

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 175**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03766052 .9**
96 Fecha de presentación: **15.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1523320**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

54 Título: **CEPA DE MEGASPHAERA ELSDENII Y SUS USOS.**

30 Prioridad:
18.07.2002 ZA 257400002

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:
**AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL
OLD SOUTPAN ROAD, ONDERSTEPSPOORT
VETERINARY INSTITUTE, ONDERSTEPSPOORT
0110 PRETORIA, ZA y
MS BIOTECH, INC.**

72 Inventor/es:
**HORN, Charles, Henry;
KISTNER, Albrecht;
GREYLING, Barend, Jacobus y
SMITH, Alexandra, Helena**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 175 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Megasphaera elsdenii* y sus usos

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Megasphaera elsdenii* y a sus usos. La presente invención se refiere además a preparaciones y procedimientos que incorporan dicha cepa. La presente invención también se refiere a piensos para rumiantes y a una preparación y procedimiento para la prevención y tratamiento de la acidosis láctica en rumiantes.

Antecedentes**Acidosis láctica**

La acidosis láctica es un trastorno digestivo de los rumiantes que puede producirse cuando hay una ingesta excesiva brusca de carbohidratos fácilmente fermentables, particularmente cuando los rumiantes cambian de una dieta de forraje a una dieta concentrada de alta energía o rica en energía que contiene un alto nivel de almidón. El trastorno se caracteriza por una acumulación de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico, en el rumen (Dawson y Allison, 1988). Ciertos estudios han indicado que un fuerte desequilibrio entre las cantidades de bacterias productoras de ácido láctico y bacterias que usan ácido láctico, producido por un aumento brusco de la proporción de carbohidratos fácilmente fermentables en la dieta, es la causa principal de la aparición de la acidosis láctica (Slyter, 1976).

Durante décadas se ha aconsejado la manipulación de la población microbiana del rumen para prevenir la acidosis láctica mediante la administración de material que contiene una gran cantidad de bacterias que usan lactato, pero nunca se ha puesto en práctica a gran escala. Las manipulaciones para aumentar el uso de lactato dentro del rumen se han conseguido mediante la administración de fluido ruminal de un animal ya adaptado (Allison y col., 1964; Braun y col., 1992) y mediante la administración de cultivos bacterianos puros o mezclados de consumidores de lactato (documentos 1.251.483 Wilker y col., 1971; 3.857.971 Abdo y Cahilly, 1974; 4.138.498 Das, 1979; 5.380.525 Leedle y col., 1991; Hession y Kung, 1992; Robinson y col., 1992; Wiryawan y Brooker, 1995).

Algunos de estos aditivos alimentarios que contienen cultivos bacterianos vivos se han patentado (documentos 1.251.483 Wilker y col., 1971; 3.857.971 Abdo y Cahilly, 1974; 4.138.498 Das, 1979; 5.380.525 Leedle y col., 1991), pero no se han comercializado mucho o no se han comercializado en absoluto. En tres de las patentes (documentos 1.251.483 Wilker y col., 1971; 3.857.971 Abdo y Cahilly, 1974; 4.138.498 Das, 1979), los cultivos se obtuvieron a partir de fermentadores de cultivo continuo con un inóculo inicial de fluido ruminal. Sin embargo, los animales donantes no estaban necesariamente adaptados a una dieta concentrada de alta energía. Tampoco se menciona la tolerancia al pH de ninguno de esos cultivos. En otra patente (documento 5.380.525 Leedle y col., 1991), los cultivos se aislaron a pH 5,3 directa o indirectamente después del enriquecimiento a partir de rumiantes adaptados a dietas concentradas de alta energía.

La incidencia acidosis subaguda y aguda en vacas lecheras

La acidosis ruminal subaguda es un problema sanitario y de producción común y grave en la industria lechera porque las vacas lecheras normalmente se alimentan con dietas que contienen altos niveles de grano. Las acidosis ruminales subaguda y aguda simplemente son diferentes grados del mismo problema. La acidosis ruminal aguda es más severa y las funciones fisiológicas pueden verse afectadas significativamente. El animal afectado está deprimido y normalmente atáxico, anoréxico, con las pupilas dilatadas y un ritmo cardíaco elevado. La diarrea será evidente y el animal puede permanecer tumbado y morir de 2 a 5 días después de la provocación (Nordlund, 1995). La acidosis aguda se caracteriza por una reducción espectacular del pH ruminal ($\leq 5,0$), un gran aumento en la concentración de ácido láctico y una gran reducción en protozoos (Nocek, 1997).

Los signos de la acidosis ruminal subaguda son muy diferentes de los de la acidosis aguda. Los sistemas modernos de la industria lechera de alojamiento en grupos o alimentación en grupos hacen que sea difícil reconocer estos síntomas, porque normalmente no se detectan dentro del grupo las vacas individuales con estos problemas. Los rebaños con acidosis ruminal subaguda presentarán algunos o todos los siguientes signos: laminitis, diarrea intermitente, pérdida de apetito o ingesta cíclica de alimento, altas proporciones de sacrificio en el rebaño por problemas sanitarios poco definidos, mal estado físico a pesar de la ingesta de energía adecuada, abscesos sin causas evidentes y hemoptisis (tos con sangre) o epistaxis (sangrado de la nariz). La mayoría estos signos son secundarios a la acidosis y la mayoría de ellos no aparecen hasta semanas o meses después de los acontecimientos iniciales de la acidosis. A diferencia de las vacas de engorde intensivo, las vacas lecheras se mantienen durante años y el tratamiento de la acidosis, por lo tanto, es importante para aumentar los beneficios.

La laminitis crónica es quizás el signo clínico más constante de un rebaño con acidosis ruminal subaguda. Aunque la relación entre la acidosis y la laminitis no se entiende completamente, la asociación está ampliamente reconocida clínicamente y demostrada en ensayos de investigación (Kelly y Leaver, 1990; Manson y Leaver, 1988; Nocek, 1997). Además, la mayoría de los gerentes de la industria lechera, veterinarios y nutricionistas tienden a infraestimar o quizás tolerar una incidencia anormal de laminitis y cojera en rebaños de producción de leche. Una investigación en Minnesota demostró una incidencia media de cojera del 15 % con un intervalo del 0 al 33 % (Nordlund, Garret y

Oetzel, 1995). Ciertos estudios en Europa han identificado la cojera como el tercer problema sanitario más costoso en vacas lecheras después de la mastitis y la reproducción (McDaniel y Wilk, 1989). De esta manera, el tratamiento de la acidosis claramente es de suma importancia.

5 Un síntoma importante de la acidosis subaguda es la reducción de la ingesta de alimento y la reducción de la eficacia de la producción de leche. La acidosis subaguda, debido a las dificultades para diagnosticar el problema, tiende a disimularse con otros problemas, tales como un tratamiento deficiente, una baja calidad del forraje y una mayor actividad económica para muchos granjeros de la industria lechera porque estos problemas son omnipresentes, particularmente en las granjas lecheras de alta producción.

10 Debido a la alta incidencia de alteraciones nutricionales y metabólicas entre las vacas lecheras de alta producción, las estrategias nutricionales para mejorar el rendimiento con dietas basadas en cereales se centra en la prevención de la disfunción ruminal controlando la producción de ácido o estimulando un crecimiento microbiano más eficaz. En el momento actual, los aditivos alimentarios juegan un papel importante a este respecto (Hutjens, 1999). El uso de cepas de cultivos de levaduras que estimulan específicamente el crecimiento de bacterias que usan ácido láctico genera mucho interés y una investigación reciente indicó que se están usando cultivos de levadura en el 33 % de los rebaños de Wisconsin de alta producción. Los resultados de diversos estudios sugieren que la cepa *Yea Sacc 84170* parece ser particularmente adecuada para alterar la fermentación ruminal y la producción animal cuando se usa en ensilajes de alto contenido de lactato y piensos de alto contenido de concentrados (Dawson, 1995). Sin embargo, los resultados de producción son muy irregulares. En los Estados Unidos, el coste del suplemento con cultivo de levaduras es de 4 - 6 centavos por vaca y por día (Hutjens, 1999). Los ionóforos, debido a su capacidad de prevenir el crecimiento de productores importantes de ácido láctico, también puede jugar un papel en el tratamiento de la acidosis subaguda. Aunque el coste es relativamente bajo (1 - 2 centavos estadounidenses/vaca/día, Hutjens, 1999) parece haber alguna resistencia contra el uso de ionóforos debido a algunos casos recientes de toxicidad a los ionóforos. Además, los ionóforos no se han registrado en los Estados Unidos para su uso en dietas para vacas lecheras.

25 Experimentalmente, ha habido varias bacterias que tienen potencial como agentes microbianos de suministro directo (DFM) para rumiantes, pero no se han comercializado por varias razones. Por ejemplo, *Megasphaera elsdenii* (ME) es el organismo que usa lactato principal en el rumen de vacas adaptadas alimentadas con dietas de alto contenido de grano. Cuando las vacas cambian desde una dieta con un alto contenido de forraje a una dieta altamente concentrada, el número de ME con frecuencia es insuficiente para prevenir la acidosis láctica. Kung y Hessian (1995) han mostrado que la adición de ME B 159 prevenía la acumulación de ácido láctico durante la exposición a carbohidratos altamente fermentables. Robinson y col (1992) demostraron que la adición de una cepa diferente de ME (407A) prevenía la acidosis láctica en novillos.

30 Aunque los costes asociados con la acidosis ruminal subclínica son difíciles de identificar, los costes potenciales para la industria lechera son enormes (Hall, 1999). Donovan (1997) estimó de forma conservativa el coste de la acidosis subclínica para la industria lechera de Estados Unidos en 500 millones de dólares a 1 billón de dólares al año.

40 Eldsen y Lewis (1953) describieron por primera vez un coco sin motilidad, productor de ácidos grasos, Gram-negativo, estrictamente anaerobio, cultivo aislado del rumen de una oveja. Sin embargo, el cultivo aislado original se perdió porque se había caracterizado fenotípicamente con detalle. Se aisló un organismo que se parecía a la cepa original a partir del contenido del rumen de ovejas varios años después por Eldsen y sus colegas (Eldsen y col., 1956). Las características de este organismo no se ajustaban a la descripción de ninguna especie conocida en ese momento, pero en vista del pequeño número de cultivos aislados estudiados, los autores se abstuvieron de asignar el organismo a una nueva especie y género, y en su lugar lo denominaron LC. Gutiérrez y col. (1959) encontraron un organismo similar en el rumen de vacas con meteorismo espumoso y concluyeron que se incluía dentro de la definición del género *Peptostreptococcus*, proponiendo la creación de una nueva especie *P. elsdenii*. Posteriormente, Rogosa (1971) demostró que los cultivos aislados de tipo LC eran Gram-negativos y, por lo tanto, no debían incluirse en el género *Peptostreptococcus*. Propuso la transferencia de *P. elsdenii* a un nuevo género *Megasphaera* y la nueva combinación de *M. elsdenii*, con el cultivo aislado LC1 de Eldsen y col. (1956) como la cepa tipo. *M. elsdenii* es un anaerobio estricto encontrado principalmente en el rumen de animales jóvenes y animales que reciben dietas altamente concentradas en las que la fermentación del lactato está particularmente pronunciada. El organismo también se ha cultivado aislado en ocasiones a partir de las heces de seres humanos (Sugihara y col., 1974) y fermenta el lactato principalmente a butirato, propionato, isobutirato, valerato, CO₂, H₂ y algunas veces cantidades muy pequeñas de caproato (Stewart y Bryant, 1988). Como *M. elsdenii* no está sometido a la represión de catabolitos por glucosa o maltosa como ocurre en *Selenomonas*, que también es un consumidor de lactato que aparece en el rumen, su contribución al catabolismo del lactato está particularmente aumentada después de la ingesta de carbohidratos solubles (Stewart y Bryant, 1988).

50 La Patente de Estados Unidos N° 3.956.482 (Hahn y col 1976) desvela un procedimiento para aumentar la producción de leche en rumiantes, que incluye las etapas de administrar en el rumen de una vaca en lactancia microorganismos productores de acetato que consisten en una mezcla de un 0-4 % de *M. elsdenii*, un 30-42 % de *Streptococcus bovis*, un 3-10 % de *Lactobacillus acidophilus*, un 12-20 % de *Bifidobacterium adolescentis*, un 18-44 % de *Bacteroides ruminicola* y un 3-12 % de *Butyrivibrio fibrisolvens* cultivados y adaptados a un medio nutriente.

Un inconveniente importante de la invención desvelada en la patente anterior es el porcentaje relativamente elevado (entre un 30 y un 42 %) de *Streptococcus bovis*, que junto con *Lactobacillus* es la causa principal de la acidosis láctica en rumiantes. La mezcla contiene además un porcentaje relativamente bajo de *M. elsdenii* (0-4 %) y la administración de la mezcla probablemente agravaría o iniciaría la acidosis láctica ruminal en lugar de prevenirla o tratarla. La mezcla además se expone a la atmósfera, de forma que la mayor parte de los organismos *M. elsdenii* mueren. Además, una mezcla de microorganismos es mucho más difícil de controlar que un cultivo puro.

La Patente de Estados Unidos 4.138.498 (Das, 1979) desvela un aditivo alimentario para la administración a rumiantes para prevenir o minimizar la acidosis láctica cuando los rumiantes cambian de una dieta de forraje a almidón, que comprende un cultivo bacteriano de *M. elsdenii* mezclado con un aditivo alimentario animal ingerible. *M. elsdenii* es estrictamente anaerobio y un inconveniente del aditivo alimentario desvelado en esta patente, además de los inconvenientes indicados más adelante, es que *M. elsdenii* se expone a la atmósfera, lo cual lleva a una rápida reducción en la cantidad de células viables disponibles en el aditivo.

La Patente de Estados Unidos 5.380.525 (Leedle y col., 1991) desvela un cultivo biológicamente puro de *M. elsdenii* NRRL-18624 y su uso para facilitar la adaptación de rumiantes desde un forraje o pasto normal a una dieta rica en almidón de alta energía. El cultivo tiene los inconvenientes indicados más adelante.

La Patente de Estados Unidos 5.529.793 (Garner y col., 1996) desvela una mezcla de bacterias productoras de ácido láctico y una bacteria que usa lactato, tal como *M. elsdenii*, con una formulación seca o una dieta de engorde intensivo de los animales para mejorar el uso del pienso por un rumiante. Un inconveniente de esta invención es que *M. elsdenii* generalmente es estrictamente anaerobio y su aplicación a piensos secos daría como resultado la muerte de la mayoría de las células.

Los solicitantes han evaluado las cepas anteriores de *M. elsdenii* y han deducido que generalmente no son adecuadas para la comercialización y el tratamiento preventivo a gran escala de la acidosis láctica en rumiantes, debido a los siguientes inconvenientes de estas cepas, a saber, no:

- son muy activas y están adaptadas a la proliferación en el rumen de animales con dietas altamente concentradas;
- son capaces de proliferar a valores de pH relativamente bajos, por debajo de pH 5,0 y tan bajos como de 4,5, caracterizados como acidosis aguda;
- son resistentes a antibióticos ionóforos añadidos comúnmente a las dietas de engorde intensivo; y
- son capaces de usar preferentemente lactato como fuente de carbono, incluso en presencia de carbohidratos solubles tales como glucosa y maltosa.

Otros inconvenientes de estas cepas son que, generalmente:

- tienen una velocidad de crecimiento relativamente baja, es decir, inferior a $0,938 \text{ h}^{-1}$;
- no tienen la capacidad de desarrollarse en azúcares reductores, así como en lactato;
- tienen una tasa de producción de biomasa relativamente baja; es decir, menor de $0,39 \text{ g (l.h)}^{-1}$;
- no son resistentes a ionóforos; y
- producen predominantemente propionato y butirato y no predominantemente acetato.

Objeto de la invención

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva cepa de *M. elsdenii* y sus usos, y preparaciones y procedimientos que incorporan dicha cepa con los que pueden solucionarse o al menos minimizarse los inconvenientes mencionados anteriormente.

El documento WO 91/13146 describe una bacteria ruminal para prevenir la acidosis láctica aguda.

J. Animal Science, 1995, Vol. 73(1), páginas 250-256, describe la prevención de la acumulación de lactato *in vitro* en fermentaciones ruminales por inoculación con *M. elsdenii*.

J. Applied Microbiology, Abril de 2002, Vol. 92, páginas 753-758, describe la enumeración de *M. elsdenii* en el contenido del rumen por ensayo de nucleasa Taq en tiempo real.

La presente invención proporciona un cultivo bacteriano biológicamente puro de *M. elsdenii* que tiene una secuencia de ARN ribosómico 16S que presenta al menos un 97,0 % de similitud con una secuencia de ARN ribosómico 16S de la cepa de *M. elsdenii* depositada en NCIMB, Aberdeen, Scotland, RU con el número NCIMB 41125; y una velocidad de crecimiento de al menos $0,938 \text{ h}^{-1}$.

De acuerdo con un segundo aspecto de invención, se proporciona un cultivo bacteriano biológicamente puro de la cepa *M. elsdenii* depositada en NCIMB, Aberdeen, Scotland, RU con el número NCIMB 41125.

La cepa de *M. elsdenii* de acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención se caracteriza adicionalmente por su:

- capacidad de usar lactato muy eficazmente incluso en presencia de azúcares,
 - resistencia a ionóforos,
 - velocidad de crecimiento relativamente alta;
 - capacidad de producir predominantemente acetato; y
- 5 - capacidad de proliferar a valores de pH relativamente bajos por debajo de 5,0 y tan bajos como de 4,5.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición para facilitar la adaptación de rumiantes desde una dieta basada en forraje a una dieta basada en concentrados de alta energía, consistiendo la composición esencialmente en el cultivo bacteriano del primer o segundo aspectos de la invención.

- 10 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para facilitar la adaptación de rumiantes desde una dieta basada en forraje a una dieta concentrada de alta energía que incluye la etapa de administrar en el rumen de dichos rumiantes una cantidad eficaz de un cultivo bacteriano de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención.

- 15 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un aditivo alimentario para rumiantes que comprende un vehículo y una cantidad eficaz de un cultivo bacteriano de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención.

Preferentemente, el cultivo se dispone en un recipiente anaerobio.

- 20 De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de la acidosis láctica ruminal y la prevención de uno cualquiera o más de los siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos, que incluye la etapa de administrar de forma anaerobia en el rumen de un rumiante una cantidad eficaz de un cultivo bacteriano de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención.

- 25 De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un agente veterinario para el tratamiento de la acidosis láctica ruminal y la prevención de uno cualquiera o más de los siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos, que comprende una cantidad eficaz de cultivo bacteriano de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención.

- 30 De acuerdo con un octavo aspecto de la invención, se proporciona una preparación para el tratamiento de la acidosis láctica ruminal y la prevención de uno cualquiera o más de los siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos en rumiantes, que comprende:

- un inóculo de un cultivo bacteriano de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención; y
- un medio de crecimiento anaerobio separado,

- 35 estando dispuestos los componentes de la preparación en cámaras separadas de un recipiente anaerobio que se pueden conectar de forma anaerobia entre sí, inoculándose de esta manera el medio de crecimiento con el cultivo de forma anaerobia.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para conseguir una cualquiera o más de las siguientes mejoras en rumiantes, a saber,:

- mayor producción de leche;
 - mayor rendimiento de engorde intensivo;
 - mayor velocidad de crecimiento;
 - reducción en el tiempo de acabado;
 - menor morbilidad y mortalidad digestiva;
 - menor incidencia de acidosis láctica y enfermedades relacionadas;
 - mayor eficacia de conversión de alimentos; y
- 45 - capacidad de alimentarse con dietas relativamente más concentradas, incluyendo la etapa de administrar en el rumen de un rumiante una cantidad eficaz de un cultivo bacteriano de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención.

Preferentemente, el cultivo se administra de forma anaerobia.

- 50 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un procedimiento para aislar un cultivo biológicamente puro de un microorganismo ruminal superior en un periodo de tiempo relativamente más corto que en los procedimientos convencionales, incluyendo el procedimiento las etapas de:

- obtener una muestra de fluidos ruminales; y
- cultivar la muestra en un medio de crecimiento preseleccionado,

caracterizándose el procedimiento porque se preselecciona una pluralidad de parámetros seleccionados del grupo

que comprende constituyentes del medio de crecimiento, velocidad de dilución, pH, temperatura, agentes antimicrobianos, entorno gaseoso, potencial redox, ausencia de nutrientes y organismos provocadores, para favorecer el microorganismo superior del rumen en detrimento de microorganismos inferiores del rumen.

5 La invención se describirá a continuación con más detalle haciendo referencia a los ejemplos proporcionados a continuación y los dibujos adjuntos, en los que:

- La Figura 1 es un gráfico de las velocidades de crecimiento de consumidores de lactato a diversos valores de pH;
 la Figura 2 es un gráfico de las velocidades de crecimiento (h^{-1}) de los cultivos aislados que usan lactato, en un medio de glucosa a diversos valores de pH; y
 10 la Figura 3 es el árbol filogenético de *M. elsdenii* de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, se aislaron directamente organismos capaces de usar ácido láctico a partir de rumiantes adaptados a una dieta altamente concentrada. El objetivo fue seleccionar los cultivos con la mejor combinación de características para la aplicación como un inóculo conservado, cultivado en masa, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la acidosis láctica.

- 15 Para que las bacterias que usan lactato sean eficaces, tienen que ser muy activas y estar adaptadas a la multiplicación en el rumen de animales con dietas altamente concentradas. Los organismos deben poder multiplicarse a valores de pH por debajo de pH 5,0. Los cultivos aislados seleccionados también deben ser resistentes a antibióticos ionóforos añadidos comúnmente a las dietas de engorde intensivo. El lactato debe usarse preferentemente como fuente de carbono incluso en presencia de carbohidratos solubles tales como glucosa o
 20 maltosa, que estarían presentes en altas proporciones en dietas altamente concentradas.

Procedimientos

1. Animales usados durante los aislamientos

- 25 Se eligieron muestras de contenidos del rumen de animales con una preselección con respecto a bacterias que usan lactato, particularmente de vacas lecheras fistuladas en lactancia de la unidad de Nutrición de Vacas Lecheras, Irene, del Consejo de Investigación Agrícola (Sudáfrica) así como de ganado de engorde intensivo de Chalmar Beef (Pretoria, Sudáfrica) que se sacrificaron al final de sus períodos de acabado. Todos los animales se adaptaron a dietas altamente concentradas, que aumentaron las cantidades de bacterias que usaban lactato que aparecían de forma natural.

2. Recogida y preparación de muestras

- 30 Se recogieron muestras de contenidos del rumen de vacas lecheras aproximadamente a las 09:00 h, después de que las vacas hubieran comido y se hubieran ordeñado. Se obtuvieron muestras de contenidos del rumen de animales de engorde intensivo 15-30 minutos después de sacrificar a los animales. Se rellenaron frascos de muestra de plástico tapados a rosca hasta su capacidad con fluido ruminal filtrado a través de dos capas de gasa. El fluido ruminal se transfirió directamente al fermentador.

3. pH-auxostato

- 35 Un sistema de cultivo continuo New Brunswick Scientific Bioflo 1 se modificó en un pH-auxostato por conversión de la bomba de dosificación de pH en una bomba de adición de medio. El pH se controló con un pH-electrodo Schott S23158 conectado a un medidor del pH 302 y valorador de Digital Data Systems. Se añadió un medio poco tamponado cuando el pH aumentaba con respecto al valor establecido hasta que se alcanzaba el valor deseado. El volumen de trabajo del recipiente de cultivo fue de 270 ml. La máxima velocidad de dilución obtenida para un organismo dado durante el cultivo en auxostato es una medida de la velocidad máxima de crecimiento de ese organismo durante esas condiciones.

4. Aislamiento de lactato usando bacterias del rumen mediante el auxostato

4.1 Condiciones y medio de crecimiento

- 45 Se usó fluido ruminal filtrado para rellenar el fermentador (270 ml) inicialmente y el valorador se activó para añadir medio estéril (Medio 1) al cultivo proporcionalmente al aumento en el pH del cultivo. El Medio 1 era un medio sin fluido ruminal semidefinido que consistía en: Na-lactato (70 %), 10 g/l; Peptona, 2 g/l; KH_2PO_4 1 g/l; $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/l; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,06 g/l.; vitaminas (clorhidrato de piridoxal, 4 mg/l; piridoxamina, 4 mg/l; riboflavina, 4 mg/l; cloruro de tiaminio, 4 mg/l; nicotinamida, 4 mg/l; Ca-D-pantotenato, 4 mg/l; ácido 4-aminobenzoico 0,2 mg/l, biotina, 0,2 mg/l, ácido fólico, 0,1 mg/l y cianocobalamina, 0,02 mg/l); $Na_2S \cdot 9H_2O$, 0,25 g/l; cisteína, 0,25 g/l; antiespumante, 0,07 ml/l y monensina, 10 mg/l. Se añadieron tanto la solución de Na-lactato como la solución de minerales al frasco de depósito y se esterilizaron en autoclave durante 60 min. La peptona se disolvió en 300 ml de $d.H_2O$ y se esterilizó en autoclave por separado en un frasco Schott de 1,0 l con una salida inferior equipada con conexiones de vidrio Quick-fit. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración de antemano así como los dos

agentes reductores. Después de la esterilización en autoclave, el frasco de depósito se gasificó con gas anaerobio durante una noche y los otros constituyentes se añadieron por separado después de la refrigeración. El pH se ajustó al valor deseado con HCl 5 N.

5 El cultivo continuo se continuó hasta que se observó microscópicamente un cultivo puro. Se tomó una muestra del fermentador con una jeringa estéril, que se selló y se transfirió a la vitrina anaerobia (Forma Scientific modelo 1024). Una gota del cultivo se aplicó en estrías en una placa Petri que contenía Medio 1 solidificado con agar al 2 %. La incubación continuó a 39 °C durante una noche y se transfirió a una sola colonia con una aguja y jeringa estéril a Medio 1 nuevo contenido en un frasco de suero de 30 ml. Después de la incubación a 39 °C durante 24 h, el cultivo se transfirió a varios medios inclinados que contenían Medio 1 y se incubaron durante una noche. Estos medios
10 inclinados se almacenaron sobre nitrógeno líquido para la conservación a largo plazo.

4.2 Velocidades de crecimiento discontinuo de cultivos aislados en el fermentador

Las velocidades de crecimiento de los cultivos aislados se verificaron usando la técnica de cultivo discontinuo y controlando el aumento de densidad óptica a lo largo del tiempo. Se representó el logaritmo natural de la densidad óptica (DO) frente al tiempo y la parte lineal del gráfico se usó para determinar la pendiente, que representaba la
15 velocidad máxima de crecimiento del organismo. La determinación de la velocidad de crecimiento discontinuo se realizó en un cultivo en quimiostato, que se diluyó con un medio estéril hasta que se obtuvo una suspensión de cultivo muy diluida y el suministro de medio se cortó para iniciar el crecimiento discontinuo. La ventaja de usar un quimiostato para este trabajo es que no hay fase logarítmica, ya que todas las células son viables y están adaptadas al medio.

20 4.3 Técnicas analíticas

Se determinaron los ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases con un cromatógrafo de gases Carlo Erba GC4200 con detector de ionización de llama y una columna Tupelo 1-1825 (Supelco Inc., Bellefonte PA, Estados Unidos). Las condiciones de operación fueron las siguientes: gas portador, nitrógeno; gases de llama, hidrógeno y
25 aire; temperatura de la columna 175 °C; temperatura del orificio de inyección 200 °C. Para la integración de picos se usó el sistema de datos Barspec (Barspec Systems Inc., Rehovot, Israel). Como patrón interno se usó ácido pivalico. El uso de los isómeros D- y L-lactato se determinó enzimáticamente (Test combination 1112 821, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

5. Aislamientos de bacterias mediante el procedimiento de extensión en placa

5.1 Medio de cultivo

30 El medio de lactato de fluido ruminal incubado (IRFL) para los aislamientos de extensión en placa consistían en 400 ml de fluido ruminal clarificado incubado (Olumeyan y col., 1986) de oveja alimentada con alfalfa, 371 ml de agua destilada, 2 g de peptona (Merck), 15 g de agar, 100 ml de solución de D,L-lactato sódico al 10 % (p/v), 100 ml de solución púrpura de bromocresol al 0,04 % (p/v) y 25 ml de solución mineral que contenía 40 g/l de KH_2PO_4 ; 120 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2,4 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se usó ácido láctico (90 % p/v) para ajustar el pH a 5,5
35 antes de la esterilización en autoclave a 121 °C durante 25 minutos. Después de la esterilización, el medio se enfrió en un baño de agua a 50 °C mientras se gasificaba con una mezcla de gas anaerobio. Se añadieron asepticamente dos mililitros de cada uno de los agentes reductores, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (12,5 % p/v) y cisteína.HCl.H₂O (12,5 % p/v). Como el medio IRFL no es completamente selectivo para los consumidores de lactato, se incorporó púrpura de bromocresol para facilitar la detección de los consumidores de lactato. Cuando se usa lactato, hay un cambio en el
40 equilibrio iónico en las proximidades inmediatas de la colonia que produce un aumento del pH. Un aumento del pH por encima de 6,3 se indicaba como un cambio de color de amarillo a púrpura en la zona concéntrica con el cultivo.

Se determinó la tolerancia a ácidos en placas de agar IRFL con valores de pH medio inicial de 4,5, 5,0 y 5,5.

La resistencia a ionóforos se ensayó en placas de agar IRFL que contenían 10 ppm de ionóforos usados generalmente en dietas altamente concentradas, es decir, monensina (Sigma) y lasalocid (Sigma). La represión del
45 uso de lactato por azúcares solubles se ensayó en placas de agar IRFL suplementadas con maltosa o glucosa a una concentración final de 10 g/l. Un resultado positivo, es decir, una zona púrpura concéntrica con la colonia indicaba que la velocidad de liberación de base debida al uso de lactato excedía a la producción de ácido a partir del azúcar añadido. Los cultivos aislados también se exploraron en medio de agar IRFL sin lactato, pero al que se había añadido glucosa o maltosa a una concentración de 10 g/l, para determinar el uso de los dos azúcares.

50 Las velocidades de crecimiento en maltosa y glucosa se determinaron en un medio similar al medio SDL, pero en el que el lactato se había reemplazado por 10 g/l de glucosa o maltosa.

5.2 Aislamiento por extensión en placa y exploración

Las muestras para los aislamientos por extensión en placa se diluyeron (Mackie & Heath, 1979) en una vitrina anaerobia. Se prepararon placas de extensión de medio IRFL con las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} y se incubaron de forma
55 anaerobia a 39 °C. Después de 24 horas, se transfirieron colonias bien separadas que mostraban una zona púrpura

a medio líquido IRFL en microtubos de 1,5 ml. Los microtubos inoculados, que mostraron un cambio de color a púrpura en 16 horas, se exploraron con respecto a la tolerancia a ácidos, resistencia a ionóforos, represión de catabolitos y uso de glucosa y/o maltosa. La exploración se realizó por cultivo en placas replicado (Lederberg y Lederberg, 1952) usando un inoculador multipunto para inocular 20 cultivos aislados en una serie de nueve placas de agar de diferentes composiciones descritas anteriormente.

5.3 Determinaciones de la velocidad de crecimiento

El crecimiento se midió, por triplicado, en medio SDL, SDG o SDM como un aumento de turbidez a 578 nm. Los viales se incubaron en un baño de agua a 39 °C entre lecturas. Las lecturas se continuaron hasta que la turbidez alcanzó el límite de una relación satisfactoria con la biomasa. Los logaritmos naturales de la densidad óptica (DO) se representaron frente al tiempo de incubación. La pendiente de la fase de crecimiento exponencial que representa la velocidad de crecimiento específica se calculó por regresión lineal con la ayuda de un paquete de software de hojas de cálculo.

Los cultivos desarrollados en medio SDL a pH 5,7 después se incubaron adicionalmente durante un total de 24 horas, después de lo cual se conservaron 9 ml por la adición de un mililitro de NaOH al 10 % (p/v) para el análisis de los productos finales formados y el uso de los isómeros de lactato.

5.4 Estudios fisiológicos del crecimiento de cultivos aislados en placa

Descripción del fermentador. Se estableció un sistema de cultivo continuo con tres fermentadores con una capacidad de aproximadamente 250 ml cada uno. Se usó una sola bomba peristáltica para suministrar medio a diferentes velocidades a los tres fermentadores. La temperatura de los cultivos se mantuvo a 39 °C. El medio y los fermentadores se gasificaron con CO₂ al 100 % para mantener un entorno anaerobio. El pH de los cultivos se mantuvo a pH 5,5 por adición de ácido ortofosfórico al 20 % (p/v) cuando fue necesario. La velocidad de dilución se estableció a un 70 %, 80 % y 90 % de la velocidad de crecimiento máxima. Se extrajo una muestra de 80 ml asépticamente de cada fermentador en estado estacionario. A partir de esta muestra se determinó la masa seca de las células y el ácido láctico residual en el medio. La tasa de producción de biomasa, un producto de la velocidad de dilución y la biomasa en estado estacionario, se calculó usando las cifras de la velocidad de dilución real y de masa seca. El coeficiente de rendimiento de crecimiento, que es una función de la concentración de biomasa en estado estacionario con respecto a la cantidad de sustrato usado, se calculó usando las cifras de residuo de ácido láctico y de masa seca.

6. Ensayos con oveja para evaluar la capacidad del cultivo aislado CH₄ para prevenir la acumulación de ácido láctico ruminal

6.1 Procedimientos

En el primer ensayo se dividieron aleatoriamente 12 ovejas castradas canuladas ruminalmente (peso vivo medio aproximadamente 40 kg) en un grupo de tratamiento y de control, que comprendían seis animales cada uno. Todos los animales se alimentaron con forraje *ad libitum* durante 21 días. El día 21 se dejaron en ayunas durante 11 horas antes de ofrecer 1000 g de harina de maíz/animal y al mismo tiempo dosificando intra-ruminalmente 300 g de jarabe de maltosa/animal. Una hora después, todo el maíz que no había consumido cada animal se introdujo directamente en su rumen. Inmediatamente después, los animales del grupo de tratamiento se dosificaron por vía intra-ruminal con 1×10^{11} ufc de CH₄, mientras que los animales del grupo de control se dosificaron de forma similar con filtrados sin células de preparación de CH₄, es decir, sin CH₄. Se tomaron muestras de fluido ruminal a intervalos de dos horas, hasta 12 h después de la dosificación, para la determinación de la concentración de ácido láctico del rumen.

En el segundo ensayo se usó otro grupo de 12 carneros castrados canulados ruminalmente, con un peso vivo medio de 29 kg, sin exposición previa a la alimentación concentrada. Tenían acceso aleatorio a heno *Eragrotis teff* molido y un bloque para lamer de proteínas-minerales. Los corderos se dividieron aleatoriamente en dos grupos de seis animales cada uno, a saber, un grupo de tratamiento y un grupo de control. El primer día del experimento (Día 1), todos los corderos recibieron la siguiente dieta *ad libitum*: maíz, 888; melaza, 69; urea, 17; piedra caliza, 11; fosfato dicálcico, 6; sal, 4; sulfato amónico, 4; mezcla de minerales-vitaminas con monensina, 1 (g/kg DM). El día uno de la alimentación concentrada, cada animal del grupo de tratamiento recibió una dosis de CH₄ intra-ruminal a las 12:00, es decir, 3 h después de la alimentación. Los animales del grupo de control se dosificaron de forma similar con agua. Se obtuvieron muestras del rumen a diversos tiempos el día previo al inicio de la alimentación concentrada (Día - 1) y en el 1^o, 2^o, 3^o y 7^o días de la alimentación concentrada, para la determinación de las concentraciones de ácido láctico en el rumen.

7. Evaluación de cultivo aislado CH₄ en vacas lecheras de alta producción

7.1 Cultivo de consumidor de lactato para el ensayo animal

Un fermentador Braun Biostat B con un volumen de trabajo de 10 litros se transformó en un quimiostato usando una bomba de dosificación Watson-Marlow 505S equipada con una transmisión de 55 rpm para transportar medio estéril desde barriles de acero inoxidable de 50 litros. El volumen de trabajo se mantuvo constante transfiriendo

continuamente el exceso de cultivo por encima del nivel de 10 litros del fermentador a través de un tubo de inmersión y una bomba peristáltica (Watson-Marlow 505S) a un Carboy de polipropileno de 50 litros que se enfrió en un refrigerador de arcón. La velocidad de liberación de esta bomba de recolección se fijó a aproximadamente un 120 % de la bomba de suministro de medio. El exceso de volumen retirado del fermentador consistía en gas anaerobio del espacio superior.

Para concentrar el cultivo se usó un sistema de filtro de flujo tangencial (Millipore Pellicon) equipado con un micrómetro Millipore HVMP 0,45 (15 pies²) y una bomba peristáltica Millipore Masterflex Easy-Load.

El medio usado fue CSL4. Las soluciones de vitaminas, agente reductor, minerales y oligoelementos se esterilizaron por filtración antes de la adición al depósito de medio. Después de la esterilización en autoclave, el depósito se gasificó con gas anaerobio.

El enfoque de la producción fue un tipo de producción escalonada. Se realizaron dos producciones consecutivas, produciendo cada una de ellas suficientes células para el tratamiento del grupo de animales de un día. El número de etapas de concentración se limitó a una por producción, ya que la producción de cada día se recogía en un recipiente de 50 litros. La velocidad de dilución del cultivo fue de 0,4 h⁻¹ y el "tiempo de inactividad" entre lotes fue de 50 minutos. Se inició un ensayo suplementario que consistía en 45 litros antes del primer día de producción, que también sirvió para promover la entrada del cultivo del quimiostato en estado estacionario.

7.2 Animales experimentales

Sesenta vacas lecheras de alta producción se agruparon en bloques de acuerdo con la producción de leche durante la lactancia previa y el peso corporal y posteriormente se asignaron aleatoriamente, dentro de cada bloque, a uno de los siguientes tratamientos: 1) concentrado del 60 % de dieta de control; 2) concentrado del 60 % de dieta de control + CH₄; 3) concentrado del 70 % de dieta de control; 4) concentrado del 70 % de dieta de control + CH₄. A las vacas se les dosificó organismo CH₄ en el parto, 10 días después del parto y 20 días después del parto.

Se supervisaron los siguientes parámetros:

1. ingesta diaria de materia seca;
2. producción diaria de leche;
3. grasa, proteína y lactosa de la leche semanalmente; y
4. peso corporal y evaluación del estado físico mensualmente.

8. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron por análisis de varianza para un diseño de bloques completamente aleatorio usando el programa Genstat 5. Las producciones de leche de la lactancia previa se usaron como covariable y la producción de leche se presentó como valores ajustados a la covariable. Los contrastes se usaron para determinar el significado de la diferencia entre tratamientos como se indica a continuación:

- +CH₄ o -CH₄ (dosificado frente a no dosificado)
- Concentrado del 70 % de dieta de control frente a concentrado del 70 % de dieta de control +CH₄
- Concentrado del 60 % de dieta de control frente a concentrado del 60 % de dieta de control +CH₄

Las diferencias se declararon significativas a P<0,10 y se declararon tendencias a P<0,15 a menos que se indique otra cosa.

9. Efectos de suplemento con *Megasphaera elsdenii* sobre la salud animal y el rendimiento de engorde intensivo

Un grupo homogéneo de 448 novillos castrados Bonsmara (peso vivo inicial medio 215 kg) se asignaron aleatoriamente a ocho tratamientos experimentales en un diseño factorial 2 x 2 x 2, con los factores (1) adición de CH₄ (sí o no); (2) adición de ionóforo (sí o no); y (3) nivel de forraje (alto o bajo). Las dietas de engorde intensivo usadas en el régimen dietético seguido fueron las siguientes:

Composición de ingredientes de dietas experimentales, al final del periodo de adaptación (día 14 hasta el final):

Ingrediente	Inclusión (%, en una base de alimentación)	
	Nivel alto de forraje	Nivel bajo de forraje
Heno <i>Eragrostis</i>	8,0	2,0
Harina de maíz	27,0	30,0
Maíz molido	32,0	35,0
Harina de melaza	12,0	12,0
Grano de cervecería	6,0	6,0
Salvado de trigo	10,0	10,0
Torta de aceite de semilla de algodón	2,0	2,0
Urea	1,0	1,0
Piedra caliza	1,5	1,5
Sal	0,5	0,5

Régimen de adaptación a la dieta seguido tras la llegada, cuando los animales recibían forraje *ad libitum*, hasta que cambiaron a la dieta de engorde intensivo final

Día	Heno adicional	Nivel de forraje (%) en la dieta	
		Alto	Bajo
1 – 2	Ad lib	18	12
3 – 4	Ninguno	18	12
5 – 7	Ninguno	14	8
8 - 10	Ninguno	12	6
11 - 13	Ninguno	10	4
14 hasta final	Ninguno	8	2

5

Composición de nutrientes de las dietas de engorde intensivo finales usadas (% de alimentación):

Nutriente	Nivel alto de forraje	Nivel bajo de forraje
Materia seca	89,6	89,8
Proteína bruta	14,4	13,4
Almidón	33,5	35,9
Fibra NDF	26,9	23,9
Fibra ADF	9,5	8,7
Grasa	4,6	4,8

10 Los animales se mantuvieron en pequeños corrales de engorde intensivo experimentales. Había 7 corrales por tratamiento y 8 animales por corral. Las dietas de engorde intensivo se suministraron una vez al día por la mañana,

a un nivel *ad libitum*. Todos los novillos se procesaron tras la llegada (procedimientos de engorde intensivo convencionales) y se alimentaron sólo con forraje durante unos pocos días hasta que se les dosificó CH4 (tratamiento) o una cantidad similar de agua (controles). Durante esta dosificación, se aplicaron 200 ml de suspensión de CH4 en medio como un solo brebaje oral a cada animal de tratamiento.

5 El cultivo de CH4 se preparó inoculando un lote de 17,5 litros de medio CSL6 estéril (empezando a pH 5,20) con 1000 ml de inóculo nuevo de CH4, bombeado directamente desde el fermentador al recipiente Carboy e incubado a 39 °C durante una noche. El pH del cultivo fue de 6,63 después del cultivo y se mantuvo igual después de 48 h. Los recuentos se realizaron en el cultivo de CH4, después de la incubación. Se usó una bomba peristáltica para transferir la dosificación de 200 ml *per os* al animal en 10 segundos desde el Carboy de 20 litros.

10 **Medio CSL6 como lote de 20 litros para el cultivo de CH4:**

	<u>Medio CSL 6 (Esterilizado: 55 minutos)</u>	<u>17,5 Litros</u>		
	Na-lactato	971,25 g		
	Indigocarmina	17,5 ml		
	Solución con cantidades muy pequeñas de minerales	8,75 ml		
	Solución mineral 5	87,5 ml		
	Peptona	17,5 g		
	Extracto de levadura	17,5 g		
	CSL	598,5 g		
	H ₂ O destilada	10688,2 g		
	KOH 10 N (pre-disuelto en 5 l de H ₂ O)	58,3 ml		
	Esterilizado con filtro y añadido antes de la inoculación			
	Solución de vitamina	35 ml		
	L-cisteína	35 ml		

Se determinó la ingesta de alimento para cada corral (al día/semana) y se determinaron los pesos de los animales individuales (semanalmente/cada dos semanas). Estos valores se usaron para calcular la relación de conversión de alimento (por corral). Los animales se observaron diariamente y se retiró cualquier animal que mostrara signos de acidosis (diarrea, meteorismo espumoso, depresión) y se trató antes de devolverlo de nuevo a su corral respectivo.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron usando el programa *GenStat 5*. Los animales se agruparon por bloques por grupo de peso. Los efectos CH4, ionóforos y nivel de forraje se ensayaron por medio de un diseño factorial 2 x 2 x 2 en un análisis de varianza (ANOVA). Los datos fueron aceptablemente normales con varianzas de tratamiento homogéneas. Las medias de tratamiento se separaron usando la mínima diferencia significativa (LSD) del *ensayo t protegido de Fisher* al nivel del 5 %, siempre que la probabilidad F del ANOVA fuera significativa al 5 %.

10. Identificación de cultivos aislados usando filogenética, basada en secuencias génicas del ARNr 16S

10.1 Cultivos aislados bacterianos y condiciones de cultivo

Los cultivos aislados CH4 y CH7 de *M. elsdenii*, aislados originalmente a partir de vacas lecheras (Wiederhold, 1994) los proporcionaron los inventores. La cepa tipo de *M. elsdenii*, ATCC 25940, se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las cepas se cultivaron en medio SDL como se ha descrito previamente y supuestamente se identificaron como *Megasphaera elsdenii* (Wiederhold, 1994).

10.2 Amplificación y secuenciación de genes de ARN ribosómico 16S

Se extrajo ADN genómico de células bacterianas usando procedimientos convencionales (Ausubel y col. 1988). Los cebadores usados para amplificar los genes de ARNr 16S se seleccionaron a partir de regiones conservadas universalmente en todas las eubacterias (**Tabla 1**). La PCR se realizó usando cebadores FD1 (que cubrían las

posiciones 8 a 26) y R11 (posiciones 1384-1400). Todas las posiciones diana de cebadores usados para la amplificación y secuenciación se refieren al sistema de numeración de *E. coli* (Brosius y col. 1978). La mezcla de reacción de PCR de 100 µl contenía aproximadamente 200 ng de ADN, una concentración 1 µM de cada cebador, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,4) y MgCl 2,5 mM y 2,5 U de Taq polimerasa (Boehringer Mannheim, Alemania). La mezcla se recubrió con parafina líquida para impedir la evaporación. El perfil térmico consistía en 30 ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 94 °C, hibridación a 45 °C durante 2 minutos y posterior extensión a 72 °C durante 3 minutos en un aparato de ciclos térmicos (Hybaid, Reino Unido). La extensión final se realizó a 72 °C durante 6 minutos. La homogeneidad de los amplicones se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y col., 1989). El producto de PCR se escindió del gel y se purificó usando el kit Wizard PCR Preps (Promega, Estados Unidos) como se ha prescrito por el fabricante. La secuenciación directa de los amplicones de PCR de doble cadena y la posterior separación de los productos de la reacción de secuenciación en geles de poliacrilamida se realizaron esencialmente de acuerdo con el protocolo de Dorsch y Stackebrandt (1922). Los cebadores de secuenciación se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Cebadores usados para amplificar y secuencia del gen de ARNr 16S. Las secuencias de cebadores se han publicado previamente (Dorsch y Stackebrandt, 1992; Lane y col., 1985; Stackebrandt y Charfreitag, 1990; Hutson y col., 1993). Una combinación de estos cebadores cubría un total de 1419 nucleótidos del gen de ARNr 16S

Posición del cebador diana ^a Secuencia del cebador (5' a 3')	Posición del cebador diana ^a Secuencia del cebador (5' a 3')	Posición del cebador diana ^a Secuencia del cebador (5' a 3')
<u>Dirección inversa</u> (antisentido)		
R11 (PCR)	1384-1400	CGGTGTGTACAAGGCC
R1193	1174-1192	CGTCATCCCCGCCTTCCTC
R1353	1336-1352	CGATTACTAGCGATTCC
R961/R7	949-963	TCGAATTAACCACA
R5	786-802	CTACCAGGGTATCTAAT
R361/R1	340-355	CTGCTGCCTCCCGTAGG
<u>Dirección directa</u> (con sentido)		
FD1/F1 (PCR)	8-26	AGAGTTTGATCCTGGCTCA
F1353	1336-1352	GGAATCGCTAGTAATCG
F361	340-355	CCTACGGGAGGCAGCAG
F961	949-963	TGTGGTTTAATTCGA

^aTodas las posiciones diana para los cebadores se refieren a los sistemas de numeración de *E. coli* (Brosius y col., 1978).

10.3 Análisis de datos

Las secuencias de ADNr 16S obtenidas se alinearon automáticamente con secuencias obtenidas a partir del Ribosomal Database Project (RDP; Maidak y col., 1996) usando el programa de alineamiento CLUSTALW (Genetics Computer Group, 1991). Las secuencias del perfil se cortaron para estandarizar con respecto al tamaño de las secuencias de cada organismo incluido en el perfil de alineamiento. En el perfil se incluyó un total de 1388 posiciones de secuencias de nucleótidos. En el perfil de alineamiento se incluyeron secuencias publicadas de varios organismos que aparecen en el rumen (**Tabla 2**). Las secuencias ambiguas en el perfil de alineamiento se alinearon manualmente usando el editor de alineamiento Genetics Data Environment (GDE) (Smith 1992). Para deducir relaciones filogenéticas, se usó el programa fastDNAmI (Olsen y col., 1994), que se basa en el algoritmo de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981). Se construyó un árbol filogenético usando el programa Treetool (GDE). *Escherichia coli* y *Acinetobacter calcoaceticus* sirvieron como exogrupos en la construcción de los árboles.

Tabla 2. Organismos incluidos en el perfil de alineamiento usando los programas CLUSTALW. Todas las secuencias se recuperaron del RDP y las bases de datos del Genbank.

<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27780	<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 33317
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 ATCC 1916	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> ATCC 35063
<i>Megasphaera elsdenii</i> ATCC 17752	<i>Methanobacterium formicicum</i> DSM 1312
<i>M. elsdenii</i> ATCC 25940	<i>Methanosarcina barkeri</i> DSM 1538
<i>M. elsdenii</i> CH4	<i>Methanomicrobium mobile</i> ATCC 35094
<i>M. elsdenii</i> CH7	<i>Prevotella ruminicola</i> ATCC 19189
<i>M. cerevisiae</i>	<i>Wolinella succinogenes</i> ATCC 33913
<i>Synergistes jonesii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 33604
<i>Eubacterium cellulosolvens</i> ATCC 43171	<i>Quinella ovalis</i>
<i>Eubacterium uniformis</i> ATCC 35992	<i>Selenomonas ruminantium</i> GA192
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i> ATCC 33142	<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486

RESULTADOS

Aislamientos en auxostato

Aislamiento de bacterias que usan lactato en auxostato

5 Aislamiento 1: El contenido ruminal, obtenido a partir de la vaca 8710, que rellenaba el recipiente de cultivo del fermentador se expuso inmediatamente a medio selectivo estéril nuevo cuando el auxostato se indujo por un aumento de pH. Las velocidades de dilución iniciales estaban en la región de $0,53 \text{ h}^{-1}$ durante las 2 primeras horas a pH 5,30. Durante las dos horas siguientes, la velocidad de dilución aumentó a $0,65 \text{ h}^{-1}$. Para aumentar la especificidad del aislamiento, el pH se redujo a pH 5,0, lo cual dio como resultado una reducción en la velocidad de dilución a $0,37 \text{ h}^{-1}$. El cultivo se continuó durante 24 horas más, después de lo cual sólo pudieron detectarse dos tipos morfológicos en el cultivo de enriquecimiento. La velocidad de dilución se reducía ligeramente según aumentaba el tiempo de cultivo después del periodo inicial de 24 horas, y al final de aislamiento la velocidad de dilución fue sólo de $0,33 \text{ h}^{-1}$.

15 Una muestra del contenido del fermentador se cultivó en estrías en medio de agar, en la vitrina anaerobia, y una sola colonia que contenía un cultivo puro se transfirió a cultivos inclinados de agar y se conservó en nitrógeno líquido, y este cultivo se denominó cultivo aislado CH1.

20 Aislamiento 2: Durante este aislamiento a partir del contenido ruminal de la vaca 8812, se observó una velocidad de dilución de $0,25 \text{ h}^{-1}$ durante las primeras 24 horas y durante el periodo posterior de 24 horas la velocidad de dilución estaba comprendida entre $0,34$ y $0,41 \text{ h}^{-1}$. Después de 48 horas de cultivo, no estaba claro si se había obtenido un cultivo "puro" y el cultivo se continuó durante 24 horas más. La velocidad de dilución durante este periodo fue de $0,41 \text{ h}^{-1}$ y se aisló un cultivo puro a partir del fermentador mediante una colonia de una placa Petri. Este cultivo aislado se denominó Cultivo aislado CH2.

25 Aislamiento 3: La velocidad de dilución durante este periodo de aislamiento se redujo de $0,28$ a $0,21 \text{ h}^{-1}$ durante un periodo de 48 horas. El cultivo aislado obtenido a partir del rumen de la vaca 8708 se denominó Cultivo aislado CH3.

30 Aislamiento 4: Las velocidades de dilución iniciales fueron del orden de $0,38 \text{ h}^{-1}$, pero en 4 horas la velocidad de dilución se redujo a $0,276 \text{ h}^{-1}$ y al final del periodo de 48 horas la dilución era sólo de $0,197 \text{ h}^{-1}$. El cultivo aislado obtenido durante este aislamiento a partir del contenido del rumen de la vaca 8826 se denominó CH4.

Aislamiento 5: Al final del periodo de aislamiento, el organismo dominante fue un formador de esporas y el experimento se terminó.

Aislamiento 6: Durante este aislamiento, la velocidad de dilución se redujo siguiendo el mismo patrón que para los otros aislamientos y la velocidad de dilución final fue sólo de $0,116 \text{ h}^{-1}$. El cultivo aislado se obtuvo a partir del contenido del rumen de vacas de engorde intensivo y se denominó CH6.

Aislamiento 7: El contenido del rumen usado durante este aislamiento se obtuvo a partir de vacas de engorde

intensivo. Las velocidades de dilución se redujeron desde 0,142 a 0,106 h⁻¹, durante las primeras siete horas de aislamiento. El cultivo aislado obtenido se denominó CH7.

Modificación del medio para estudios de quimiostato

5 Se observó una reducción uniforme en las velocidades de dilución durante el aislamiento de los consumidores de lactato, que indicó que la formulación del medio no era óptima. Durante las primeras 24 horas del aislamiento 7, la velocidad de dilución se redujo de 0,142 a 0,106 h⁻¹. Se añadió directamente una dosis pulsátil de 5 ml de fluido ruminal estéril en el fermentador y, después de 4 horas, la velocidad de dilución alcanzó un máximo a 0,408 h⁻¹. Posteriormente, la velocidad de dilución se redujo lentamente a 0,15 h⁻¹. Esta técnica de “pulso y cambio” demostró que el medio era nutricionalmente deficiente.

10 Otro experimento de “pulso y cambio” con 1 ml de solución de vitamina D₃ como resultado un pico de velocidad de dilución de únicamente 0,28 h⁻¹. Sin embargo, un pulso de vitamina D₃ mayor dio como resultado un pico de velocidad de dilución de 0,497 h⁻¹, que fue mayor que el obtenido con el pulso del contenido del rumen. El uso de lactato reflejó los mismos resultados, particularmente, uso del isómero D- y L-lactato respectivo del 22 y 86 % sin vitaminas extra, y con vitaminas extra respectivamente del 68 y 91 %. El medio 1 indicado en la sección de Procedimientos refleja la versión modificada con mayores concentraciones de las vitaminas. Durante otro experimento de “pulso y cambio” se estableció que el extracto de levadura aumentaba el rendimiento celular de los cultivos aislados.

Velocidades de crecimiento de *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940 y cultivos aislados de auxostato frente al pH

20 Se determinaron las velocidades de crecimiento de las bacterias con el pH-auxostato a diversos valores de pH entre 4,5 y 6,5, usando el medio de lactato modificado. Estas velocidades de crecimiento se comprobaron frente a los valores obtenidos durante el cultivo de lotes a los valores de pH específicos y se usó el valor medio.

25 *Megasphaera elsdenii* ATCC 25940, la cepa tipo, mostró un aumento en la velocidad de crecimiento desde el pH 4,5 hasta pH 6,0, seguido por una rápida reducción en la velocidad de crecimiento a pH 6,5 (**Fig. 1**). La máxima velocidad de crecimiento conseguida por ATCC 25940 fue 0,66 h⁻¹, que corresponde a la velocidad de crecimiento indicada de 0,6 h⁻¹ por Therion y col. (11981).

30 Todos los cultivos aislados superaron a ATCC 25940 por lo que respecta a la velocidad de crecimiento máxima, especialmente a valores de pH 5,5 e inferiores (**Fig. 1**). Las máximas velocidades de crecimiento de todos los cultivos aislados alcanzaron un máximo a pH 5,5 con velocidades de crecimiento respectivas (h⁻¹) de 0,66, 0,93, 0,938 y 0,864 para los cultivos aislados CH7, CH6, CH4 y CH3. De todos los cultivos aislados, CH4 resultó ser el más tolerante a ácidos con una velocidad de crecimiento de 0,389 h⁻¹ a pH 4,5, y el organismo con la segunda mejor tolerancia a ácidos, CH6, con una velocidad de crecimiento únicamente de 0,19 h⁻¹ a pH 4,5. Se observó una rápida reducción en la velocidad de crecimiento entre pH 5,5 y 6,0 para tres cultivos aislados, a saber, CH6, CH4 y CH3. El cultivo aislado CH7 sólo tuvo una ligera variación en la velocidad de crecimiento entre pH 5,0 y 6,0, que se parece a ATCC 25940 entre pH 5,5 y 6,5.

35 Velocidades de crecimiento de cultivos aislados de auxostato sobre glucosa

Se determinaron las velocidades de crecimiento de tres cultivos aislados a pH 5,0, 5,5 y 6,0, usando la técnica de crecimiento semicontinuo (**Fig. 2**). Las velocidades de crecimiento fueron sensiblemente menores para los tres cultivos aislados en glucosa en comparación con lactato. El cultivo aislado más prometededor en lactato, particularmente CH4, consiguió una velocidad de crecimiento máxima únicamente de 0,25 h⁻¹ a pH 5,5 en glucosa, en comparación con 0,938 h⁻¹ en lactato. El cultivo aislado CH7 consiguió la máxima velocidad de crecimiento (0,33 h⁻¹) en glucosa a pH 6,0 entre los cultivos aislados.

Conversión de lactato por el cultivo aislado CH4

45 El cultivo aislado CH4 se cultivó a tres velocidades de dilución de quimiostato, a saber, 0,94, 0,83 y 0,75 h⁻¹ en medio con lactato. Durante el estado estacionario, se tomaron muestras y se analizaron con respecto a los ácidos grasos volátiles (AGV) y se determinó el uso de lactato. También se realizó un cultivo discontinuo y se tomaron muestras en la fase estacionaria. También se analizaron muestras del medio estéril con respecto a AGV y lactato. Al aumentar la velocidad de dilución, cambió la producción relativa de ácidos grasos, particularmente a bajas velocidades de dilución se produjeron más butirato y valerato y menos propionato y acetato (**Tabla 3**). A la máxima velocidad de dilución, se produjeron cantidades muy pequeñas de butirato, sin valerato y sólo ligeramente más acetato y propionato. El uso de lactato se redujo como era de esperar, con un aumento en la velocidad de dilución. Durante el cultivo D = 0,75 más del 40 % de lactato se convirtió en AGV y, aunque el uso de lactato era elevado, se gastó una gran proporción de la energía disponible. Cuando se cultivó CH4 de forma discontinua, produjo principalmente acetato y propionato. Las concentraciones de AGV producidas durante el cultivo discontinuo fueron mucho menores de lo esperado y la única explicación sería que CH4 usa los AGV cuando se agota el lactato.

55 **Tabla 3:** Ácidos grasos volátiles producidos por el cultivo aislado CH4 a partir de lactato durante el cultivo en quimiostato a

diversas velocidades de dilución y durante el cultivo discontinuo.

Velocidad de dilución (h ⁻¹)	Ácidos grasos volátiles (mM)				% de lactato usado
	Acético	Propiónico	n-Butírico	n-Valérico	
0,75	7,221	5,779	11,347	6,383	92,66
0,83	10,048	12,293	0,423	0,012	53,54
0,94	8,529	10,517	0,271	0	39,65
Discontinuo	10,659	7,737	0,266	0	97,62

Aislamientos de extensión en placa y exploración

5 Se inocularon más de 800 colonias de nueve muestras de rumen de cuatro vacas lecheras y dos vacas de engorde intensivo en medio líquido IRFL en microtubos. De éstas, 610 produjeron un cambio de color a púrpura en el medio dentro de un periodo de incubación de 16 horas. Diecinueve de los cultivos aislados explorados se eligieron para una caracterización adicional ya que cumplían las especificaciones requeridas.

10 Cuatro de los cultivos aislados seleccionados, AW09; AW10; AW11 y AW12 podían crecer a un pH inicial de 4,5. De los otros quince cultivos aislados, todos crecieron a un pH inicial de 5,0 y aquí hubo una selección adicional, ya que se seleccionaron los cultivos que mostraban características adecuadas, que eran los que más rápido crecían a pH 5,0.

15 Los diecinueve cultivos aislados eran resistentes a los ionóforos monensina y lasalocid a concentraciones de 10 ppm, usaban lactato en presencia de maltosa y glucosa y eran capaces de crecer tanto en glucosa como en maltosa. Estos diecinueve cultivos aislados eran cocos Gram-negativos ($\pm 1,8$ micrómetros) que se producían en parejas o cadenas.

Caracterización fisiológica de los cultivos aislados

20 Todos los cultivos aislados AW usaron los isómeros D- y L-lactato ya que los dos isómeros se usaron de una forma prácticamente completa después de la incubación en medio SDL durante 24 horas. Los resultados indicaron que los cultivos aislados comprendían un grupo bastante uniforme y, por lo tanto, sólo se eligieron ciertos cultivos aislados para una caracterización adicional. Para cinco de los cultivos aislados AW, las velocidades de crecimiento en glucosa a pH 5,8 variaban de 0,38 a 1,05 h⁻¹ con una media de 0,66 h⁻¹ (+/- 0,298). Se descubrió que los cultivos aislados AW ensayados con respecto a la producción de AGV a partir de DL-lactato producían ácido acético, propiónico, n-butírico y n-valérico en la siguiente relación 2 : 1,5 : 1 : 1,3. Algunos de los cultivos aislados AW produjeron cantidades muy pequeñas de ácido metil butírico. Las máximas proporciones de producción de biomasa obtenidas para los nueve cultivos aislados variaban de 0,31 a 0,43 g (l.h)⁻¹. AW15 tuvo la mayor proporción de producción de biomasa y CH₄ y AW01 fueron los siguientes en la sucesión con 0,39 g (l.h)⁻¹. El rendimiento de masa celular seca por gramo de ácido láctico usado variaba de 0,1 a 0,17 para los nueve cultivos aislados.

Supuesta identificación de los cultivos aislados

30 Los cultivos aislados obtenidos se identificaron presuntamente y los que cumplían la tipificación morfológica como cepas de *Megasphaera elsdenii* se usaron para una caracterización adicional.

Ensayos con oveja para evaluar la capacidad del cultivo aislado CH₄ de prevenir la acumulación de ácido láctico ruminal

Los resultados del primer ensayo en oveja se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: La concentración de ácido láctico en fluido ruminal de oveja alimentada con forraje expuesta de forma brusca a concentrados, y que ha recibido dosis intra-ruminales de CH4 (tratamiento) o placebo (control) al mismo tiempo

Tiempo después de dosificación CH4 (h)	Concentración de ácido láctico (g/litro)	
	Tratamiento con CH4	Control
0	< 0,1	<0,1
2	0,3	1,4
6	0,8	3,6
8	0,5	5,2
10	0,4	6,1
12	0,2	5,9

5 Los resultados del segundo ensayo en oveja se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentración de ácido láctico en fluido ruminal de oveja alimentada con forraje que ha cambiado de forma brusca a una dieta concentrada (*ad libitum*) y que ha recibido dosis intra-ruminales de CH4 (tratamiento) o placebo (control) 3 h después de recibir la dieta concentrada

Día de tratamiento		Concentración de ácido láctico ruminal (mMol/litro)			
		Momento del día:	08:00	12:00	15:00
- 1	CH4	1,4	0,7	0,6	0,7
	Control	1,5	0,9	0,5	0,7
1	CH4	0,7	0,5	2,1	2,4
	Control	0,5	0,2	1,5	1,8
2	CH4	2,4	1,0	1,5	1,2
	Control	<u>5,0</u>	<u>13,6</u>	<u>15,2</u>	<u>17,4</u>
3	CH4	1,6	1,0	0,7	1,0
	Control	<u>7,8</u>	<u>4,5</u>	<u>3,5</u>	<u>2,5</u>
7	CH4	1,8	1,6	1,0	1,2
	Control	2,0	1,5	2,0	1,5
14	CH4	1,5	1,5	1,2	1,0
	Control	1,8	2,0	1,2	2,0

10 En los dos ensayos, la dosificación con CH4 condujo a una reducción marcada y significativa ($P < 0,001$ para los dos ensayos) en la concentración de ácido láctico ruminal en comparación con los controles. En los dos ensayos, los animales de control mostraron el aumento rápido esperado en la concentración de ácido láctico ruminal después de la adición brusca de sustrato fácilmente fermentable en el rumen. En comparación, los niveles de ácido láctico ruminal en los animales tratados con CH4 se mantuvo más o menos a los niveles de adición previos a la adición de sustrato. Esto sugirió claramente que el ácido láctico que se estaba produciendo se usaba en gran medida por CH4.

15

Evaluación del cultivo aislado de CH4 en vacas lecheras de alta producción

Los datos de producción más relevantes se presentan en las **Tablas 6 y 7**. Los datos se analizaron por separado para todas las vacas (15/tratamiento) y las vacas de alta producción (10/tratamiento), respectivamente.

Tabla 6: Efecto del organismo CH4 sobre la productividad de vacas lecheras en lactancia desde el parto a 80 días después del parto (todas las vacas).

Parámetros	Tratamiento ¹				Contraste P<		
	1	2	3	4	+CH4 frente a -CH4	1 frente a 2	3 frente a 4
Vacas por tratamiento	15	15	15	15	-	-	-
Ingesta de materia seca kg/d	24,6	24,1	23,1	22,2	0,28	0,59	0,32
Leche (kg/d)	36,4	34,0	33,8	32,2	0,10	0,16	0,34
Grasa (%)	3,27	3,29	3,57	3,23	0,17	0,85	0,03
Proteína (%)	3,10	3,10	3,14	3,07	0,43	0,93	0,23
Peso corporal	662	608	618	612	0,02	0,004	0,73
Puntuación del estado físico	2,80	2,48	2,45	2,28	0,06	0,08	0,36
Tratamiento 1: Dieta de Control, concentrado al 70 % + CH4 Tratamiento 2: Dieta de Control, concentrado al 70 % - CH4 Tratamiento 3: Dieta de Control, concentrado al 60 % + CH4 Tratamiento 4: Dieta de Control, concentrado al 60 % - CH4							

5 **Tabla 7:** Efecto del organismo CH4 sobre la productividad de vacas lecheras en lactancia desde el parto a 80 días después del parto (vacas de alta producción).

Parámetros	Tratamiento				Contraste P<		
	1	2	3	4	+CH4 frente a -CH4	1 frente a 2	3 frente a 4
Vacas por tratamiento	10	10	10	10	-	-	-
Ingesta de materia seca kg/d	24,6	25,4	24,3	22,6	0,44	0,43	0,06
Leche (kg/d)	39,3	35,9	35,2	34,8	0,13	0,06	0,82
Grasa (%)	3,23	3,24	3,56	3,21	0,20	0,91	0,06
Proteína (%)	3,10	3,10	3,15	3,02	0,28	0,93	0,11
Peso corporal	644	597	623	625	0,11	0,02	0,90
Puntuación del estado físico	2,71	2,26	2,34	2,44	0,20	0,02	0,61

Efectos del suplemento con *Megasphaera elsdenii* sobre la salud animal y el rendimiento de engorde intensivo

10 La administración de bacterias CH4 vivas por animal tuvo una media de 2×10^{11} unidades formadoras de colonias por dosis y por animal a lo largo de los ensayos de engorde intensivo. Los resultados más relevantes se presentan en las Tablas 8 a 11. El periodo de las semanas tres a cinco en el engorde intensivo normalmente se considera el más crítico en términos de adaptación a la dieta. Durante las semanas uno y dos la dieta aún tiene un mayor contenido de forraje, que se reduce gradualmente; la ingesta empieza a un nivel comparativamente bajo y se incrementa gradualmente. Sólo desde la semana tres en adelante la dieta está en su nivel mínimo de forraje (y el máximo nivel de concentrado) y las ingestas aumentan rápidamente. Al principio de la semana seis, los animales normalmente se considerarán adaptados a la dieta. Las semanas tres a cinco constituyen realmente el periodo crítico de adaptación de los animales a la dieta altamente concentrada.

15

Tabla 8: Ingesta de alimentos diaria media (kg como material ingerido por animal por día) para el tratamiento con CH4 frente al control (sin añadir CH4), durante diversos periodos en el engorde intensivo.

Periodo de engorde intensivo	Tratamiento		valor de P	e.t.
	Más CH4	Control (sin CH4)		
Semana 1 – 2	7,30	7,15	0,35	0,109
Semana 3 – 5	10,18	10,02	0,30	0,103
Semana 1 – 13	9,64	9,50	0,29	0,092

5 La ingesta de alimento global fue ligeramente (pero no significativamente) mayor para CH4 que para el control. Durante la semana 3 – 5, para los novillos que no recibieron ionóforos, CH4 tuvo una ingesta significativamente mayor ($P < 0,05$) que los controles (10,56 frente a 10,12), mientras que no se observó ningún efecto de CH4 para los animales que recibieron ionóforo. También durante este periodo, para los novillos con las dietas de bajo forraje, CH4 tendía ($P < 0,015$) a tener mayores ingestas que los controles (10,14 frente a 9,80), mientras que no se observó ningún efecto de CH4 para los animales en las dietas de alto contenido de forraje.

10 **Tabla 9:** Aumento diario medio (kg por animal y por día) para el tratamiento con CH4 frente al control (sin CH4 añadido), durante diversos periodos en el engorde intensivo.

Periodo de engorde intensivo	Tratamiento		valor de P	e.t.
	Más CH4	Control (sin CH4)		
Semana 1 - 2	1,76	1,81	0,51	0,053
Semana 3 - 5	2,09	1,97	0,04	0,040
Semana 1 - 13	2,19	2,20	0,67	0,019

15 El aumento medio diario (AMD) global durante el periodo crítico de la semana 3 – 5 fue significativamente ($P = 0,04$) mayor para CH4 que para los tratamientos de control. Durante la semana 1 – 2 para todos los animales que no recibieron CH4, el tratamiento de bajo forraje tuvo un AMD significativamente menor ($P < 0,05$) que el tratamiento de alto forraje (1,61 frente a 2,02). Sin embargo, para los animales que recibieron CH4, AMD no fue significativamente menor en las dietas de bajo forraje en comparación con las dietas de alto forraje (1,70 frente a 1,83). Durante la semana 3 – 5, para los animales que no recibieron un ionóforo, CH4 tuvo un AMD significativamente mayor ($P < 0,05$) que los animales de control (2,15 frente a 1,96).

20 **Tabla 10:** Relación de conversión de alimento (kg de alimento por kg de aumento) para el tratamiento con CH4 frente al control (sin CH4 añadido), durante diversos periodos en el engorde intensivo.

Periodo de engorde intensivo	Tratamiento		valor de P	e.t.
	Más CH4	Control (sin CH4)		
Semana 1 - 2	4,25	4,12	0,43	0,111
Semana 3 - 5	4,89	5,14	0,04	0,081
Semana 1 - 13	5,06	5,02	0,35	0,027

25 En general, los animales tratados con CH4 tuvieron una mejora significativa ($P = 0,04$) de aproximadamente un 5 % en la relación de conversión de alimento (RCA) con respecto a los animales de control durante la semana 3 – 5. Durante la semana 1 – 2 para todos los animales que no recibieron CH4, el tratamiento de bajo forraje tuvo una RCA significativamente mayor ($P = 0,06$) (menos deseable) que el tratamiento de alto forraje (4,42 frente a 3,83). Sin embargo, para los animales que recibieron CH4, la RCA no fue significativamente mayor (menos deseable) en la dieta de bajo forraje en comparación con las dietas de alto forraje (4,24 frente a 4,25).

Tabla 11: Número de veces (incluyendo múltiples retiradas del mismo animal) y número de animales (las múltiples retiradas del mismo animal se cuentan sólo como una) que se retiraron los animales y se trataron para la acidosis y el meteorismo espumoso.

		Tratamiento		
		+ CH4	Control (-CH4)	TOTAL:
Número total de retiradas (incidente)	Bajo forraje	6	21	27
	Alto nivel de forraje	6	4	10
	TOTAL:	12	25	37
Número total de animales retirados	Bajo nivel de forraje	4	15	19
	Alto nivel de forraje	5	2	7
	TOTAL:	9	17	26

- 5 Para los tratamientos con CH4, sólo la mitad de los animales sufrieron síntomas de acidosis (una o más veces) en comparación con los controles. Se observó la misma tendencia cuando se consideró el número total de incidentes de acidosis. También está claro que la acidosis fue mucho más prevalente en la dieta de bajo forraje y que el tratamiento con CH4 aliviaba el problema en la dieta de bajo forraje.

Identificación de cultivos aislados usando filogenética, basándose en las secuencias génicas de ARNr 16S

- 10 Los resultados de secuenciación comparativa mostraron que los cultivos aislados de los presentes solicitantes, que son representativos de un grupo más homogéneo fenotípicamente, están entre el 97 y el 99 % de similitud (**Tabla 12**). La **Tabla 13** indica posiciones de nucleótidos indicadores adecuadas para distinguir los dos cultivos aislados de *Megasphaera elsdenii* recientes y las cepas ATCC entre sí. Las inserciones y deleciones representaban un 22 % de las diferencias de nucleótidos entre las cuatro cepas. Las principales diferencias de secuencias de nucleótidos entre las cepas se producen en las posiciones de nucleótidos 529-536 y 1105-1120 (**Tabla 13**). La alta similitud de secuencia presentada entre las diferentes cepas de *M. elsdenii* también es coherente con sus características fenotípicas similares (Wiederhold, 1994), lo cual se refleja además por su estrecho agrupamiento filogenético. Las cepas de la especie *M. elsdenii* comparten sólo del 91 al 92 % de similitud de secuencia con *M. cerevisiae*, y las dos especies forman grupos distintos en el árbol filogenético. El grupo de *M. elsdenii* se bifurca en dos grupos monofiléticos que evolucionaron desde la misma unidad taxonómica ancestral (ATU). Sin embargo, la ATU a partir de la cual evolucionó *M. cerevisiae*, precede a la unidad a partir de la cual evolucionó el grupo *M. elsdenii*. Las cortas longitudes de ramificación entre cepas de *M. elsdenii* (OTU) y sus ATU respectivas también indican que han evolucionado más recientemente que la *M. cerevisiae* ramificada más profundamente.

- 25 **Tabla 12:** Matriz de similitud de secuencia de secuencias de ADNr 16S de *M. elsdenii* y *M. cerevisiae*. Los valores de similitud de secuencia se basan en una comparación de un total de 1388 posiciones de nucleótidos alineadas de forma no ambigua. El % G+C se refiere únicamente a la secuencia de ADNr 16S alineada respectiva.

	ATCC 17752	ATCC25940	CH7	CH4	% G+C
<i>M. cerevisiae</i>	92,0	92,0	91,5	91,5	54,3
ATCC 25940	99,0		98,5	98,1	54,4
CH4	98,2	98,1	99,0		54,9
CH7	97,7				54,8
ATCC 17752					53,1

Tabla 13: Características de secuencia que definen diferentes cultivos aislados y cepas de *M. elsdenii*

Posición ^a	ATCC 25940 ^b	Nucleótidos		ATCC 17752
		CH4	CH7	
87	G	G	A	G
105	C	T	C	T
170	T	C	C	T
221	T	C	C	T
241	G	A	A	G
283	A	G	G	A
418	A	*	*	*
529-530	CG	*	*	CG
533-536	CG**	CGAC	CGAC	GC**
539	T	C	C	T
550-552	TAC	CGT	CGT	TAT
556	G	A	A	G
711	G	G	G	C
718	*	*	*	G
850	A	A	G	A
1084	A	G	A	A
1105-1108	TGGA	AGGG	AGGG	TGGA
1117-1120	TCCA	CCCT	CCCT	TCCA
1290	A	*	A	*
1297-1300	AAGT	CGGC	AAGT	CGGC
1396	A	C	A	A
1425	A	A	G	A
1437	G	A	G	G
1492	T	C	C	T

^a Sistema de numeración de *E. coli* (Brosius y col., 1978). ^b Denota la cepa tipo. Un asterisco indica donde se introdujo un hueco durante el alineamiento como resultado de la aparición de una delección o inserción de nucleótido en cualquier posición de las secuencias de los cultivos aislados y cepas respectivas.

5 Se usó el procedimiento de máxima verosimilitud, que implica encontrar un árbol que proporcione la mayor probabilidad de producir los datos de secuencia observados (Felsenstein, 1981), para deducir un árbol filogenético a partir de las secuencias incluidas en el perfil de alineamiento (**Fig. 3**). Este procedimiento tiene ventajas con respecto a los procedimientos de parsimonia tradicionales, que podrían conducir a la deducción de árboles erróneos si diferentes linajes evolucionaran en tasas desiguales, ya que permite que las tasas evolutivas difieran entre diferentes linajes (Felsenstein, 1981). Como la topología de árbol también se ve afectada por el número de organismos usados y la selección de los exogrupos (Stackebrandt y Ludwig, 1994; Stackebrandt y Rainey, 1995), se incluyeron en un perfil de alineamiento varios organismos aparentemente relacionados y aparentemente no relacionados que aparecen en el rumen. Esto posteriormente se usó para construir el árbol. Aunque el árbol

10

filogenético se dedujo a partir de secuencias génicas de ARNr 16S sólo casi completas (92 %), lo cual podría reducir la resolución entre organismos muy relacionados (Utaker y col., 1995; Li y Graur, 1991), se ha mostrado que las topologías generales de árboles derivados de secuencias completas o parciales están generalmente de acuerdo entre sí (Van Camp y col., 1993, Vandamme y col., 1996).

5 Vandamme y col. (1996) propusieron que diferentes cultivos aislados deberían considerarse miembros de la misma especie si comparten más del 97 % de homología de secuencia de ARNr, muestran uniformidad fenotípica y presentan un grado significativo de hibridación ADN:ADN. Aunque la relación entre la similitud de ADN y la homología de secuencia de ARNr 16S entre los organismos es todo menos lineal, Fox y col. (1992) propusieron que una identidad de secuencia de ARNr 16S eficaz implicaría que dos organismos son miembros de la misma especie, ya que se validaría casi de forma segura por la hibridación ADN:ADN. Aunque los datos de secuencia de ARNr 16S solos pueden no ser suficientes en todos los casos para definir una especie, son extremadamente útiles para determinar a qué especie probablemente pertenece una cepa, una vez que la especie relevante está representada en una base de datos de secuencia de ARNr 16S. Las cepas con secuencias de ARNr 16S casi idénticas se asignarían a la misma “superespecie de ARNr” o “complejo de especie de ARNr”. De esta manera, sería apropiado asignar los cultivos aislados CH4 y CH7, presuntamente identificados fenotípicamente como cepas de *M. elsdenii*, al mismo complejo de especie de ARNr, que incluiría las cepas de referencia ATCC 25940, la cepa tipo de la especie, y ATCC 17752. Como las relaciones filogenéticas de los cultivos aislados respectivos son además coherentes con sus características fenotípicas, estos cultivos aislados pueden considerarse cepas de la especie *Megasphaera elsdenii*. El hecho de que *M. cerevisiae* y *M. elsdenii* compartan sólo un 92 % de homología de secuencia de ARNr 16S, confirma, junto con los datos genotípicos y fenotípicos, la división de género en dos especies bien separadas.

De las bacterias del rumen incluidas en este estudio, las que parecen relacionadas más estrechamente con el grupo *Megasphaera* son *Selenomonas ruminantium* y *Quinella ovalis*. La aparente relación filogenética entre *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* es coherente con algunas características fenotípicas y genotípicas que comparten las dos especies, tales como un contenido de G+C en el ADN similar (53-54 %), naturaleza anaerobia, metabolismo quimioorganotrófico y uso de una serie similar de sustratos (Stackebrandt y col., 1985; Stewart y Bryant, 1988; Haikara, 1992). El trabajo de Stackebrandt y col. (1985), que hace uso de la técnica de catalogación de oligonucleótidos para la deducción filogenética entre las especies, confirma esta relación filogenética. *Selenomonas ruminantium*, por otra parte, también está muy relacionada con *Quinella ovalis* relativamente desconocida, un organismo que prolifera en el rumen cuando se suministran al animal dietas ricas en azúcares. Estos organismos, aunque aún no están establecidos en cultivo, comparten algunas características fisiológicas con las grandes *Selenomonas* encontradas en oveja (Stewart y Bryant, 1988). Como era de esperar, los parientes más lejanos de *Megasphaera* que aparecen en el rumen son los contenidos en el grupo metanógeno arcaico, cuyos miembros se cree que han aparecido hace aproximadamente 600 a 800 millones de años (van Soest, 1994; Woese, 1987). Las tasas evolutivas de estos organismos también son más lentas que las del grupo *Bacteria*, y la primitividad del grupo se refleja claramente por el agrupamiento metanógeno ramificado profundamente.

La reciente divergencia de las diferentes cepas de *M. elsdenii* posiblemente podría atribuirse a un refinamiento de su fenotipo para adaptarse a las condiciones altamente selectivas del rumen. De acuerdo con Woese (1987), la evolución del fenotipo de un organismo es un proceso durante el cual se obtienen rasgos nuevos o más eficaces para sobrevivir en su nicho particular. El refinamiento daría como resultado que el organismo fuera metabólicamente versátil, como ocurre con *Megasphaera*. Por otra parte, los metanógenos de evolución más lenta son metabólicamente monótonos en comparación.

Este estudio ha demostrado la idoneidad de la secuenciación del ARNr 16S para distinguir entre cepas muy relacionadas de la especie *M. elsdenii*. Además, proporcionó un marco filogenético para la identificación de cepas aisladas recientemente que se han caracterizado fenotípicamente. El marco tendría un valor particular para servir como base para el diseño de especies y sondas específicas de cepa destinadas a estudios ecológicos del rumen.

Conclusiones

Aislamiento

La incorporación de púrpura de bromocresol a medio IRFL para facilitar la detección de bacterias que usan lactato resultó ser satisfactoria en el caso de los consumidores de lactato de crecimiento más rápido, que eran de interés primordial en este estudio. En las primeras fases de incubación, estas bacterias producían zonas púrpuras, concéntricas con las colonias, que contrastaban claramente con el fondo amarillento del medio de agar. Sin embargo, tras una incubación prolongada, el gradiente de pH que rodeaba a las colonias se disipaba debido a la difusión de iones y el fondo entero se volvía púrpura. Entonces se volvió difícil la diferenciación entre colonias de consumidores de lactato de crecimiento más lento y las de organismos que crecían en otras fuentes de carbono presentes en el suplemento de fluido ruminal.

M. elsdenii no es la especie consumidora de lactato dominante en animales con dietas altamente concentradas (Mackie y col., 1978; Mackie y Gilchrist, 1979; Mackie y col., 1984; van Gylswyk, 1990), sino que hay varias razones por las que puedan haber predominado en los procedimientos de selección y exploración.

Algunas de las colonias exploradas consistían en selenomonas y otros tipos morfológicos. La mayoría de estas colonias no se eligieron ya que no había una indicación positiva de que el lactato pudiera usarse en presencia de azúcares solubles. Russell y Baldwin (1978) mostraron que *M. elsdenii* B159 usaba glucosa, maltosa y lactato, pero no sacarosa simultáneamente en un medio multisustrato. Marounek y col. (1989) mostraron que para cuatro cepas de *M. elsdenii*, el lactato se usaba más rápidamente que la glucosa en medio con las dos fuentes de carbono.

Otros laboratorios, que han estudiado la posibilidad de inocular en rumiantes con dietas altamente concentradas organismos que usan lactato para prevenir una acumulación de lactato, también han trabajado con cepas de *M. elsdenii* (Das, 1979; Leedle y col., 1991; Robinson y col., 1992; Kung y Hession, 1995; Wiryawan y Brooker, 1995). No fue posible comparar las velocidades de crecimiento de los cultivos aislados AW y CH con cepas de la bibliografía para determinar si tenían velocidades de crecimiento más rápidas y si eran más tolerantes a ácidos, ya que no se disponía de resultados en la bibliografía. Sin embargo, los cultivos aislados AW y CH pueden compararse con la cepa tipo, *M. elsdenii* ATCC 25940.

Para los cultivos aislados AW, el intervalo de los valores de pH a los que se determinó el crecimiento no era suficiente para determinar el intervalo de pH para los cultivos aislados o el pH óptimo para el crecimiento. Sin embargo, puede suponerse que el óptimo estaría por encima de pH 5,7 y el pH menor estaría entre pH 4,5 y pH 4,9 para todos excepto cuatro de los cultivos aislados, ya que no había crecimiento en placas de IRFL a pH 4,5. Esto está de acuerdo con el trabajo realizado sobre la cepa tipo de *M. elsdenii* ATCC 25940. El intervalo de pH para la cepa tipo de *M. elsdenii* ATCC 25940 es pH 4,6 a 7,8 con el óptimo para el crecimiento a pH 6,05 (Therion y col. 1982).

Para los cultivos aislados CH, el pH óptimo para el crecimiento está comprendido entre pH 5 y 6. En el intervalo de valores de pH ensayados, las máximas velocidades de crecimiento se encontraron a pH 5,5. Las dos series de cultivos aislados tuvieron mayores velocidades de crecimiento en medio SDL que la cepa tipo. Las velocidades de crecimiento obtenidas para *M. elsdenii* ATCC 25940 en medio SDL son comparables a las obtenidas por trabajadores previos sobre medio con lactato (Therion y col. 1982).

Las velocidades de crecimiento de los cultivos aislados en lactato fueron mayores que en glucosa y maltosa. Esto está de acuerdo con un estudio previo en *M. elsdenii* ATCC 25940 en el que se observó que las velocidades de crecimiento en medio con lactato entre pH 5,0 y pH 6,5 eran mayores que en medio con glucosa (Therion y col. 1982). Fuera de este intervalo de pH, las velocidades de crecimiento en glucosa eran mayores. Un estudio sobre la preferencia de sustrato en bacterias del rumen indicó que el crecimiento de *M. elsdenii* B159 en lactato era más lento que en glucosa y maltosa, sin embargo el pH del medio en el estudio estaba por encima de pH 6,5, estando entre 6,75 y 6,9 (Russell y Baldwin, 1978).

Se ha determinado la composición de los productos finales de la fermentación en medio con lactato para cuatro cepas de *M. elsdenii*, incluyendo la cepa tipo LC1 o ATCC 25940 (Marounek y col., 1989). Estos resultados mostraron una variabilidad de una cepa a otra en las proporciones de ácidos grasos formados. Tres de las cepas produjeron una pequeña cantidad o no produjeron ácido valérico, mientras que el 22 % en moles de los productos finales de *M. elsdenii* L8 fue ácido valérico (Marounek y col., 1989). Los nueve cultivos aislados AW ensayados en el presente estudio no presentaron tanta variabilidad de una cepa a otra como ocurrió en las cepas ensayadas por Marounek y col., (1989), pero son similares a *M. elsdenii* L8, que se aisló a partir del rumen de un ternero que se alimentaba de leche, ya que se producía ácido valérico. Sin embargo, CH4 produjo los mismos productos finales de fermentación que la cepa tipo.

Desde el punto de vista de la máxima tasa de producción de biomasa en medio SDL, la cepa AW15 sería el organismo de elección para la producción a mayor escala de células para experimentos animales, siendo CH4 y AW01 los siguientes en la lista. El tiempo necesario para producir 100 g de masa seca de células en medio SDL en un quimiostato con un volumen de trabajo de 5 l sería 1,9 días para AW15 y 2,1 días para CH4 y AW01.

Las velocidades de crecimiento de los cultivos aislados seleccionados en lactato son elevadas en comparación con la cepa tipo de *M. elsdenii*. Los cultivos aislados son tolerantes a ácidos y pueden crecer a valores de pH por debajo de 5,0. Son resistentes a ionóforos, comúnmente añadidos a dietas de engorde intensivo, y pueden usar los dos isómeros de ácido láctico incluso en presencia de glucosa y maltosa. Los productos finales de fermentación a partir de lactato son AGV, que son una fuente energía importante para el rumiante. La producción de propionato es especialmente importante en la industria de engorde intensivo, ya que el propionato es la fuente principal de glucosa para los tejidos del rumiante. Los cultivos aislados, por lo tanto, tienen las características necesarias para que un producto eficaz combata la acidosis láctica en rumiantes.

El cultivo de los consumidores de lactato fue satisfactorio usando un medio que no contenía ningún fluido ruminal. La única modificación del medio original fue el aumento en el contenido de vitaminas y la adición de extractos de levadura al medio. Las bacterias sobrevivían notablemente bien en este medio a 4 °C hasta 20 días, cuando se usaban como cultivos de trabajo.

La técnica de usar un pH-auxostato para el enriquecimiento de bacterias del rumen que usan lactato con una combinación predeterminada de atributos bioquímicos/fisiológicos, que haría que fueran potencialmente adecuadas

para prevenir y combatir la acidosis láctica en animales de engorde intensivo, fue muy satisfactoria. En la mayoría de los casos se estableció una población morfológicamente homogénea, de crecimiento rápido, en el fermentador en los dos días posteriores al inicio de un ensayo. Los ensayos posteriores en los cultivos que se aislaron a partir del contenido del fermentador por cultivo en placa, confirmaron que los cultivos poseían la combinación de características deseada.

La presunta identificación de los cultivos aislados a partir de los enriquecimientos mostró que todos excepto uno pertenecían a la especie *Megasphaera elsdenii*.

Tabla 14: Una comparación entre la técnica de aislamiento en pH-auxostato y una técnica de exploración convencional de extensión en placa.

Parámetro	Extensión en placa convencional	Auxostato
Tiempo transcurrido (días)	90	9
Horas/hombre empleadas	180	7
Muestra: carga bacteriana (ufc)	12×10^{10}	14×10^{12}
Velocidad de crecimiento específica máxima (h^{-1})	0,91	0,90
Rendimiento de biomasa ($g.l^{-1}$)	0,60	0,59
Tasa de producción de biomasa $g(l.h)^{-1}$	0,39	0,39

Como los cultivos aislados se comportaron mejor que ATCC 25940 a valores de pH inferiores a 6,0, serían más adecuados para el pH ruminal encontrado en los animales de engorde intensivo, que normalmente está por debajo de pH 6,0. Además, CH4 resultó ser el cultivo aislado más adecuado para la experimentación de ensayo en animales de engorde intensivo.

El cultivo de lactato usando cultivos aislados en glucosa no resultó ser una propuesta debido a las lentas velocidades de crecimiento obtenidas en comparación con las velocidades de crecimiento obtenidas con lactato.

Las treinta vacas que se dosificaron con el organismo CH4 produjeron significativamente más leche ($P=0,10$), tenían un peso corporal medio mayor ($P=0,02$) y una mayor puntuación de estado físico ($P=0,06$). El porcentaje de grasa de la leche de las vacas que recibieron la dieta concentrada del 60 % + CH4 también aumentó significativamente (3,97 % frente a 3,23 %).

Ensayos con animales productores de leche

La ingesta de materia seca no difirió, pero la producción de leche aumentó significativamente en 3,4 kg/día desde 35,9 a 39,3 kg/día ($P=0,06$) cuando las vacas se alimentaron con la dieta concentrada del 70 % y se dosificaron con el organismo CH4. La producción de leche tendía a aumentar ($P=0,13$) cuando todas las vacas dosificadas se compararon con vacas no dosificadas. El peso corporal y la puntuación del estado físico aumentaron ($P=0,02$) cuando las vacas de alta producción que recibían la dieta de alto concentrado se dosificaron con organismo CH4. La dosificación de vacas que recibieron la dieta concentrada del 60 % dio como resultado un aumento significativo en el porcentaje de grasa de la leche ($P=0,06$) con una tendencia a una mayor proteína de la leche ($P=0,11$). Los componentes de la leche juegan un papel importante en los esquemas de pago de la leche actuales.

La dosificación de organismo CH4 a las vacas aumentó significativamente la producción de leche y afectó positivamente a la composición de la leche, el peso corporal y la puntuación del estado físico. Las ingestas de materia seca no se vieron afectadas; por lo tanto, los resultados sugieren que la dosificación de organismo CH4 a las vacas provocó un entorno en el rumen más favorable, que dio como resultado un mejor uso de los nutrientes.

Ensayos en animales de engorde intensivo

La mejora significativa en el aumento medio diario (AMD) y la relación de conversión de alimento (RCA) durante el periodo crítico en engorde intensivo (semana 3 – 5), así como la reducción global de las alteraciones digestivas, para los animales tratados con CH4 en comparación con los controles, muestra que el tratamiento de los animales de engorde intensivo con CH4 puede ser eficaz de las siguientes formas:

- Ayudaba a la adaptación de las dietas de forraje a las dietas concentradas, como se deduce en este experimento. CH4 también aliviaba el mal comportamiento de la dieta de bajo contenido de forraje en comparación con la dieta de alto contenido de forraje durante las primeras etapas de adaptación.
- El procedimiento de aplicación usado aquí para CH4 fue eficaz para permitir su expresión como se pretendía.

- El uso de CH4 era eficaz para prevenir la acidosis, como se demuestra directamente por los menos casos observados de acidosis e indirectamente por el mayor rendimiento durante la fase crítica de engorde intensivo en la que es más probable que se produzca la acidosis. Todo esto se observó con dietas y regímenes dietéticos con un riesgo excepcionalmente alto de acidosis (especialmente en las primeras fases de engorde intensivo), y era más pronunciado cuando no se usaba ionóforo.
- CH4 puede usarse como agente veterinario para ayudar en la prevención y/o tratamiento de la acidosis, como se demuestra por la rápida reducción en los casos de acidosis para CH4 en comparación con los controles.
- CH4 puede usarse para mejorar el rendimiento de engorde intensivo incluyendo la velocidad de crecimiento (y como consecuencia, para reducir el tiempo necesario para el acabado) y la eficacia de conversión de alimentos.
- CH4 puede usarse para permitir la alimentación con dietas más concentradas, es decir, el uso de menos forraje, y para aumentar la velocidad de cambio desde una dieta de alto contenido de forraje a dietas más concentradas, es decir, también el uso de menos forraje. Esto se confirma adicionalmente por las observaciones, durante las primeras fases de engorde intensivo, de que el efecto negativo de las dietas de bajo forraje, en comparación con las dietas de alto forraje, se aliviaba en gran medida cuando se añadía CH4.

Los solicitantes han descubierto además que, en comparación con las cepas conocidas del *M. elsdenii*, la cepa CH4 de *M. elsdenii* es:

- altamente activa y está adaptada a la proliferación en el rumen de animales con dietas altamente concentradas;
 - capaz de proliferar a valores de pH relativamente bajos por debajo de pH 5,0 y tan bajos como de 4,5, caracterizados como acidosis aguda;
 - resistente a antibióticos ionóforos añadidos comúnmente a las dietas de engorde intensivo; y
 - capaces de usar preferentemente lactato como fuente de carbono incluso en presencia de carbohidratos solubles tales como glucosa y maltosa.
- Otras ventajas de esta cepa son que:
- tiene una velocidad de crecimiento relativamente elevada, es decir, mayor de $0,938 \text{ h}^{-1}$;
 - tiene la capacidad de crecer en azúcares reductores así como en lactato;
 - tiene una tasa de producción de biomasa relativamente alta, es decir, mayor de $0,39 \text{ g (l.h)}^{-1}$;
 - es resistente a ionóforos;
 - produce predominantemente acetato y no predominantemente propionato y butirato; y
 - tiene una secuencia de ARNr 16S única y, por lo tanto, es una nueva cepa.

Los solicitantes han descubierto además que los animales expuestos a maltosa, suministrada directamente en el rumen, o cambiada bruscamente desde una dieta de forraje a una dieta altamente concentrada, no produjeron una acumulación medible de lactato en el rumen cuando se inocularon con CH4.

- Además, las vacas lecheras de alta producción inoculadas con CH4 tienen una producción de leche de 2,4 al 3,2 l mayor que los animales de control no inoculados con CH4. La puntuación del estado físico así como el peso corporal de las vacas inoculadas fueron mayores, de una forma estadísticamente significativa, que en los animales de control.

- Se apreciará que son posibles variaciones en los detalles con un microorganismo de acuerdo con la invención y sus usos sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cultivo bacteriano biológicamente puro de *M. elsdenii* que tiene una secuencia de ARN ribosómico 16S que presenta al menos un 97,0 % de similitud con una secuencia de ARN ribosómico 16S de la cepa de *M. elsdenii* depositada en NCIMB, Aberdeen, Scotland, RU, con el número NCIMB 41125; y una velocidad de crecimiento de al menos 0,938 h⁻¹.
2. El cultivo bacteriano biológicamente puro de la cepa de *M. elsdenii* depositada en NCIMB, Aberdeen, Scotland, RU, con el número NCIMB 41125.
- 10 3. El cultivo bacteriano biológicamente puro de *M. elsdenii* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado además por su capacidad de usar lactato a una tasa comprendida entre el 39,65 % y el 97,62 %, incluso en presencia de azúcares.
4. El cultivo bacteriano biológicamente puro de *M. elsdenii* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además por su resistencia frente a ionóforos.
5. El cultivo bacteriano biológicamente puro de *M. elsdenii* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado además por su capacidad de producir predominantemente acetato.
- 15 6. El cultivo bacteriano biológicamente puro de *M. elsdenii* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado además por su capacidad de proliferar a valores de pH de sólo 4,5.
7. Una composición para facilitar la adaptación de rumiantes desde una dieta basada en forraje a una dieta basada en un concentrado de alta energía, consistiendo la composición esencialmente en un cultivo bacteriano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 8. Un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso para facilitar la adaptación de rumiantes desde una dieta basada en forraje a una dieta basada en un concentrado de alta energía.
9. Uso de un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un medicamento para facilitar la adaptación de rumiantes desde una dieta basada en forraje a una dieta basada en un concentrado de alta energía.
- 25 10. Un aditivo alimentario para rumiantes que comprende un vehículo y una cantidad eficaz de un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. El aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el cultivo se encuentra en un recipiente anaerobio.
- 30 12. Un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de la acidosis láctica ruminal, y en la prevención de una cualquiera o más de las siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos.
- 35 13. Uso de un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un medicamento para tratar la acidosis láctica ruminal y para prevenir una cualquiera o más de las siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos.
- 40 14. Un agente veterinario para el tratamiento de la acidosis láctica ruminal y la prevención de una cualquiera o más de las siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos, que comprende una cantidad eficaz de un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 15. Una preparación para el tratamiento de la acidosis láctica ruminal y la prevención de una cualquiera o más de las siguientes, a saber, acidosis láctica ruminal, rumenitis, laminitis inducida por acidosis láctica ruminal, meteorismo espumoso inducido por acidosis láctica ruminal y abscesos hepáticos en rumiantes, que comprende un inóculo de un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y un medio de crecimiento anaerobio estéril separado, disponiéndose los componentes de la preparación en cámaras separadas de un recipiente anaerobio que se pueden conectar entre sí de forma anaerobia, para inocular así de forma anaerobia el medio de crecimiento con el cultivo.
- 50 16. Un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso para conseguir una o más de las siguientes mejoras en rumiantes, a saber, mayor producción de leche; mayor rendimiento de forraje engorde intensivo; mayor velocidad de crecimiento; reducción en el tiempo de acabado; menor morbilidad y mortalidad digestiva; menor incidencia de acidosis láctica y enfermedades relacionadas; mayor eficacia de conversión de los alimentos; reducción en el contenido de forraje en los piensos; y capacidad de alimentarse con dietas relativamente más concentradas.

17. Uso de un cultivo bacteriano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un medicamento para conseguir una o más de las siguientes mejoras en rumiantes, a saber, mayor producción de leche; mayor rendimiento de engorde intensivo; mayor velocidad de crecimiento; reducción en el tiempo de acabado; menor morbilidad y mortalidad digestiva; menor incidencia de acidosis láctica y enfermedades relacionadas; mayor eficacia de conversión de alimentos; reducción en el contenido de forraje en los piensos; y capacidad de alimentarse con dietas relativamente más concentradas.
18. Un procedimiento para aislar un cultivo biológicamente puro de *M. elsdenii* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que incluye las etapas de obtener una muestra de fluidos ruminales y cultivar la muestra en un medio de crecimiento preseleccionado, en el que el medio de crecimiento preseleccionado se selecciona del grupo que consiste en medio sin fluido ruminal semidefinido, medio con lactato de fluido ruminal incubado (IRFL), medio SDL, medio SDG, medio SDM, medio CSL 4 y medio CSL 6; estando caracterizado el procedimiento porque se preseleccionan una pluralidad de parámetros para favorecer a *M. elsdenii* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en detrimento de otros microorganismos del rumen; en el que los parámetros se seleccionan entre:
- (i) constituyentes del medio de crecimiento, en el que los constituyentes del medio de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en dH₂O, Na-lactato, agar, sodio D, solución de L-lactato, solución de púrpura de bromocresol, peptona, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂, vitaminas (incluyendo clorhidrato de piridoxal, piridoxamina, riboflavina, cloruro de tiamina, nicotinamida, Ca-D-pantotenato, ácido aminobenzoico, biotina, ácido fólico y cianocobalamina), solución de oligoelementos, solución de minerales, Na₂S, cisteína, antiespumante, monensina, maltosa, glucosa, indigocarmina, extracto de levadura, CSL, KOH y L-cisteína;
 - (ii) pH, en el que el pH se selecciona entre 4,5 y 6,5;
 - (iii) temperatura, en el que la temperatura se selecciona entre 4 °C y 50 °C;
 - (iv) agentes antimicrobianos, en el que los agentes antimicrobianos se seleccionan del grupo que consiste en lasalosid y monensina;
 - (v) entorno gaseoso, en el que el entorno gaseoso es CO₂;
 - (vi) potencial redox; y
 - (vii) ausencia de nutrientes y organismos provocadores, en el que el organismo provocador es un organismo ruminal provocador seleccionado entre una población total del rumen de un animal adaptado a dietas de alta energía.

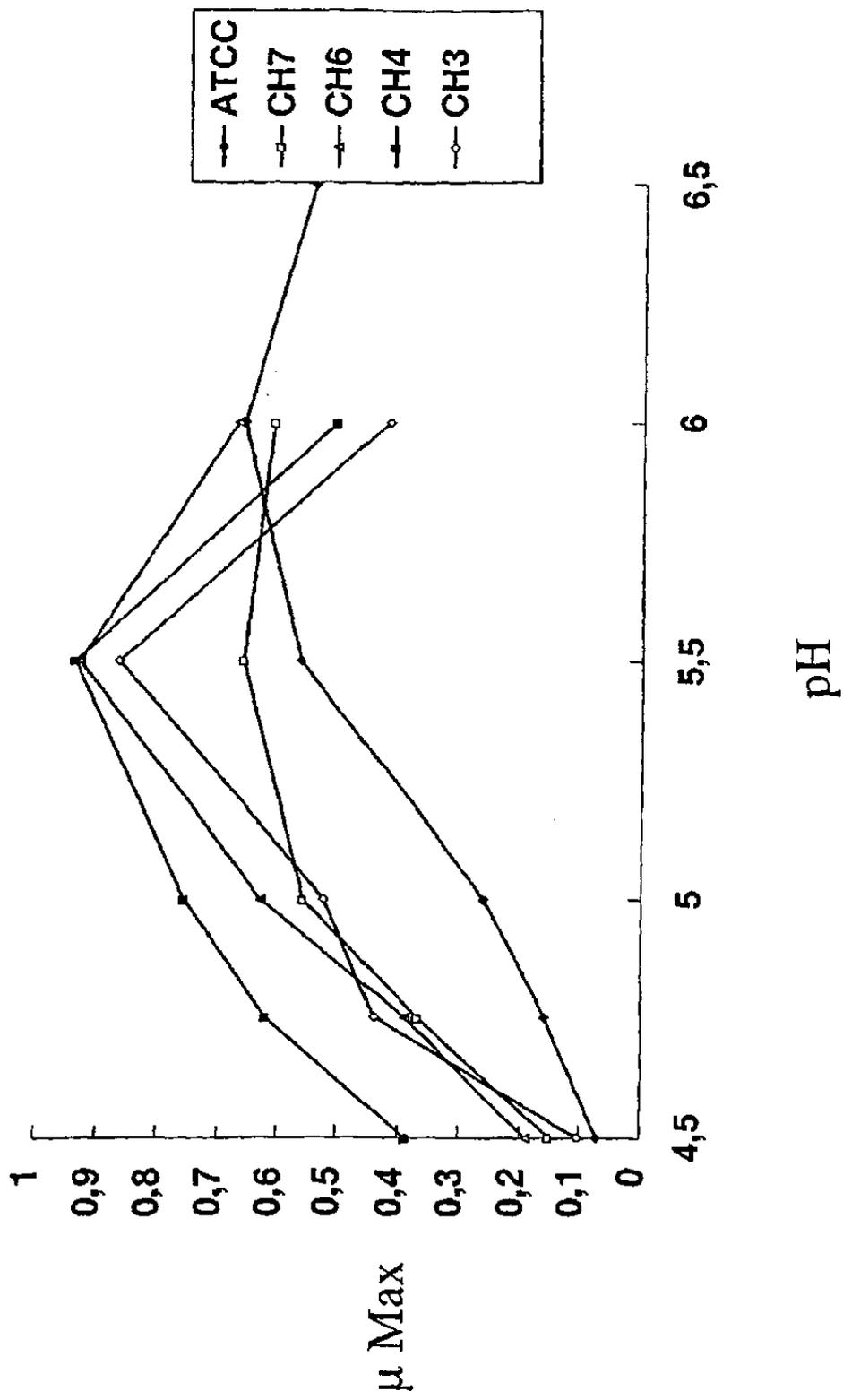


Fig. 1. Velocidades de crecimiento de los consumidores de lactato a diversos valores de pH

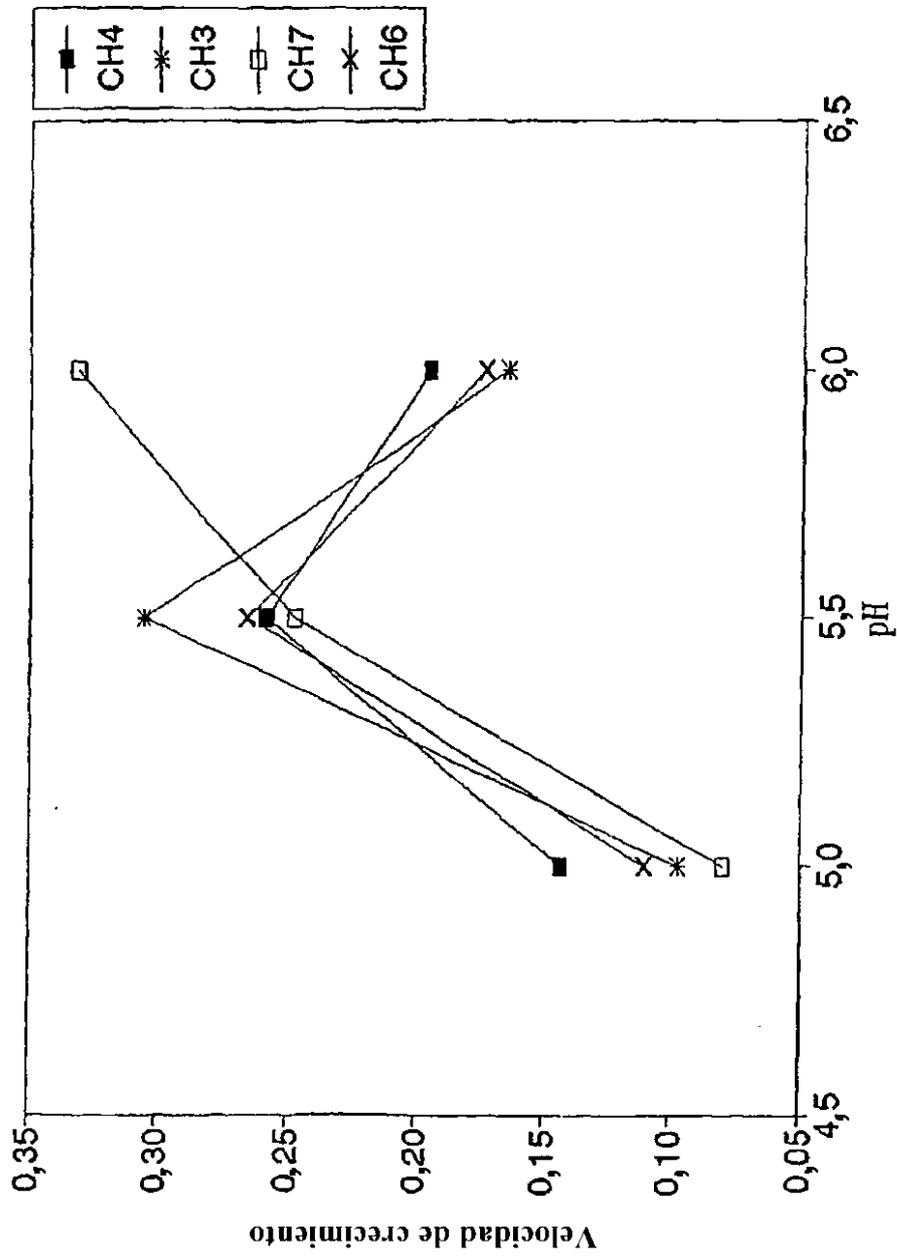


Fig. 2 Velocidades de crecimiento (H⁻¹) de los aislados que usan lactato en medio de glucosa a diversos valores de pH

M. elsdenii CH7
M. elsdenii CH4
M. elsdenii ATCC 17752
M. elsdenii ATCC 25940
Megasphaera cerevisiae
Selenomonas ruminantium
Quinella ovalis
Lactobacillus vitulinus
Synergistes jonesii
Clostridium acetobutylicum
Eubacterium cellulosolvens
Eubacterium uniformis
Clostridium polysaccharolyticum
Lactobacillus ruminis
Streptococcus bovis
Eubacterium limosum
Methanosarcina barkeri
Methanomicrobium mobile
Methanobrevibacter ruminantium
Methanobacterium formicicum
Fibrobacter succinogenes
Prevotella ruminicola
Wolinella succinogenes

Escherichia coli

0,10

Acinetobacter calcoaceticus

Fig. 3