

La bacteria ruminal *megasphaera elsdenii* y su importancia en la prevención de la acumulación de ácido láctico

Julio César Camargo Restrepo

Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) Escuela de Ciencias
Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente
Bogotá, Colombia
2021

La bacteria ruminal *megasphaera elsdenii* y su importancia en laprevención de la acumulación de ácido láctico

Julio César Camargo Restrepo

Monografía presentada como requisito parcial para optar al título de:

Zootecnista

Directora

Ruth Amanda Acero Camelo
Ph.D. en Ciencias Salud o Producción Animal

Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) Escuela de Ciencias
Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente
Bogotá, Colombia
2021

Tabla de contenido

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
1. El Ecosistema Ruminal.....	9
2. Microorganismos Ruminales	10
2.1 Bacterias.....	10
2.2 Protozoarios.....	11
2.3 Hongos	12
2.4 Arqueas.....	13
2.5 Bacteriófagos.....	13
3. Estudio de la microbiota ruminal	14
4. Acidosis lactica en rumiantes.....	14
4.1 Acidosis Clínica	15
4.2 Acidosis Subclínica (SARA).....	16
4.3 Mecanismos para el control de la acidosis.....	16
5. <i>Megasphaera elsdenii</i>	18
6. Estudios sobre el uso de <i>M. Elsdenii</i> en el control del pH ruminal.....	22
6.1 Técnicas de aislamiento e identificación de la bacteria <i>M. Elsdenii</i>	26
7. Conclusiones	28
8. Bibliografía.....	29

Lista de tablas

Cuadro 1.

Características de los principales grupos de bacterias ruminales 10-11

Cuadro 2.

Características fermentativas de algunos cocos del rumen 18-19

Lista de figuras

Figura 1. Cocos gram negativos en pares *Megasphaera elsdenii*..... 18

Figura 2. Microscopio de fluorescencia (10000x)..... 19

Figura 3. Morfología de la colonia lenticular de *Megasphaera elsdenii*
en medio de crecimiento (16x) 19

Figura 4. Morfología de colonia multilenticular de *Megasphaera*
elsdenii en medio de crecimiento (16x).....20

Figura 5. Morfología celular del microorganismo en forma de cocos gram negativos, y
morfología compatible con la bacteria ruminal *M. elsdenii*. (100x)20

Figura 6. Dr Kari Lounatmaa, colección Science Photo Library.....21

Resumen

En los últimos años se han logrado muchos avances en torno al conocimiento de la microbiología ruminal y de la relación simbiótica entre los microorganismos que habitan el rumen y el huésped. La acidosis, que es causada por el descenso del pH ruminal y la acumulación de ácido láctico, es una enfermedad que afecta de manera importante la producción bovina y para el caso de Colombia particularmente la producción de leche. *Megasphaera elsdenii* es una bacteria utilizadora de ácido láctico, la cual tiene como productos de la fermentación principalmente butirato, propionato (formado por la ruta del acrilato), isobutirato, valerato, CO₂, H₂, y algunas trazas de caproato. Esta ruta metabólica ha hecho que sea de interés el estudio de esta bacteria con el fin de generar probióticos que permitan controlar la acidosis láctica en dietas ricas en almidones. En esta monografía se describen las condiciones ruminales, cómo la alteración del pH desencadena la acidosis, estudios y metodologías utilizadas en el conocimiento de *M. elsdenii*, su papel como reguladora de los niveles de ácido láctico y su posible uso preventivo para la acidosis.

Palabras clave: acidosis ruminal, DL-lactato, microbiología ruminal

Abstract

In recent years, many advances have been made regarding the knowledge of ruminal microbiology and the symbiotic relationship between the microorganisms that inhabit the rumen and the host. Ruminal acidosis is caused by the decrease in ruminal pH and the accumulation of lactic acid. This is a disease that significantly affects bovine production and, in the case of Colombia particularly milk production. *Megasphaera elsdenii* is a bacterium that metabolizes lactate and its fermentation products are mainly butyrate, propionate (formed by the acrylate route), isobutyrate, valerate, CO₂, H₂, and some traces of caproate. This metabolic pathway has made of interest the study of this bacterium to generate probiotics that allow controlling lactic acidosis in diets with high levels of starch. This monograph describes ruminal conditions, how the alteration of the pH triggers ruminal acidosis, and the studies and methodologies used in the knowledge of *M. elsdenii* and its role as a regulator of lactic acid levels and possible preventive use for acidosis.

Key words: ruminal acidosis, DL-lactate, rumen microbiology

Introducción

Según Fedegan (2018), la producción ganadera juega un papel de especial importancia en el país, no solo por su condición estratégica dentro de la política alimentaria, sino porque mantiene una participación cercana al 6% en el PIB total, 13.5% en el PIB agropecuario y 60% en el PIB del sub-sector pecuario, ocupando alrededor del 80% del área dedicada a actividades agropecuarias y generando un número muy significativo de empleos. La producción nacional de leche fresca presentó un aumento sostenido en la segunda mitad del siglo veinte, especialmente a partir del año 1978. Para 2019 de acuerdo con la Encuesta Nacional Agropecuaria se produjeron en Colombia 21.847.085 litros, siendo la región Andina la que más aportó a este volumen con 12.978.791 litros y una participación del 59,4%, seguida de las regiones Caribe, Pacífica, y Amazonía con 101.613, 2.145.284 y 1.848.625 litros respectivamente (DANE, 2020).

De acuerdo con Calsamiglia y Ferret (2002), la estrategia alimenticia de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal. Mientras el rumiante aporta alimentos y las condiciones adecuadas del medio (temperatura, acidez, anaerobiosis, ambiente reductor), los microorganismos utilizan los alimentos haciéndolos útiles y aportando productos de la fermentación con alto valor nutritivo para el rumiante: ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana. Cuando esta relación simbiótica se altera como consecuencia de cambios en la dieta o por la presencia de sustancias no deseadas, se produce un desequilibrio en la población microbiana ruminal que conduce a la aparición de alteraciones patológicas como la acidosis.

Las ganaderías de alta producción lechera emplean dietas que contienen una gran proporción de granos y suplementos balanceados, los cuales son ricos en carbohidratos fácilmente fermentados en el rumen, conduciendo así a la formación rápida de AGV por los microorganismos ruminales. Los AGV son una fuente importante de energía para el animal, sin embargo, si la producción es muy alta y acelerada, ocasiona un decrecimiento en el pH del rumen, transformando el ecosistema ruminal y permitiendo el crecimiento acelerado de bacterias productoras de ácido

láctico y sus metabolitos tóxicos (Amaral-Phillips & Twehues, 1996). Cuando se manejan dietas que incluyen una alta cantidad de carbohidratos fácilmente fermentables, el ácido láctico se produce a través de la fermentación anaeróbica del almidón en mayores cantidades, llegando incluso a acumularse reduciendo el pH del rumen causando un decrecimiento en la eficiencia con la cual el alimento es convertido a AGV y proteína microbiana, esencial en la respuesta productiva del animal (Strobel & Russell, 1986).

En condiciones normales el ácido láctico es un intermediario minoritario del metabolismo ruminal (Gill et al., 1986). La mayor parte del ácido láctico producido se metaboliza en el rumen (Counotte et al., 1981), siendo *Megasphaera elsdenii* la especie que más contribuye a este proceso, utilizando entre un 60 y 80% del lactato fermentado. De acuerdo con Gilchrist et al. (1984), se estima que las bacterias utilizadoras de ácido láctico representan el 20% de la población microbiana cuando las dietas son altas en alimentos concentrados, sin embargo, debido a su lento desarrollo, este ácido tiende a acumularse en el rumen. Cuando el ácido láctico se acumula y el pH se reduce por debajo de 5.5 las poblaciones mayoritarias utilizadoras de ácido láctico (*M. elsdenii*) desaparecen, siendo sustituidas por lactobacilos productores de ácido láctico, resistentes a estos niveles de pH. Esta situación reduce aún más el pH ruminal, ocasionando la condición conocida como acidosis láctica aguda (Calsamiglia y Ferret, 2002).

La acidosis láctica es un problema común y económicamente importante en los sistemas de producción lechera, el cual genera una disminución en la eficiencia productiva (Garret et al., 1997). Para la industria lechera de Norte América se estima que el costo económico asociado con la acidosis ruminal está entre 500 millones y 1 billón de dólares anualmente, y los costos por bovino afectado son de \$1.12 dólares por día (Mutsvangwa & Wright, 2003). Para el caso de los sistemas de producción de lechería especializada colombianos, la acidosis subclínica representa un problema importante, el cual afecta el consumo de alimento, la masa corporal, la producción de leche y genera problemas colaterales como laminitis, ruminitis y abscesos hepáticos (Granja Salcedo et al., 2012; Delgado C. & Roberts, 2001). Vallejo-Timarán et al. (2020) en un estudio realizado con 249 vacas de leche de 29 hatos seleccionados aleatoriamente en la región de Pasto - Nariño,

encontraron que el riesgo de incidencia de acidosis subaguda fue del 23,3% y la ocurrencia de acidosis subaguda fue asociada de manera significativa con la presentación de anestro post-parto, lo que permite confirmar la relación de esta enfermedad con el desempeño reproductivo.

Se han realizado varios estudios con la bacteria ruminal *M. elsdenii* con la intención de encontrar alternativas al manejo y control de la acidosis láctica. Barsuhn, et al. (1991), encontraron que la inoculación de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* en animales que presentaban acidosis láctica modificó la fermentación ruminal y logró prevenir la acumulación de lactato durante la transición de una dieta baja a una dieta alta en concentrado, en estudios *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, Barsuhn et al. (1992) encontraron adicionalmente incrementos en el consumo de alimento de un 24% en materia seca. Estos trabajos han llevado a patentar varias cepas de *M. elsdenii* con características promisorias (Meissner et al., 2010).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en esta monografía se propone hacer una revisión sobre la bacteria ruminal *M. elsdenii* y su uso potencial en la reducción de la acumulación de lactato en el rumen. Una cepa con estas características podría ser utilizada en sistemas de producción con dietas altas en concentrados y granos para reducir los altos riesgos económicos y de salud que representa la acidosis láctica y de esta forma incrementar la productividad de la industria lechera del país.

Ecosistema retículo ruminal

La simbiosis ruminal es una adaptación digestiva que permite a los rumiantes aprovechar recursos altamente fibrosos y que proporciona un ambiente ideal para el desarrollo de las poblaciones de hongos anaerobios, protozoos, archaeas y bacterias (Church & Ducar Maluenda, 1974). Al nacer, el tracto digestivo de los rumiantes, como en los otros mamíferos, está desprovisto de microorganismos. La colonización empieza durante y brevemente después del nacimiento y se da por vía oral. El establecimiento de las comunidades microbianas requiere de contacto con un animal adulto, usualmente la madre (Gilchrist et al., 1984).

Los rumiantes poseen cuatro cavidades en su estómago, de las cuales el rumen y retículo constituyen los principales sitios de fermentación (Contreras & Noro, 2010). La fermentación implica una serie de actividades físicas, químicas y microbiológicas, que convierten los componentes de la dieta en productos útiles para el animal como los ácidos grasos volátiles (AGV), la proteína microbiana, vitaminas y en productos de desecho como el CO₂ y el metano que son eliminados mediante el eructo (McAllister & Wang, 2002; Araujo Febres & Vergara-López, 2007).

Las condiciones que se deben mantener en el retículo rumen para que las poblaciones de microorganismos crezcan de manera adecuada son la anaerobiosis, un pH en un rango de 5.8 a 7.0 considerado ácido-neutro, una temperatura de 39°C, una presión osmótica de 260 a 340 mosm y un excelente aporte de sustratos que garantice el desarrollo, multiplicación y mantenimiento de dichas poblaciones microbianas (Choudhury et al., 2015; Van Lier & Regueiro, 2008).

De las condiciones anteriores, el pH es el más sensible ya que cambia fácilmente con la dieta. Es por ello que el retículo rumen cuenta con un sistema de amortiguación del pH mediado por la saliva que llega al rumen, principalmente durante la rumia, la remoción de los ácidos grasos volátiles, el consumo de carbono por parte de los microorganismos, las reacciones entre sales minerales y ácidos orgánicos vegetales y la presencia de proteína y nitrógeno no proteico (Carrillo, 2003). Sin embargo, estos mecanismos de regulación del pH empiezan a ser insuficientes cuando se

incluyen cantidades importantes de carbohidratos fácilmente fermentables en la dieta, generando una disminución marcada del pH que afecta las proporciones de las diferentes poblaciones microbiales, reduce la digestibilidad de la fibra y en casos extremos afecta la salud del animal (Nocek et al, 1984).

Durante muchos años se ha venido estudiando el rumen, tratando de comprender las complejas relaciones que existen entre los microorganismos con el fin de maximizar la producción, mejorar la salud y bienestar del animal y reducir las emisiones de metano (Choudhury et al., 2015).

Microorganismos ruminales

La comunidad microbiana que habita el tracto gastrointestinal se caracteriza por su alta densidad poblacional, amplia diversidad y gran complejidad de interacciones (McAllister & Wang, 2002). Dadas las condiciones de anaerobiosis del rumen, la mayor parte de estos microorganismos son anaerobios estrictos (Choudhury et al., 2015).

Los principales grupos de microorganismos que están presentes en el tracto gastrointestinal pertenecen a los tres dominios, Bacteria (bacterias), Archaea (metanógenas) y Eucariota (protozoos y hongos) (Choudhury et al., 2015).

Bacterias

La población de bacterias en el rumen se estima en $10^{10-11} \text{ g}^{-1}$, de las cuales se han identificado más de doscientas especies (Choudhury et al., 2015). Estudios de tipo metabólico las clasifican dependiendo del sustrato utilizado y los productos que generan. De acuerdo con esta clasificación se encuentran bacterias metanogénicas, lipolíticas, peptidolíticas, amilolíticas, proteolíticas, deaminativas, hemicelulolíticas y celulolíticas. (Hespell, et al., 1997). Las bacterias pueden estar libres en el medio líquido (aproximadamente 30%), adheridas a las partículas

alimenticias (generalmente un 70%) y adheridas al epitelio ruminal (Hespell et al., 1997). En la tabla 1 se presentan los principales grupos de bacterias ruminales, con sus características morfológicas, el sustrato sobre el cual actúan y los productos que se generan en el proceso de fermentación.

Tabla 1. Características de los principales grupos de bacterias ruminales

MICROORGANISMO	TINCIÓN DE GRAM	MORFOLOGÍA	PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN	REFERENCIA
Bacterias que degradan la celulosa				
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Negativo	Bacilos	Succinato, acetato, formato	(Ivan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Negativo	Bacilos curvos	Acetato, Formato, Lactato, Butirato H ₂ , CO ₂	(Weimer, 1996)
<i>Ruminococcus albus</i>	Positivo	Cocos	Acetato, Formato, H ₂ , CO ₂	(Michalet-Doreau <i>et al.</i> , 2002)
<i>Clostridium lochheadii</i>	Positivo	Bacilos (esporas)	Butirato, Acetato, Formato, H ₂ , CO ₂	(Weimer 1996)
Bacterias Amilolíticas				
<i>Bacteroides rumicola</i>	Negativo	Bacilos	Succinato, Acetato, Formato	(Cotta, 1988)
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Negativo	Bacilos	Succinato, Acetato, Formato	
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Negativo	Bacilos curvos	Acetato, Propionato, Lactato	(Cotta, 1992)
<i>Succinomonas amilolítica</i>	Negativo	Oval	Acetato, Propionato, Succinato	
<i>Streptococcus bovis</i>	Positivo	Cocos	Lactato	(Cotta 1988, McAllister <i>et al.</i> , 1990)
Bacteria Lipolítica				
<i>Anaerovibrio lipolítica</i>	Negativo	Bacilos	Acetato, Propionato, Acetato	(Fuentes <i>et al.</i> , 2009)
Bacterias degradantes de Lactato				
<i>Selenomonas Lactilítica</i>	Negativo	Bacilos curvos	Acetato, Succinato	(Brown <i>et al.</i> , 2006)

<i>Megasphaera elsdenii</i>	Negativo	Cocos	Acetato, Propionato, Butirato, Valerato, H ₂ , CO ₂	
Bacterias degradadoras de Pectina				
<i>Lachnospira multiparus</i>	Positivo	Bacilos curvos	Acetato, Formato, Lactato, H ₂ , CO ₂	(Duskova and Marounek, 2001)
Arqueas ruminales (metanogénicas)				
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	Positivo	Bacilos	CH ₄ (de H ₂ , CO ₂ o Formato)	(Yanagita <i>et al.</i> , 2000; Hook <i>et al.</i> , 2010)
<i>Methanococcus mobile</i>	Negativo	Bacilos	CH ₄ (de H ₂ , CO ₂ o Formato)	

Fuente: Burrola-Barraza et al., 2014

Protozoos

Los estudios sobre los protozoos empezaron después de 1920, centrándose en su identificación, morfología y funciones de acuerdo a su utilidad para el huésped, en procesos de su metabolismo y en la digestión de la fibra. Los protozoos desempeñan un papel clave en la concentración de los productos de la fermentación como metano, amoníaco, lactato, propionato, butirato, entre otros (Ambalam & Patel, 2018).

Los protozoos ciliados son el segundo grupo más abundante en el rumen de losbovinos, constituyen entre el 40 y 80% de la biomasa ruminal, encontrándose dos grupos principales, los que pertenecen al orden Entodiniomorphida y los que pertenecen al orden Holotricha (Ambalam & Patel, 2018; Burrola-Barraza et al., 2014). Son organismos unicelulares que miden entre 20–200µm (Choudhury et al., 2015). Aproximadamente el 90% de los protozoos pertenecen al grupo Entodiniomorphida, los cuales están involucrados en la hidrólisis y fermentación de la celulosa (Burrola-Barraza et al., 2014), contribuyendo entre el 19 al 28% de la actividad celulasa (Ambalam & Patel, 2018). Adicionalmente, especies como *Diploplastron affine* tienen habilidad de degradación del almidón gracias a la capacidad para producir enzimas amilolíticas como α -amilasa y maltasa (Burrola-Barraza et al., 2014). Aunque los protozoos tienen una actividad proteolítica

importante, es 6 a 10 veces menor que la de las bacterias (Burrola-Barraza et al., 2014).

Los protozoos tienen principalmente asociación con archaeas, las cuales se adhieren a ellos y viven en su superficie para acceder a los H₂ producidos por estos como resultado de la fermentación (Choudhury et al., 2015). Estos H₂ son utilizados para la síntesis de metano (Ambalam & Patel, 2018; Choudhury et al., 2015).

A estos microorganismos se les atribuyen diversas funciones, como regular la población bacteriana, el pH, volumen y tasa de dilución ruminal, sin embargo, pueden causar efectos negativos por alta ingestión de bacterias ruminales y por ser retenidos dentro del rumen, lo que disminuye la disponibilidad de nutrientes para el animal (Williams & Coleman, 1992).

Hongos

La población de hongos ruminales está directamente relacionada con el contenido de la fibra de la dieta. Estos tienen la capacidad de hidrolizar celulosas y xilanos (Bauchop, 1979). Los hongos representan alrededor del 8 % de la biomasa ruminal (Jenkins et al., 2008), población que se ha estimado en 10³ a 10⁵ zoosporas por ml de fluido ruminal (Fliegerova et al., 2015).

Recientes trabajos de genética molecular han ubicado los hongos ruminales dentro de la familia *Neocallimastigaceae* y dentro de siete géneros principales: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomycetes*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces* y el más reciente, *Buwchfawromyces* (Fliegerova et al., 2015).

Los hongos poseen una importante actividad celulolítica, en especial cuando el rumiante consume forrajes demasiado maduros o encañados (Jenkins et al., 2008). Los hongos liberan un complejo celulósico más soluble que el de las bacterias y atacan partículas rugosas a las que fermentan más rápidamente que las bacterias (Jenkins et al., 2008). La acción fúngica sobre la pared celular y su contribución a la degradación ruminal parece estar muy relacionada con la actividad colonizadora en estomas y zonas de corte de los tejidos lignificados. Por otra parte, la acción mecánica de los hongos sobre la pared celular, disminuye la rigidez estructural de los forrajes, aumentando así la superficie accesible para la acción bacteriana. Dentro de los principales

productos de la fermentación realizada por los hongos se encuentran AGV, gases y trazas de etanol y lactato (Obispo, 1992).

Adicionalmente al rumen, estos microorganismos están presentes en el duodeno, el ciego y en las heces. Muchos hongos son eliminados cuando los rumiantes se alimentan con altas cantidades de carbohidratos fácilmente fermentables, sin embargo, los hongos proliferan rápidamente una vez que la concentración de alimento fibroso se incrementa (Grenet et al., 1989).

Arqueas

Anteriormente los microorganismos denominados como arqueas eran incluidos dentro de las especies bacterianas. Sin embargo, el desarrollo en técnicas moleculares de análisis del ADN ha demostrado que pertenecen a un dominio diferente. La población existente de las arqueas en el rumen no ha sido determinada con precisión, pero si se han identificado como uno de los principales organismos participantes en la formación de metano. El principal filode arqueas en el rumen según su secuenciación de ADN es *Euryarchaeota*, que constituye el 99 % de la población de arqueas ruminales. Se han detectado hasta el momento diez géneros de arqueas en el rumen, y el género más abundante es *Methanobrevibacter*, que representa aproximadamente el 91 % (Castillo-López & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Las arqueas metanogénicas utilizan los H y el CO₂ producidos por los protozoos, hongos y bacterias a partir de la degradación de los carbohidratos para producir metano y generar ATP, siendo un aspecto benéfico ya que representan un sumidero de electrones, reduciendo de esta manera la presión parcial de H₂ en el rumen. Poseen tres coenzimas, la coenzima F-420 que participa en la transferencia de electrones, la coenzima M que participa en la transferencia de los grupos metilo y la coenzima B que participa en la reacción final para la producción de metano (Choudhury et al., 2015). Adicional al CO₂, las metanógenas pueden producir metano degradando sustratos que tienen grupos metil o acetyl como el metanol o el acetato, los cuales actúan como aceptores de electrones (Burrola-Barraza et al., 2014).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos (virus) son parásitos obligados de las bacterias, que utilizan los recursos de las células para replicarse; de esta forma actúan como agente antimicrobial. Su principal componente molecular es ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas (Joklik et al. 1997). El efecto de los bacteriófagos sobre los microorganismos ruminales ha sido poco documentado, pero se ha demostrado su presencia (Lockington et al., 1988; Swain et al., 1996). Se han reportado cantidades de 3.0×10^9 a 1.6×10^{10} de partículas virales por mililitro de líquido ruminal.

Los bacteriófagos pueden influir en el metabolismo ruminal mediante la lisis de un gran número de bacterias (e.j. celulolítica, fibrolíticas, amilolíticas), que participan en la degradación y conversión del alimento en ácidos grasos de cadena corta y otros ácidos orgánicos que pueden reducir el pH ruminal (Monk et al., 2010).

Experimentalmente se han evaluado bacteriófagos para *Escherichia coli* por representar un problema de salud pública importante ya que se puede transmitir al consumir carne de animales rumiante en donde esta bacteria se ha hospedado a nivel de intestino y rumen (Portela Díaz, 2018).

Estudio de la microbiota ruminal

El conocimiento y manipulación de la microbiota ruminal permite optimizar parámetros de fermentación y contribuyen a formular estrategias para mejorar la producción animal y el desarrollo de productos aplicables en nutrición (Ossa, 1999). Los métodos bacteriológicos tradicionales (medios selectivos, morfología y bioquímicas) han sido por mucho tiempo la única herramienta disponible de identificación de estos microorganismos, sin embargo, éstos poseen desventajas debido a que requieren gran inversión de tiempo y mano de obra, presentando adicionalmente limitaciones en la diferenciación de las especies bacterianas y en la recuperación de microorganismos que tienen requerimientos nutricionales particulares (Ossa, 1999). Las técnicas de biología molecular son una posibilidad para superar los inconvenientes mencionados anteriormente, ya que permiten una identificación precisa basada en la información que contienen

las secuencias de los genes ribosomales (Rodríguez, 1996).

Las tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento combinado con el análisis bioinformático ha facilitado el conocimiento y el estudio del microbioma ruminal, permitiendo por ejemplo el monitoreo en el cambio de poblaciones cuando los animales se someten a cambios en la dieta, modificaciones de pH, dinámica de bacterias que llevan a cabo el proceso de biohidrogenación y estudios de modificación en población de arqueas que intervienen en la formación de metano (Castillo-López & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Acidosis láctica en rumiantes

La acidosis ruminal es causada por la ingestión de grandes cantidades de carbohidratos fermentables en el rumen. Los síntomas clínicos dependen de los tipos y las cantidades de los carbohidratos consumidos. Como resultado, se produce una gran cantidad de ácidos que reducen el pH, afectando el sistema ruminal y el hospedero. El efecto cascada de la acidosis originada de la ingestión inicial de carbohidratos depende de la intensidad y de la duración. Según Nocek (1997), la situación más crítica en un proceso de acidosis es el umbral de pH, debido a que éste está relacionado con varios aspectos como la tasa de crecimiento microbial y el cambio en la población ruminal, lo cual incide de forma significativa en el estado sistémico metabólico y la habilidad de catabolizar o de excretar ciertos metabolitos.

Se considera que el rango normal de pH en el rumen oscila entre 5,8 y 7 (Choudhury et al., 2015). El pH es el factor ruminal más susceptible a variación, siendo la ración el aspecto determinante en estos cambios. El mantenimiento del pH ruminal es el resultado de la producción, la neutralización y la eliminación de protones en el medio ruminal. El suministro de carbohidratos no estructurales según su cantidad puede ser altamente acidogénico y su aporte debe limitarse y/o contrarrestarse con carbohidratos fibrosos que estimulen la rumia y la producción de saliva para aumentar la capacidad tampón en el medio ruminal (Calsamiglia y Ferret, 2002). La formulación de raciones en los rumiantes debe buscar un equilibrio entre los niveles de carbohidratos

estructurales y no estructurales con el objetivo de optimizar la ingestión de energía sin provocar alteraciones patológicas en el rumen (Calsamiglia y Ferret, 2002).

La acidosis produce cambios en el ambiente ruminal que alteran la composición de la población microbiana ruminal. Poblaciones susceptibles a pH bajo como las bacterias celulolíticas y los protozoarios descienden de manera importante y otras bacterias ácido tolerantes como *Streptococcus bovis* deja de producir acetato, etanol y formiato para producir lactato (Granja Salcedo et al., 2012). En general las bacterias productoras de ácido láctico son más tolerantes a las condiciones ácidas producidas durante una rápida fermentación, estos organismos que son gram positivos reemplazan los gram negativos que predominan en las condiciones normales del rumen. Al mismo tiempo, organismos como *M. elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* spp. *Lactilytica*, proliferan en respuesta a la acumulación de ácido láctico, removiéndolo y metabolizándolo a ácidos grasos volátiles. Sin embargo, a medida que el ácido láctico se sigue acumulando, se inhibe la proliferación de estos grupos de bacterias utilizadoras de ácido láctico debido a la marcada disminución en el pH ruminal (Aikman et al., 2011). La proporción del cambio de la población puede ser influenciada por diferentes factores, pero estos se asocian con una sobre oferta de carbohidratos de fácil degradación, los cambios pueden observarse muy rápido, un sobre crecimiento de bacterias ácido lácticas pueden ocurrir en 24 horas (Allison et al., 1997).

Acidosis clínica o aguda

La acidosis aguda, también conocida como acidosis láctica, se caracteriza por una reducción dramática en el pH ruminal (≤ 5.0), un incremento marcado en la concentración de ácido láctico y un decrecimiento en el número de protozoos (Nagel & Broderick, 1992). Hurber (1971) argumenta que adicionalmente el flujo de sangre decrece en el tracto gastrointestinal reduciendo la absorción de ácidos orgánicos del rumen. Una exposición prolongada del epitelio ruminal a altas concentraciones de ácido, pueden resultar en una hiperqueratosis y paraqueratosis, que reducen la capacidad de absorber ácidos orgánicos, acelerando la reducción del pH (Nocek, 1997).

Los síntomas que presentan los animales que sufren acidosis aguda o láctica son anorexia,

depresión, ataxia, deshidratación y por debilidad pueden caer de cúbito. En casos graves la acidosis metabólica genera aceleración del ritmo cardíaco y de la frecuencia respiratoria (Granja Salcedo et al., 2012).

Acidosis subclínica

Este tipo de acidosis es consecuencia de periodos transitorios repetidos de pH ruminal moderadamente bajos que no son suficientes para desencadenar la sintomatología clínica (Calsamiglia y Ferret, 2002). En la acidosis subclínica el pH ruminal desciende a valores que van de 5,2 a 5,6 (Granja Salcedo et al., 2012).

El mantenimiento de un pH relativamente bajo permite el desarrollo de poblaciones de clostridios y coliformes que provocan una inflamación de la mucosa y el desarrollo de hiperparaqueratosis, afectando la función protectora del epitelio ruminal y la absorción de AGV. Aunque no se llegan a desarrollar síntomas clínicos, el mantenimiento de este pH reduce la digestibilidad de la ración y provoca oscilaciones en la ingestión de materia seca. Algunos cambios patológicos en animales se han asociado con alteraciones en la población microbial del rumen y marcados incrementos en las concentraciones de endotoxinas por la desintegración de células bacteriales gram negativas en el rumen (Avery et al., 1982). La pérdida de la integridad del epitelio ruminal permite el paso a sangre portal de las endotoxinas producidas y de microorganismos, generando problemas colaterales como la laminitis y los abscesos hepáticos (Granja Salcedo et al., 2012).

Independientemente del tipo de acidosis, el desarrollo de estrategias para su prevención debe considerar los factores de la ración implicados en la generación de ácido y su neutralización o eliminación del medio ruminal (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Mecanismos para el control de la acidosis

La mayoría de las estrategias establecidas para controlar el desarrollo de acidosis generan conflicto con el diseño de dietas altas en energía fácilmente fermentable sugerida para animales de alta producción. Calsamiglia y Ferret (2002) proponen los siguientes aspectos a considerar:

- Controlar la velocidad de generación de los ácidos de la fermentación:
 - Considerar el nivel y la velocidad de degradación
 - Favorecer el consumo de alimentos distribuidos a lo largo del día
- Favorecer la rumia. El contenido de FDN proveniente del forraje y el tamaño de partícula ofrecido a los animales parecen ser los criterios más relacionados con el estímulo de la rumia.
- Equilibrar las raciones para optimizar la síntesis de proteína microbiana
- Seleccionar los ingredientes con una capacidad tamponante elevada
- Adaptar la microflora ruminal a la producción de ácido (en el parto) para desarrollar la población utilizadora de ácido láctico y estimular la absorción.

Algunos trabajos recientes están utilizando estrategias distintas que pueden aportar soluciones nuevas en un futuro cercano (Nocek, 1997). Han conseguido un proceso de inmunización de rumiantes frente a *S. bovis* que previene la aparición de acidosis láctica (Allison, 2000). Estas estrategias parecen haber tenido éxito y se produce una reducción de dicha población bacteriana y un incremento del pH (Kung & Hession, 1995).

Otra posible aproximación es la adición de bacterias utilizadoras de ácido láctico. Estas bacterias ocupan un nicho especial en el ecosistema ruminal, metabolizan ácido láctico controlando así la acumulación de este producto final de la fermentación ruminal que es absorbido lentamente particularmente cuando los rumiantes son alimentados con dietas que contienen grandes proporciones de granos o alimentos balanceados (MacKenzie, 1967). La acumulación de ácido

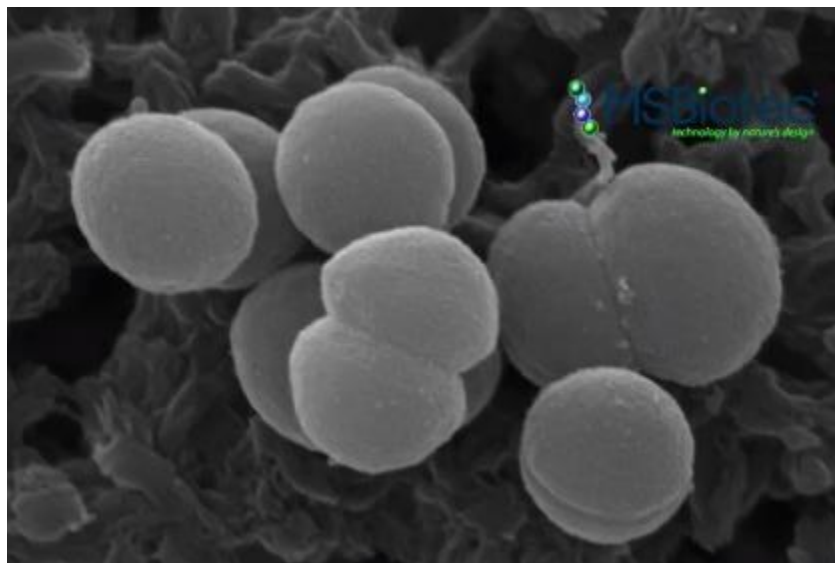
láctico contribuye en gran parte a la creación de condiciones ácidas en el rumen de las cuales inhiben la mayoría de los microorganismos excepto unas pocas especies de bacterias ácido-tolerantes y si son muy severas pueden destruir el ecosistema (Slyter, 1976). Se ha encontrado que bacterias como *Megasphaera elsdenii* en el medio ruminal, lo cual consigue reducir la acumulación de ácido y aumentar en 0.7 unidades el pH al añadir dicha bacteria en un sistema de fermentación *in vitro* (Calsamiglia y Ferret, 2002).

La incidencia de acidosis puede ser reducida por prácticas de manejo las cuales dan tiempo para que el rumen se adapte a un incremento en la concentración de grano, esto permite un crecimiento balanceado de poblaciones microbiales utilizadoras de lactato y productoras de lactato en el rumen. Otra estrategia para limitar la disfunción ruminal asociada con dietas altas en grano, se ha enfocado en el uso de antimicrobiales como los ionóforos para limitar el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico, y el uso de cultivos vivos de bacterias utilizadoras de ácido láctico como *M. elsdenii* o propionibacteria en suplementos alimenticios para prevenir la acumulación de lactato en el rumen.

Megasphaera elsdenii

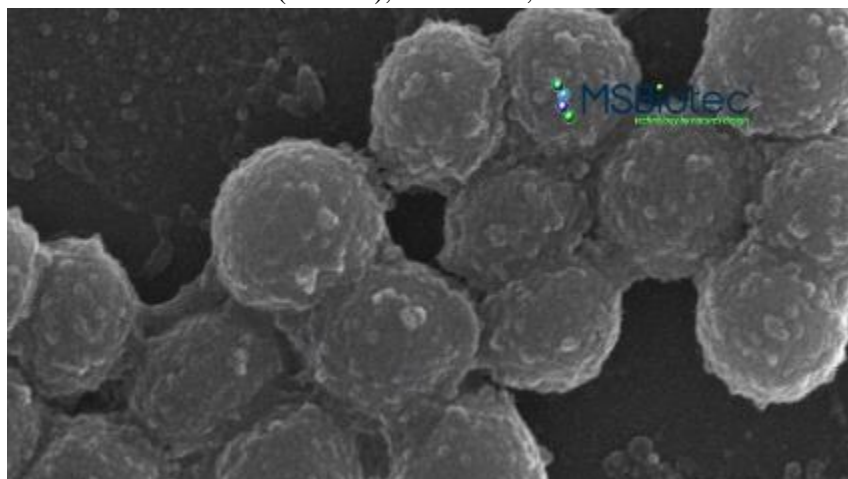
La bacteria ruminal *M. elsdenii*, conocida inicialmente como *Peptostreptococcus elsdenii*, es un coco no motil, gram negativo de la familia acidaminococcaceae de un diámetro aproximado de 2.4 x 2.6µm. Aparece en pares o en cadenas de más de 20 células. Se establece en el rumen de animales jóvenes y en animales alimentados con altos niveles de carbohidratos fácilmente fermentables en la dieta (Hobson & Stewart, 1997). Crece en diferentes sustratos, como glucosa, lactato y fructosa, entre otros, generando diferentes productos dependiendo del sustrato usado. El lactato es fermentado por esta bacteria principalmente a butirato, propionato (formado por la ruta del acrilato), isobutirato y valerato, CO₂ y algo de H₂, con algunas trazas de caproato. Por su parte, la glucosa es fermentada generalmente a caproato y formato con algo de acetato, propionato, butirato y valerato (Marounek et al., 1989). Según Wallace (1986), *M. elsdenii* juega un papel importante en la producción de las cadenas cortas de AGV's en el rumen. Además, utiliza varios carbohidratos y ácidos orgánicos y es considerada uno de los principales organismos involucrados en el catabolismo del ácido láctico y desaminación de aminoácidos (Hungate, 1966).

Figura 1. Cocos gram negativos en pares *Megasphaera elsdenii*, MS Biotec, LLC



Fuente: (Nagaraja, 1982)

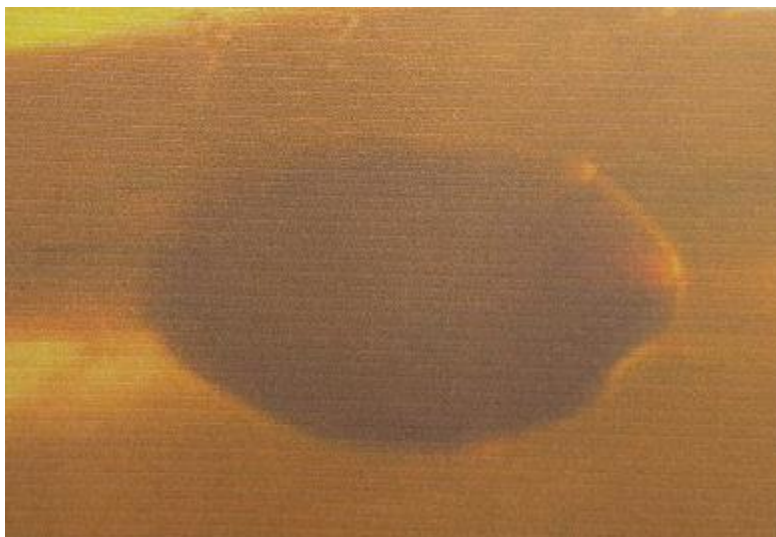
Figura 2. Cocos de *Megasphaera elsdenii* a través de microscopía defluorescencia (10000x), MS Biotec, LLC



Fuente: (Nagaraja, 1982)

Al realizar cultivos de *M. elsdenii* en medio sólido, se observa una morfología de la colonia lenticular con bordes irregulares, bien definidos de consistencia cremosa y de color blanco (figura 3) ó multilenticular con tres lentes iguales, concéntricos con un halo blanco alrededor de la colonia (figura 4).

Figura 3. Morfología de la Colonia Lenticular de *Megasphaera elsdenii* en medio de Crecimiento (16x).



Fuente: Ospina, 2005.

Figura 4. Morfología de colonia multilenticular de *Megasphaera elsdenii* en mediodo crecimiento (16x).



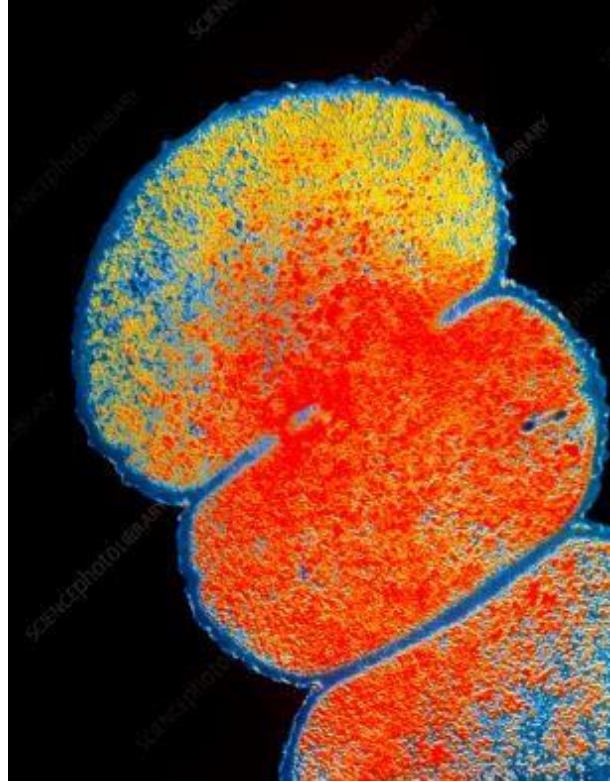
Fuente: Ospina, 2005.

Figura 5. Morfología celular del microorganismo en forma de cocos gram negativos, y morfología compatible con la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*. (100x) Aumento x31,200 en tamaño de 6x4.5cm.



Fuente: Ospina, 2005.

Figura 6. Dr Kari Lounatmaa



Fuente: colección Science Photo Library *Megasphaera elsdenii*

En las evaluaciones realizadas sobre la capacidad de fermentación en diferentes sustratos, se evidenció que *M. elsdenii* utiliza glucosa, fructosa, maltosa y manitol (Tabla 2). En estos sustratos su crecimiento alcanza una densidad óptica (620 nm) de 1, producción de gas y pH bajos (4.6), indicando que los sustratos fueron fermentados correspondiendo al patrón de crecimiento característico reportado por Marounek *et al.* (1989).

Cuadro 2. Características fermentativas de la bacteria *Megasphaera elsdenii*

CARBOHIDRATO	Utilización
Arabinosa	-
Celobiosa	-
Fructosa	+
Galactosa	-
Glucosa	+
Almidón	-
Lactosa	-
Maltosa	+
Manitol	+
Manosa	-
Pectina	-
Xilano	-
Xiolosa	-
Celulosa	-
Lactato	+

El rol de *M. elsdenii* en la fermentación de DL-lactato en el rumen de las vacas lecheras fue investigado por Counotte et al., (1981) encontrando que la proporción de DL-lactato fermentado por esta bacteria a butirato es variable y depende del rango de pH ruminal. Recomiendan que para tener una mejor cuantificación de la participación de esta bacteria en la metabolización del DL- lactato se debe tener en cuenta la ruta del butirato más la de la fermentación a propionato por la vía del acrilato, dado que entre el 27 y 96% del DL-lactato es metabolizado por la vía del acrilato, con una participación de *M. elsdenii* superior al 74%. Los autores concluyeron que del total de DL-lactato fermentado en el rumen, *M. elsdenii* tiene una participación del 60 al 80%, confirmando su importante papel regulador en los niveles de este ácido en el rumen.

Estudios sobre el uso de *M. Elsdenii* en el control del pH ruminal

En condiciones normales, el ácido láctico es un intermediario minoritario del metabolismo ruminal. Sin embargo, la mayor parte del ácido láctico producido semetaboliza en el rumen (Gill et al., 1986), siendo *M. elsdenii* la especie que más contribuye a este proceso, utilizando un 60 a 80% del lactato fermentado en el rumen (Counotte et al., 1981). Se estima en un 20% la participación de los utilizadores de lactato en el rumen cuando los animales son alimentados con dietas altas en concentrados, no obstante, el lento desarrollo de las bacterias utilizadoras de ácido láctico favorece su acumulación de este ácido en el rumen (Mackie et al., 2002).

El ecosistema ruminal puede ser modificado para mejorar la eficiencia productiva del ganado bovino. Las estrategias de modificación que se usan comercialmente y que hacen parte de las investigaciones actuales, incluyen la administración de compuestos microbianos, probióticos e inóculos de microorganismos ruminales naturales (Mackie et al., 2002). La introducción de organismos naturales en el rumen se realiza con objetivos como la eliminación de compuestos tóxicos de origen vegetal, la prevención de la acidosis ruminal y el mejoramiento de la degradación de la fibra, factores que generarán mejores condiciones al desarrollo y salud del animal (Orpin y Joblin, 1997).

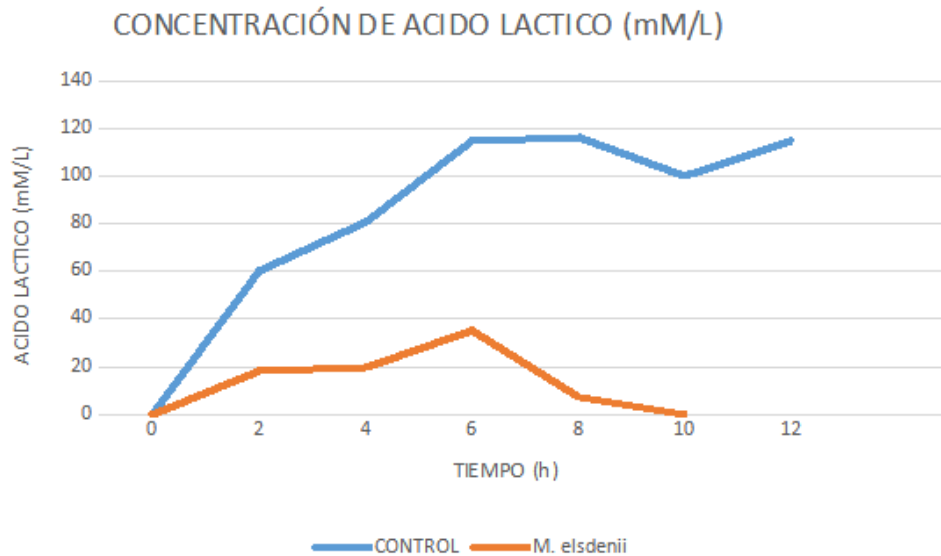
En este sentido, se han venido realizando trabajos buscando aprovechar el importante papel de *M. elsdenii* en el metabolismo del DL-lactato para el diseño de probióticos que contribuyen a la reducción del riesgo de acidosis cuando se utilizan dietas altas en almidones, encontrando a la fecha varias cepas patentadas con características promisorias (Meissner et al., 2010). Klieve et al., (2003) lograron el establecimiento de poblaciones viables de *M. elsdenii* 5 a 7 días antes que en los controles no inoculados en novillos cuando introdujeron una dieta rica en granos, pero no encontraron incrementos en los niveles de pH ruminal. Trabajos posteriores realizados con las cepas *M. elsdenii* NCIMB 41125, también conocida como CH3 han mostrado mejores resultados. Henning et al., (2010a), realizaron estudios con corderos y novillos que recibieron una dosis única de *M. elsdenii* NCIMB 41125, encontrando una reducción en la acumulación de ácido láctico y un incremento en el pH ruminal,

adicional a un mayor consumo de materia seca en los corderos y un mayor consumo de materia seca y ganancia media diaria de peso corporal en los novillos. Aikman et al. (2011), evaluaron la administración de *M. elsdenii* NCIMB 41125 logrando incrementar el pH ruminal hasta los primeros 20 días después de iniciada la dieta. El pH ruminal fue inferior a 6,0 y 5,6 por 92 y 76 minutos más, respectivamente, en las vacas que recibieron un placebo en comparación con las que recibieron *M. elsdenii* NCIMB 41125, mostrando que el probiótico logró un efecto estabilizador en la fermentación ruminal. En este estudio se encontró una reducción en la concentración de grasa en la leche en el grupo que recibió el probiótico, acompañada de una menor pérdida de peso o mayor ganancia, lo cual fue atribuido por los autores en su conjunto a una menor movilización de reservas corporales. Henning et al., (2010b) realizaron un estudio para evaluar diferentes cepas de *M. elsdenii* (170692A9, 220792A4, 110892A8, 110892A13, 110992C13, ATCC25940, CH3, CH6, CH7, CH4) de acuerdo a su capacidad para prevenir acidosis minimizando su efecto. Este trabajo tuvo una fase en laboratorio para seleccionar las cepas con mejor respuesta de acuerdo a los valores de pH y las concentraciones de ácido láctico y una segunda fase que correspondió a un estudio de respuesta animal en ovejas evaluando las cepas seleccionadas en la fase 1. En cuanto a los valores de pH en la fase uno, en este trabajo encontraron diferencias leves entre cepas, pero sí hubo diferencias respecto al control en donde el pH declinó de manera consistente. Teniendo en cuenta que para la acidosis es más importante el tiempo que dura el pH ruminal por debajo de los niveles considerados críticos (6,0 y 5,0), los autores realizaron este análisis, evaluando los tiempos de exposición. Encontraron que el tratamiento I (Cepa CH7) mostró el valor más bajo (5,73 horas) de exposición a pH <6,0, seguido del tratamiento G (CH3) (6,29 horas). El tratamiento control tuvo el valor más alto (13,11 horas), es decir que hubo mayor tiempo de exposición a condiciones de acidez en el rumen. La tendencia en el tiempo de exposición a pH <5.0 fue similar, con el valor más bajo para el tratamiento I (CH7) siendo 1.64 horas, seguido del tratamiento G (CH3) 2.19 horas y el valor más alto para el control 8.59 horas. Las cepas CH7 y CH3 parecieron ser superiores en este sentido, sin embargo, la cepa CH3 no tuvo buena respuesta en la utilización de ácido láctico, por esta razón en la fase 2 se evaluaron las cepas CH4 y CH7. Estas cepas

en condiciones in vivo redujeron la concentración de ácido láctico en las 8 horas posteriores a la administración a <10 mmol / l, concentración que se considera normal (no ácido). Adicionalmente, la ingesta de forraje tras la administración brusca de 1 kg de harina de maíz y 300 g de maltosa se redujeron entre un 16% y un 18% en el control, en comparación con sólo un 3% a 9% en los tratamientos con CH4-CH7. Estos resultados mostraron el potencial de estas cepas para controlar la acidosis ruminal.

En Colombia, Ospina (2005) aisló la cepa bacteriana B5001 de fluido ruminal de vacas Holstein alimentadas con una dieta constituida por *Cenchrus clandestinus*, ensilaje de maíz y concentrado comercial, manteniendo una relación forraje: concentrado de 60:40. La bacteria se aisló con las colonias crecidas usando la técnica de roll-tube bajo condiciones de estricta anaerobiosis y se colocaron en medio de crecimiento Me109M. Las colonias se seleccionaron aleatoriamente y se determinaron sus características macroscópicas, tales como: morfología de la colonia, textura y color, parámetros que fueron medidos en un estereoscopio. Siguiendo los parámetros de Hungate (1966) la colonia se sembró en un medio de crecimiento líquido y se incubó a 39°C durante 18 a 20 horas. Para garantizar la estabilidad y viabilidad de las cepas aisladas, estas fueron criopreservadas en nitrógeno líquido. La bacteria aislada mostró ser un anaerobio estricto que creció a 39°C bajo una atmósfera de CO₂ (100%). La bacteria creció cuando se incubó en medio de cultivo líquido Me109M modificado que contenía como fuente de carbono lactato de sodio, además de factores de crecimiento como el extracto de levadura, que es una fuente de vitaminas del complejo B y 1 trypticasa como fuente de aminoácidos. Por medio de una PCR- Directa se logró confirmar que el microorganismo pertenece al género *Megasphaera* y a la especie *elsdenii* y bajo parámetros microbiológicos el autor detectó la reducción de la acumulación de ácido láctico en la fermentación ruminal bajo condiciones in vitro. Así mismo se evaluó la capacidad de la bacteria aislada fermentando diferentes sustratos, utilizando glucosa, fructosa y maltosa. En la figura 7 se observa como la inoculación con *M. elsenii* redujo las concentraciones de ácido láctico desde las 0 hasta las 10 horas comparando con el control.

Figura 7. Concentración de ácido láctico con y sin presencia de *M. elsdenii*



Fuente: Ospina (2005).

La incubación con *M. elsdenii* previno la acumulación de ácido láctico y la disminución excesiva del pH. En fermentaciones no tratadas con *M. elsdenii* el lactato superó los 40 mM antes de la hora 2 de fermentación y alcanzó una concentración de 118 mM a la hora 12, mientras que en fermentaciones tratadas con *M. elsdenii* a las 6 horas alcanzó su pico máximo de producción de ácido láctico cercano a las 30 mM y se redujo a 7 mM a las 8 horas. Finalmente *M. elsdenii* redujo la acumulación de lactato a un (99%) la hora 10. El autor sugiere que estos hallazgos muestran el potencial de este aislado como organismo probiótico que puede ser usado para reducir la incidencia de acidosis y mejorar la eficiencia de utilización del almidón en el rumen de ganado alimentado con dietas ricas en granos y concentrados.

A pesar de los resultados favorables que ha mostrado el uso de algunas cepas en las investigaciones como se mencionó previamente, para llegar a su uso como probióticos debe tenerse en cuenta dificultades como la baja tasa de crecimiento, la incapacidad para multiplicarse a un pH ruminal bajo, el uso no preferencial de lactato como sustrato primario, la incapacidad para sobrevivir en

condiciones anaeróbicas subóptimas, la inhibición por ionóforos, métodos de suministro al rumiante y la incapacidad para seguir produciendo acetato cuando los digestores de fibra se inhiben (Meissner et al., 2010).

Técnicas de aislamiento e identificación de la bacteria *m. Elsdeni*

El primer paso para el aislamiento de microorganismos ruminales es la toma de la muestra de contenido ruminal. Las muestras se pueden colectar vía fístula por medio de una cánula o por vía orosofágica, por medio de una manguera plástica introducida en la boca del animal hasta llegar al rumen, y conectada a una bomba, para generar un sistema de vacío que permita el flujo continuo de líquido desde el saco ruminal hasta el montaje anaerobio. Una vez recolectada la muestra de fluido ruminal, se transfiere a tubos falcón de 50ml para transportarse al laboratorio una nevera de hielo o cava con hielo para ser procesadas de inmediato. El fluido ruminal restante se criopreserva (Mojica, 1993).

Para el manejo regular de los microorganismos en el laboratorio se requiere de medios de cultivo generales y específicos, y de medios de dilución para manipular las concentraciones de los microorganismos. Dentro de los materiales para la manipulación se encuentran:

- Botella *Scott*
- Agitador automático
- Agujas Wintrobe
- Pipetas
- Baño maría
- Balanza
- Probetas
- Red de gasificación

- Cilindro de CO₂
- Gradillas
- Jeringas de 5 ml
- Autoclave

Los medios de dilución están compuestos principalmente por soluciones salinas, agua destilada, resazurin (indicador de anaerobiosis), bicarbonato de sodio, y L- cisteína – HCl como agente reductor.

Para determinar el perfil de AGV de *M. elsdenii*, el microorganismo se inocula en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, medio de carbono lactato yPYG (fuente de carbono glucosa) y luego se analizan los metabolitos generados en el caldo. Estos medios de cultivo se sirven en tubos, los cuales son sellados por medio de un tapón y una tapa rosca con un orificio que permite la manipulación directa del cultivo a través de jeringas cuyas agujas se introducen directamente a través del tapón de caucho. Los medios se sirven en los tubos aplicando directamente gasificación con CO₂ a través de una aguja Wintrobe para garantizar la anaerobiosis (Hungate, 1966), y son esterilizados a 121 °C en autoclave.

Para el aislamiento y cultivo de la bacteria ruminal *M. elsdenii* se utiliza un medio selectivo, modificado para su cultivo, que contiene agua destilada, trypticasa, extracto de levadura, NaCl, L cysteina-HCL, agar y fluido ruminal clarificado (Stanton y Humphrey, 2003). La bacteria crece cuando se incuba en el medio de cultivo líquido, modificado que contiene como fuente de carbono lactato de sodio, además de factores de crecimiento contenidos en el extracto de levadura, y trypticasa que contiene péptidos y cadenas cortas de aminoácidos. El fluido ruminal centrifugado (clarificado) provee a los microorganismos de AGV y otros factores de crecimiento. El pH del medio se ajusta a 7.2 y se adiciona bicarbonato de sodio para mantener el pH sometiendo a ebullición durante 10 min. Posterior a la ebullición el medio es gasificado con CO₂ y se adiciona la L cysteina-HCL hasta que la coloración

del indicador de anaerobiosis (resazurín) cambie de un color morado a una coloración clara. Del medio preparado se toma un volumen de 4.5 ml en tubos NMP (número más probable) y se sirve en condiciones estrictas de anaerobiosis y se sellan con agrafes previo a llevarlos a autoclave por 15 min a 21 lb y 121 °C antes de ser utilizados.

Cuando las muestras llegan al laboratorio, se realizan diluciones desde 10^{-1} , hasta 10^{-7} en el medio de dilución y luego se seleccionan las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} para realizar la siembra en el medio de crecimiento de cada dilución por triplicado, tomando 0.5 ml de cada una de las diluciones con una jeringa gasificada con CO₂.

Los tubos inoculados se colocan en el dispositivo para roll-tube, que es un sistema que permite girar los tubos mientras recibe una caída constante de agua hasta que se solidifique el medio permitiendo una distribución homogénea de las células a lo largo de la pared del tubo (Mojica, 1993). Una vez terminado el proceso, los tubos se incuban a 39°C por 48 horas (Henning & Van der Walt, 1978) y posteriormente se determina la pureza del cultivo con coloración de Gram.

La bacteria se aísla de las colonias crecidas en *roll-tube* bajo condiciones de estricta anaerobiosis y se pasan al medio de crecimiento. Las colonias se seleccionan aleatoriamente y se determinan sus características macroscópicas, tales como: morfología de la colonia, textura y color, parámetros que son medidos en un estereoscopio. La colonia se siembra en un medio de crecimiento líquido y se incuba a 39 °C durante 18 a 20/h, (Hungate, 1966).

Después de este tiempo se toma 1ml del cultivo con jeringa gasificada para realizar coloración de Gram y contraste de fases, para determinar la pureza del cultivo. Si el cultivo presenta contaminación, se purifica con pases a un medio de crecimiento en agar y posteriormente a medio líquido sucesivamente hasta asegurar su pureza. Una vez se asegura la pureza se realizan réplicas del cultivo, para mantener viable la bacteria y se siembra en medio semisólido en pico de flauta. Se garantiza la estabilidad y viabilidad de las cepas aisladas por medio de la criopreservación de los

microorganismos en nitrógeno líquido.

Conclusiones

M. elsdenii juega un papel muy importante en el mantenimiento de los niveles de DL-lactato en el rumen, dado que metaboliza entre el 60 y 80% de este producto a butirato y propionato por la vía del acrilato. Esto hace a esta bacteria una buena candidata para generar probióticos que contribuyen a disminuir el riesgo de acidosis cuando se manejan dietas altas en granos o fuentes de almidones, lo cual ha llevado a tener varias cepas patentadas en la actualidad. A pesar de los resultados promisorios, aún se encuentran diferencias en la magnitud de la respuesta entre estudios y todavía hay aspectos por solucionar para llevar esta tecnología a nivel comercial como son las bajas tasas de crecimiento de esta bacteria, su incapacidad para multiplicarse cuando el pH es bajo, el uso no preferencial de lactato como sustrato primario, la incapacidad para sobrevivir en condiciones anaeróbicas subóptimas, métodos apropiados de suministro al rumiante y su incapacidad para seguir produciendo acetato cuando los digestores de fibra se inhiben.

Referencias

- Aikman, P., Henning, P., Humphries, D., & Horn, C. (2011). Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. *Journal of Dairy Science*, *94*(6), 2840-2849.
- Allison, M.J. (2000). Production for branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. In *Applied and Environmental Microbiology*, *35*, 872.
- Allison, M. J., Dawson, K. A., & Rasmussen, M. A. (1997). Digestive disorders and nutritional toxicity. *The rumen microbial ecosystem*, 633-660.
- Amaral-Phillips, D., & Twehues, J. (1996). *Subacute acidosis*. University of Kentucky.
- Ambalam, P., & Patel, S. (2018). Role of Rumen Protozoa: Metabolic and Fibrolytic. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, *10*, 79-83.
- Araujo Febres, O., & Vergara-López, J. (2007). Propiedades físicas y químicas del rumen. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, *15* (5), 113-140.
- Avery, T. B., Bartley, E. E., Dayton, A., Nagaraja, T. G., & Roof, S. (1982). Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. *Journal of Animal Science*, *54* (3), 649-658.
- Barsuhn, K., Bell R. , L., Greening R., C., Ogilvie M., L., Peters J., P., Robinson J., A., & Smolenski W., J. (1992). Prevention of acute acidosis and enhancement of feed intake in the bovine by *Megasphaera elsdenii* 407A. *J. Journal of Animal Science*, *70*, 310.
- Barsuhn, K., Bell, R., L., Johnson M., M., Greening R. , C., Robinson J., A., & Smolenski W., J. (1991). Effects of inoculation of *Megasphaera elsdenii* strain 407A (UC-12497) on ruminal pH and organic acids in beef cattle. *Journal of Animal Science*, *69*.
- Bauchop, T. (1979). Rumen Anaerobic Fungi of Cattle and Sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, *38* (1), 148-158.
- Berthiaume R., Tremblay G., Castonguay Y., Bertrand A., Bélanger G., Lafrenière C., Michaud R. (2006) Length of the daylight period before cutting improves rumen fermentation of alfalfa assessed by in vitro gas production. *Journal of DairyScience*, *102*.
- Brossard L., Martin C., Michalet-Doreau B. (2003). Ruminal fermentative parameters and blood acidobasic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Animal Research*, *513-530*
- Burrola-Barraza, M. E., Castillo-González, A. E., Chávez-Martínez, A., & Domínguez-Viveros, J. (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *46* (3), 349-361.
- Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2002). Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. En G. D. CP Ga Rebollar (Ed.), *XVIII Curso de Especialización. Fundación*

- Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA)*. Madrid.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología agrícola*. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Salta.
- Castillo-López, E, Domínguez-Ordoñez, M. (2019). Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de laproteína microbiana. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10 (1), 120-148.
- Choudhury P.K., Salem A.Z.M., Jena R., Kumar S., Singh R., Puniya A.K. (2015). Rumen Microbiology: An Overview. In: Puniya A., Singh R., Kamra D. (eds) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer, New Delhi
- Church, D. C., & Ducar Maluenda, P. (1974). Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes: fisiología digestiva. *Digestive physiology*.
- Contreras, P. A., & Noro, M. (2010). Rumen; Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. Chile: Imprenta América Ltda.
- Counotte, G. H. M., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., & DeBie, M. J. A. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 42 (4), 649-655.
- Delgado C., A., & Roberts, J. (2001). Acidosis ruminal subclínica: diagnóstico por Ruminocentesis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12 (2), 135-137.
- Departamento Nacional de Estadística (DANE). (2020). Encuesta Nacional Agropecuaria . Colombia.
- Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN). (2018). *Cifras de referencia del sector ganadero*. Fedegan.
- Fliegerova, K., Kaerger, K., Kirk, P., & Voigt, K. (2015). Rumen Fungi. (D. Kamra, A. Puniya, & R. Singh, Edits.) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*, 97-112.
- Garrett, E. F., Goodger, W. J., Nordlund, K. V., & Oetzel, G. R. (1997). A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci*, 80, 169.
- Gill, M., Siddons, R. C., Beever, D. E., & Rowe, J. B. (1986). Metabolism of lactic acid isomers in the rumen of silage-fed sheep. *British Journal of Nutrition*, 55 (2), 399-407.
- Gilchrist, F., Heath, S., & Mackie, R. (1984). An in vivo study of ruminal micro-organisms influencing lactate turnover and its contribution to volatile fatty acid production. *The Journal of Agricultural Science*, 103 (1), 37-51.
- Granja Salcedo, Y. T., Machado, M., Manrique Ardila, A., Ribeiro Jr., C. S., Rivera Calderón, L. G., & Toro Gomez, D. J. (2012). Acidosis ruminal en bovinos lecheros: Implicaciones sobre la producción y la salud animal. *Revista electrónica de Veterinaria*, 13 (4), 1-11.

- Grenet E, Breton A, Parry P, Fonty G. (1989). Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Animal Feed Science and Technology*, 26 (1-2), 55-70.
- Henning, P., Horn, C., Leeuw, K., Meissner, H., & Hagg, F. (2010a). Effect of ruminal administration of the lactate-utilizing strain *Megasphaera elsdenii* (Me) NCIMB 41125 on abrupt or gradual transition from forage to concentrate diets. *Animal Feed Science and Technology*, 157 (1-2), 20-29. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.02.002
- Henning, P., Horn, C., Steyn, D., Meissner, H., & Hagg, F. (2010b). The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Animal Feed Science and Technology*, 157 (1-2), 13-19. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.12.011
- Henning, P., & van der Walt, A. (1978). Inclusion of xylan in a medium for the enumeration of total culturable rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(6), 1008-1011. doi: 10.1128/aem.35.6.1008-1011.1978
- Hespell, R., Akin, D., & Dehority, B. (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. *Gastrointestinal microbiology*, 2, 42-141.
- Hobson, P. & Stewart, C. S (eds) (1997). *The Rumen Microbial Ecosystem*. London: Blackie Academic & professional.
- Hungate, R (1996) *The rumen and its microbes*. Academy Press
- Hurber, T.L. (1971). Effect of acute indigestion of compartmental water volumes and osmolarity in sheep. *American journal of veterinary research*, 32 (6), 887-890.
- Jenkins T.C, Wallace R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of animal science*, 86 (2), 397-412.
- Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, B. D., & Wilfert, C. M. (1997). Naturaleza, aislamiento y cuantificación de virus animales. En W. K. Joklik, H. P. Willett, B. D. Amos, & C. M. Wilfert, *Zinsser microbiología*. Panamericana.
- Klieve, A., Hennessy, D., Ouwerkerk, D., Forster, R., Mackie, R., & Attwood, G. (2003). Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 621-630. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02024.x
- Kung Jr., L; Hession, A. O. (1995) Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of animal science*. 73(1), 250-256.
- Lockington R. A., Attwood G.T., Brook er J.D. (1988) Isolation and Characterization of a Temperate Bacteriophage from the Ruminal Anaerobe *Selenomonas ruminantium*. *Applied and environmental microbiology*, 54, 1575-1580.

- Mackenzie, D. D.S. (1967) Production and utilization of lactic acid by the ruminant. A review. *Journal of dairy science*, 50 (11), 1772 – 1786.
- McAllister, T. A., & Wang, Y. (2002). Rumen Microbes, Enzymes and Feed Digestion. A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(11), 1659-1676.
- Mackie, R., McSweeney, C., & Klieve, A. (2002). Microbial Ecology of the Ovine Rumen. En M. Freer & H. Dove, *Sheep Nutrition*, 71-94. Wallingford: CABI publishing.
- Marounek, M., Fliegrova, K., & Bartos, S. (1989). Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (6), 1570-1573. doi: 10.1128/aem.55.6.1570-1573.1989
- Meissner, H., Henning, P., Horn, C., Leeuw, K., Hagg, F., & Fouche, G. (2010). Ruminant acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 (Review). *South African Journal of Animal Science*, 40 (2). doi: 10.4314/sajas.v40i2.57275
- Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in applied microbiology*, 363-369.
- Mutsvangwa, T., & Wright, T. (2003). *Sub-acute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows*. Ontario, EEUU.: Ministry of Agriculture & Food, Agriculture & Rural Division.
- Nagel, S, A, Broderick, G. (1992) Effect of formic acid or formaldehyde treatment of alfalfa silage on nutrient utilization by dairy cows. *Journal of dairy science*, 75 (1), 140-154
- Nocek, J. E. (1997). Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. *Journal of dairy science*, 80 (5), 1005-1028.
- Nocek, J. E., Polan, C. E., & William Heald, C. (1984). Influence of Ration Physical Form and Nitrogen Availability on Ruminant Morphology of Growing Bull Calves. *Journal of Dairy Science*, 67(2), 334-343.
- Obispo N. (1992). Los hongos anaeróbicos del rumen. *Zootecnia Tropical*, 10 (1), 91-107.
- Orpin, C & Joblin, K. (1997). The rumen anaerobic fungi. En Hobson, P. N. & Stewart, C.S. (Ed.). *The Rumen Microbial Ecosystem*, 140-195. Springer Netherlands.
- Ossa, F. (1999). *Identificación molecular de bacterias celulolíticas ruminales y degradación de la pared celular de Bouteloua Repens por aislados nativos de Ruminococcus Flavefaciens*. [Doctoral dissertation, Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia]
- Ospina, C. (2005). *Aislamiento, identificación bioquímica y molecular de la bacteria ruminal Megasphaera elsdenii y su efecto en la prevención de la acumulación de ácido láctico in vitro*. [Tesis de pregrado]. Universidad del Tolima.
- Portela Díaz, D. F. (2018). Importancia de la interacción de bacteriófagos y bacterias ruminales en el

- desarrollo productivo del rumiante. *Ciencias Agropecuarias*, 4 (2), 41-45.
- Rodríguez, F.(1996) El poder de las nuevas herramientas para estudiar bacterias. *Revista ciencia y tecnología*, 14, 21-25. Agrosavia Biblioteca Agropecuaria de Colombia (km 14 Vía Mosquera).
- Slyter, L.L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *Journal of animal science*, 43 (4), 910-929.
- Stanton, T., & Humphrey, S. (2003). Isolation of Tetracycline-Resistant *Megasphaera elsdenii* Strains with Novel Mosaic Gene Combinations of tet (O) and tet (W) from Swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7), 3874-3882. doi: 10.1128/aem.69.7.3874-3882.2003
- Strobel, H. J., & Russell, J. B. (1986). Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*, 68 (11), 2941-2947.
- Swain R.A., Nolan J.V. & Klieve A. (1996). Natural Variability and Diurnal Fluctuations within the Bacteriophage Population of the Rumen. *Applied and environmental microbiology*, 62, 994-997.
- Vallejo-Timarán D, Reyes-Vélez J, VanLeeuwen J, Maldonado-Estrada J, Astaiza- Martínez J. (2020) Incidence and effects of subacute ruminal acidosis and subclinical ketosis with respect to postpartum anestrus in grazing dairy cows. *Heliyon*, 6 (4), 1-9.
- Van Lier, E., & Regueiro, M. (2008). Digestión en retículo Ruminal. *Curso de anatomía y fisiología animal*. Montevideo: Universidad de la República.
- Wallace, R. (1986). Catabolism of Amino Acids by *Megasphaera elsdenii* LC1. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1141-1143. doi: 10.1128/aem.51.5.1141-1143.1986
- Williams A.G., Coleman G.S. (1992) Methods Used for the Separation and the Cultivation of Rumen Protozoa. *The Rumen Protozoa*, 133-164. Springer, New York, NY.