. Arch. Tierz. 48: 572-579.
- Sulakvelidze, A., A. Z., and J. G. Morris Jr. 2001. Bacteriophage therapy. Antmicrob. Agents Chemother. 208:649 - 659
- Sumano, L. H. y C. L. Ocampo. 1988. Farmacología Veterinaria. McGraw-Hill. México, D. F. 633 p.
- Swain, R. A., J. V. Nolan and A. V. Klieve. 1996. Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. Appl. Environ. Microbiol. 62:994-997.
- Switzer, R. E. y J. B. Evans. 1974. Evaluation of selective media for enumeration of group D *Streptococci* in bovine feces. Applied Microbiology. 28: 1086-1087.
- Swinkels, J. J. M. 1985. Sources of starch, its chemistry and physics, In; G. M. A. Van Beyunm and J. A. Roels (Ed.) Starch Conversion Technology. Marcel Dekker, Inc. New York
- Tarakanov, B. V. 1974. Lysogenic cultures of *Streptococcus bovis* isolated from rumen of cattle and sheep. Mikrobiologija. 43: 375- 377.

- Taylor, K. A. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. and Biothechnol.* 56: 49- 58.
- Terzaghi, B., and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29: 807- 813.
- Teuber, M., and J. Lembke. 1983. The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic *Streptococci*. *Antonie van Leuwenhoek.* 49: 283-295.
- Tsukamura, M. 1984. Identification of mycobacteria. Japan Mycobacteriosis Research Laboratory of National Chubu Hospital. pp.21.
- Tung, R. S., and L. Kung. 1993. In vitro affects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 73: 1083- 1090.
- Vargas, M., y D. Zúñiga. 1998. Aislamiento de bacteriófagos de *Rizobium sp.* que afectan la simbiosis de pallar (*Phaseolus lunatus.*) *Revista de Ecología Peruana.* 1: 47- 50.
- Wallace, R. J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: Progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72: 2992-3003.
- Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steits, and A. M. Weiner. 1987. *Molecular biology of the gene.* 4<sup>th</sup> ed. Publishing Co. Inc. USA.
- Weng, Z. A., E. Diaz, y I. Alvarez. 2005. Conservación de microorganismos: ¿ qué debemos conocer ?. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 43: 1-4.
- Yokoyama, M. T., y K. A. Jonson. 1988. Microbiología del rumen e intestino delgado. In: *El rumiante, Fisiología Digestiva y Nutrición.* Church, D. C. (ed). Acribia, Zaragoza, España. pp. 137-157.