

Cuantificación de bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del rumen de ganado bovino: comparación de tres técnicas

Quantification of anaerobic cellulolytic bacteria from the rumen of cattle: comparison of three techniques.

Andrés F Londoño-Zapata*, Jaime A Fernández-Correa*, Licet P. Molina-Guzmán†, Diana Polanco-Echeverry‡, Lina A. Gutiérrez-Builes§

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del rumen son los responsables de la digestión del material vegetal que consumen los rumiantes. Las bacterias celulolíticas poseen la capacidad de degradar carbohidratos estructurales, por lo cual la abundancia y actividad enzimática de éstas es esencial para la formulación de estrategias de manipulación de la fermentación ruminal.

OBJETIVO

Comparar los métodos de cuantificación de crecimiento bacteriano: número más probable, recuento de células viables en placa y Roll-tube para la enumeración de bacterias celulolíticas del rumen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental comparativo. Se evaluaron tres métodos de cuantificación de crecimiento bacteriano: número más probable, recuento de células viables en placa y Roll-tube, con respecto a la densidad y diversidad de bacterias celulolíticas ruminales en muestras de contenido ruminal recolectadas de dos hembras de raza Holstein canuladas al rumen.

RESULTADOS

Se observó correlación positiva, de tipo alta con significancia estadística (0,826; $p = 0,000$) entre la cuantificación de células viables por el método de Roll-Tube y la cuantificación en placa, y una correlación negativa y de tipo moderada débil entre la cuantificación de células viables obtenidas por el método del número más probable con el método Roll-Tube (-0,514; $p = 0,237$), y negativa y de tipo débil entre la cuantificación con el método de número más probable y recuento en placa (-0,374; $p = 0,147$). Los resultados del coeficiente de determinación corroboran este dato. Con el número más probable se detectó baja diversidad, mientras que los métodos de recuento de células viables en placa y Roll-Tube mostraron consistencia respecto a densidad y diversidad de bacterias.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la técnica de recuento de células viables en placa puede ser la más adecuada para cuantificar bacterias celulolíticas ruminales.

PALABRAS CLAVES

Actividad celulolíticas. Bacterias anaerobias. Microorganismos ruminales. Rumen. Técnicas y procedimientos de laboratorio.

*Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental, Grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. †Microbióloga y Bioanalista, Estudiante de Maestría en Microbiología y Bioanálisis, Grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Magister en Ciencias Biológicas, Grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. §Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Doctora en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Microbiología y Parasitología, Grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: lipa382@gmail.com
Recepción: 28-10-2011. Aceptación: 12-11-2011.

SUMMARY

INTRODUCTION

Rumen microorganisms are responsible for digestion of plants material consumed by ruminants. Cellulolytic bacteria have the ability to degrade structural carbohydrates, so the abundance and enzymatic activity of these is essential for developing strategies to manipulate the rumen fermentation.

OBJECTIVE

Compare the methods for quantification of bacterial growth: most probable number, viable cell count and Roll-tube plate for enumeration of rumen bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Comparative experimental study. We evaluated three methods for quantification of bacterial growth: most probable number, viable cell count and Roll-tube plate with respect to the density and diversity of ruminal cellulolytic bacteria in rumen fluid samples collected from two cannulated Holstein females to rumen.

RESULTS

High and positive correlation was observed with statistical significance (0.826; $p=0.000$) between the quantification of viable cells by the Roll Tube method and the plaque viable cells quantification method. Another correlation, this time negative, moderated and weak, was observed between the quantification of viable cells obtained by the “most probable number” method with the Roll Tube method and the plaque method too. (-0.514; $p=0.237$; -0.374; $p=0.147$ respectively). The results from the determination coefficient corroborate this information. On the one hand, the “most probable number” method detected low diversity, on the other hand the other methods (Roll Tube and plaque), demonstrated consistency with regard to density and bacteria diversity.

CONCLUSIONS

The data suggest that the technique of counting viable cells in plaque may be most appropriate to quantify ruminal cellulolytic bacteria

KEY WORDS

Anaerobic bacteria cellulolytic activity. Laboratory techniques and procedures. Rumen. Rumen microorganisms.

INTRODUCCIÓN

La digestión de los rumiantes funciona a través de las relaciones simbióticas que se establecen entre diferentes microorganismos que habitan el rumen: bacterias, protozoos, hongos, arqueas y virus.^{1,2} En el ecosistema ruminal se lleva a cabo la conversión del material vegetal consumido por los animales, posee un potencial redox bajo y un suministro constante de nutrientes, que favorecen el crecimiento de diversos microorganismos, en su mayoría anaerobios estrictos.^{1,3,4} Las bacterias son el grupo más abundante de microorganismos presentes en el rumen, su variación está determinada en gran medida por la dieta suministrada al animal, que en las condiciones de regiones tropicales la constituyen predominantemente los pastos. Las bacterias ruminales participan en la degradación de los carbohidratos estructurales como la celulosa y la hemicelulosa,⁵⁻⁸ en glucosa y oligosacáridos, que son utilizados por varios microorganismos para la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), fuente principal de energía para los rumiantes.^{9,10}

El conocimiento de la densidad y diversidad de la población de bacterias ruminales encargadas del flujo de carbono en este ambiente anaerobio es una condición básica para la caracterización de la dinámica del ecosistema ruminal.¹¹ Para el estudio de los microorganismos ruminales se requieren condiciones de anaerobiosis estricta que conserven la viabilidad *in vitro* de las bacterias del rumen,^{8,11} por lo tanto, es necesario implementar tales condiciones en el ambiente de cultivo *in vitro* para garantizar el potencial redox y las fuentes de energía requeridas para el crecimiento de las poblaciones de bacterias ruminales.^{12,13}

Entre las técnicas más utilizadas para la enumeración de la microbiota ruminal está el método de recuento de células viables en Roll-tube, desarrollado por Hungate en 1940,³ el cual consiguió aislamientos de una gran diversidad de especies de bacterias celulíticas,^{3,14} consolidándola como el mejor método de cultivo y de recuento, en comparación con otras técnicas de cultivo utilizadas previamente.¹⁵⁻¹⁷ Sin embargo, no existen datos comparativos de la eficiencia de esta técnica con otros métodos utilizados para el recuento de microorganismos ruminales, tales como: número más probable (NMP)¹⁸ y recuento de células viables en placa, el cual permite, al mismo tiempo, la cuantificación y el aislamiento de las bacterias.¹⁹ Disponer

de un método práctico y confiable para el recuento de microorganismos ruminales dará nuevas perspectivas a esta rama de la microbiología veterinaria, al permitir un estudio más detallado del ecosistema ruminal y el aislamiento y cultivo de microorganismos que hasta la fecha no se han podido cultivar.¹⁵ El presente trabajo tiene como objetivo comparar los métodos de cuantificación de crecimiento bacteriano: número más probable, recuento de células viables en placa y recuento de células viables en Roll-Tube, con respecto a la estimación de la densidad y diversidad de bacterias celulolíticas ruminales en muestras de contenido ruminal recolectadas de dos hembras bovinas de raza Holstein canuladas al rumen.

MATERIALES Y MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo contó con el aval del Comité de Ética en Investigación Animal, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, acta número 07 del 24 de noviembre del 2008, que permitió la canulación de los bovinos muestreados para este trabajo.

MUESTRAS DE FLUIDO RUMINAL

Para la comparación de los métodos de cuantificación de crecimiento bacteriano: número más probable, recuento de células viables en placa y recuento de células viables en Roll-Tube, el contenido ruminal se obtuvo de dos hembras de la raza Holstein canuladas al rumen. Estas vacas se encontraban bajo pastoreo en potreros de pasto Kikuyo (*Penisetum clandestinum*) en la Hacienda La Montaña de la Universidad de Antioquia, ubicada en el municipio de San Pedro de los Milagros a una altitud altura de 2.500 msnm y una temperatura promedio de 14°C.

OBTENCIÓN Y CLARIFICACIÓN DEL FLUIDO RUMINAL PARA SUPLEMENTAR LOS MEDIOS DE CULTIVO

A través de cánula ruminal se recolectaron aproximadamente 3 L de fluido utilizando una sonda acoplada a una jeringa de 50 mL (Bar Diamond, Parma, Idaho, USA). El fluido ruminal se almacenó durante una hora a 4°C para permitir la precipitación del material particulado de mayor tamaño; posteriormente, se filtró en cuatro capas de muselina y se centrifugó a 4.500 rpm por 20 minutos y 8.000 rpm por 30 minutos, para

eliminar el material particulado más fino y los microorganismos ruminales de mayor tamaño. El fluido ruminal clarificado se congeló a -20°C en alícuotas de 45 mL para su uso posterior en la preparación de los medios de cultivo.^{8,20}

Para la preparación del medio de dilución y de cultivo de bacterias celulolíticas viables se usaron los componentes y concentraciones recomendadas por Grubb and Dehoroty.¹⁸ Para la formación de la película de agar en los tubos de cultivo y en las cajas de Petri se adicionó agar a una concentración final de 1,5%.²¹

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Se recolectaron 20 g de contenido ruminal, el cual fue diluido en 180 mL de solución de dilución aneróbica, se homogenizó en licuadora por tres minutos bajo flujo constante de N₂, y se incubó a 39°C. Se tomó 1 mL de la muestra homogenizada, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻² hasta 10⁻⁶, y las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁶ se inocularon por triplicado en los medios de cultivo para el recuento de bacterias celulolíticas ruminales mediante las técnicas de Roll-Tube, NMP y recuento en placa, de la siguiente manera: en el método Roll-Tube y NMP, se adicionó 1 mL de las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁶ a través del tapón de caucho, usando una jeringa gasificada previamente con N₂. En el método de recuento de células viables en placa, la muestra se sembró por estría con asa calibrada de 0,01 mL en la cámara de anaerobiosis (Bactron II, Shel Lab, USA), todos los cultivos se incubaron a 39 °C durante 72 h.

RECuento DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS RUMINALES

Para el recuento de las bacterias celulolíticas viables se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas en las tres réplicas de siembra para cada dilución en los métodos de recuento de células viables en placa y recuento de células viables en Roll-Tube, en la técnica número más probable se verificó el crecimiento de bacterias mediante la observación de turbidez en el medio de cultivo y la disminución del pH (> 0,2 unidades) después de la incubación, se determinó el número de unidades formadoras de colonias siguiendo la tabla de NMP reportada por Dehoroty.¹⁵

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS CELULOLÍTICAS

Para los métodos de recuento de células viables en placa y recuento de células viables en Roll-tube, se rea-

lizó la evaluación de las colonias obtenidas mediante la observación directa de cada colonia en un estereomicroscopio (Olympus modelo SZ61, USA), adicionalmente se realizó tinción de Gram con modificación de Koppelo²² y se observaron en el microscopio (Nikon, modelo Eclipse E200, USA). De acuerdo a las características encontradas en la morfología de las células y de las colonias, se determinaron posibles géneros de bacterias celulíticas presentes en las muestras de contenido ruminal teniendo como referencia las características reportadas por Rodríguez et al.²²

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se verificó la normalidad del conjunto de datos con base en la prueba de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$). Posteriormente, se estimó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) y el coeficiente de determinación (R^2) para calcular el porcentaje de variabilidad de los datos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS versión 18 para MS Windows XP.

RESULTADOS

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS CELULÍTICAS RUMINALES

Con la estimación del coeficiente de correlación de Spearman se observó asociación positiva, alta y con diferencias estadísticamente significativas entre la cuantificación de células viables por el método de Roll-Tube y el método de cuantificación de células viables en placa ($0,826$; $p = 0,000$, la estimación del coeficiente de determinación (R^2) fue de 84%, estos hallazgos sugieren que las cuantificaciones de células viables con el método de Roll-Tube y placa permiten obtener un mayor recuento de bacterias celulíticas en comparación con el método del NMP

Por otra parte, el análisis de células viables con el método NMP y el recuento de células viables Roll-Tube presentaron un coeficiente de correlación negativo, moderado débil y sin diferencias estadísticamente significativas ($-0,514$; $p = 0,237$). Al realizar la estimación del coeficiente de determinación (R^2), se observó que el 13,3% del recuento de células viables por el método del Roll-Tube es mayor que por el método del NMP, indicando una baja asociación entre estos dos métodos. El coeficiente de correlación estimado para los datos de cuantificación de

células viables con el método de recuento en placa y el NMP evidenció una asociación negativa, débil y sin diferencias estadísticamente significativas ($-0,374$; $p = 0,147$), con la estimación del coeficiente de determinación (R^2) se obtuvo que el porcentaje de variabilidad de los datos fue de 24,3%, indicando que estas dos variables no están asociadas; es decir, la cuantificación de células viables entre estos dos métodos es inversamente proporcional uno de otro (tabla 1 y figura 1).

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CELULÍTICAS PREDOMINANTES

Se evaluó la diversidad de bacterias celulíticas presentes en la muestra, por medio del análisis macroscópico y microscópico de diferentes colonias obtenidas del cultivo en medio sólido, tanto en el método de cuantificación de células viables Roll-Tube como en las cajas de Petri utilizadas para el método de recuento de células viables en placa. En el caso del método de NMP sólo se realizó el análisis microscópico de muestras tomadas de los tubos con el medio líquido. En las figuras 2 y 3 se presentan algunas imágenes representativas de la morfología de las bacterias halladas en este estudio. En la tabla 2 se presenta un consolidado del género bacteriano más probable y la diversidad de bacterias celulíticas ruminales predominantes en los tres métodos de cuantificación.

Tabla 1. Coeficiente de correlación de Spearman para la comparación de los métodos de cuantificación de bacterias celulíticas ruminales.

	Roll-Tube	Placa
Placa		
Rho	0,826**	
p	0,000	
N	16	
NMP		
Rho	-0,514	-0,374*
p	0,237	0,047
N	12	V
** p< 0,01	* p< 0,05	

Figura 1. Coeficiente de determinación (R2).

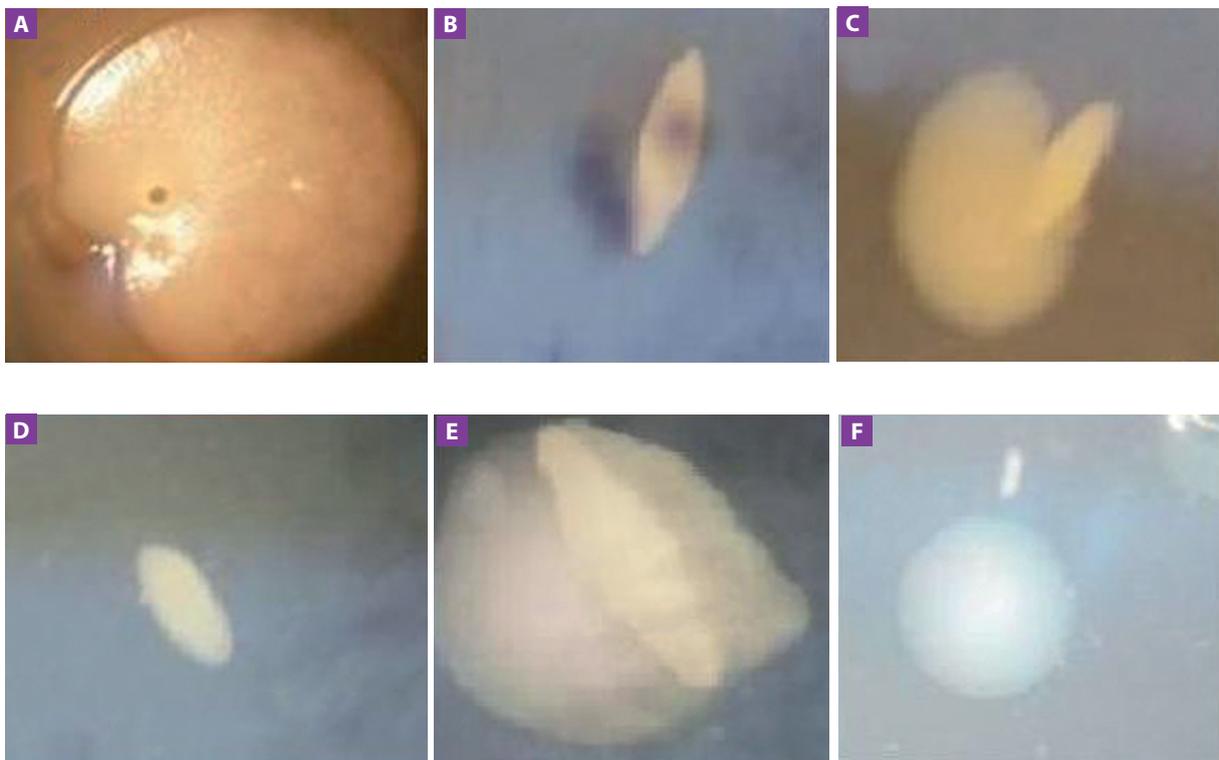
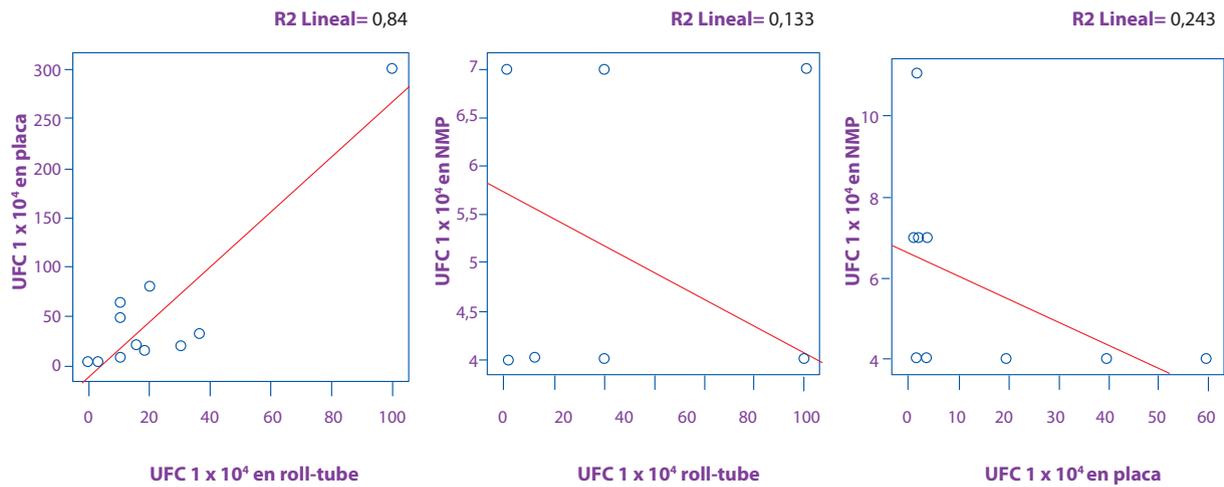


Figura 2. Identificación de bacterias celulolíticas predominantes obtenidas mediante el método de recuento de células viables en Roll-Tube, NMP y recuento de células viables en placa. **A)** Colonia bacteriana en forma de abanico. **B)** Colonia lenticular biconvexa vista lateral. **C)** Colonia lenticular convexa con halo. **D)** Forma elipsoidal. **E)** Colonia lenticular convexa con halo. **F)** Colonia plana regular.

Aumento 100X, estereomicroscopio Olympus modelo SZ61.

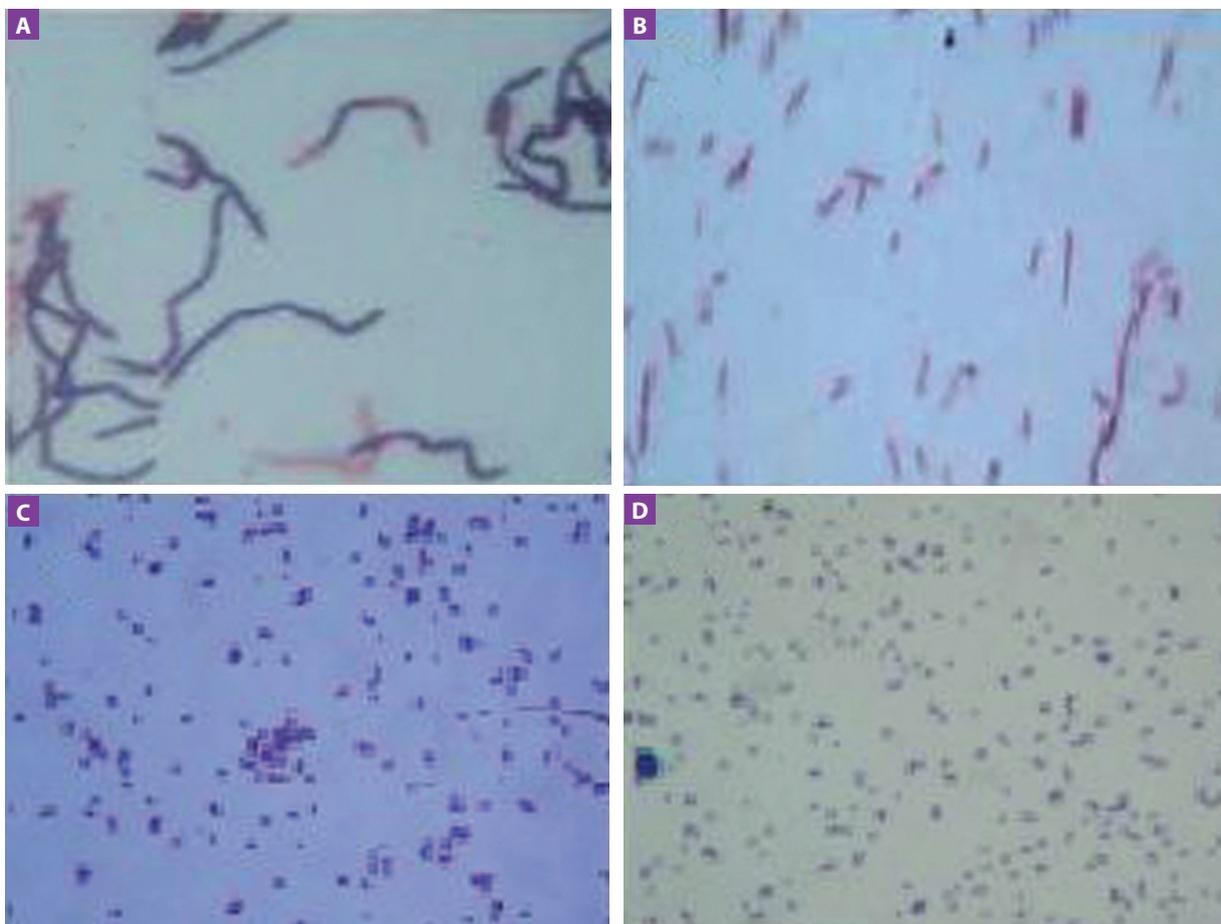


Figura 3. Morfología microscópica de las células identificadas mediante tinción de Gram de Koppelof modificado. **A)** Bacilos Grampositivos en cadena. **B)** Bacilos Gramnegativos. **C)** Cocos Grampositivos compatibles con *Ruminococcus flavefaciens*. **D)** Cocos Grampositivos compatibles con *Ruminococcus alvus*. Aumento 1.000X, microscopio Nikon, modelo Eclipse E200.

Tabla 2. Diversidad de bacterias celulolíticas ruminales predominantes en los tres métodos de cuantificación.

Experimento	Roll tube	Placa	NMP
1	Cocos: Gram(+), Gram(-)	Cocos: Gram (+)	Cocos: Gram (+)
2	Bacilos: Gram(+), Gram(-)		Bacilos: Gram (+) Gram (-)
3			
Género bacteriano más probable	<i>Ruminococcus</i> spp.	<i>Ruminococcus</i> spp. <i>Fibrobacter</i> spp. <i>Eubacteria</i> spp. <i>Selenomonas</i> spp.	<i>Ruminococcus</i> spp. <i>Fibrobacter</i> spp. <i>Bacteroides</i> spp.

Al determinar la flora predominante en cada método evaluado, se encontró predominio de cocos grampositivos, compatibles con bacterias del género *Ruminococcus* spp. en los cultivos de NMP. En los cultivos obtenidos con el método Roll-Tube se observaron bacilos grampositivos y bacilos gramnegativos en cadena o aislados, compatibles con bacterias ruminales de los géneros *Fibrobacter* spp. y *Eubacteria* spp.;^{22, 23} adicionalmente, se identificaron cocos grampositivos individuales y agrupados, compatibles con *Ruminococcus* spp.^{10,23,24} La misma flora fue predominante en el método de recuento en placa, y adicionalmente se observaron cocobacilos gramnegativos, probablemente del género *Bacteroides* spp.

DISCUSIÓN

En nuestro país existe poca información acerca de las comunidades microbianas presentes en el rumen de bovinos. En este trabajo se cuantificaron tres géneros importantes de bacterias celulolíticas del rumen *Ruminococcus* spp., *Fibrobacter* spp. y *Bacteroides* spp., constituido este último género por bacterias anaerobias estrictas, consideradas tradicionalmente como de difícil aislamiento.¹⁵ En los estudios de microbiología anaerobia y especialmente en estudios de microbiología ruminal, el método de Roll-Tube ha sido la técnica de cultivo más utilizada por diferentes autores.^{14,19} El recuento total de bacterias celulolíticas obtenidas en este trabajo fue en promedio $4,71 \times 10^8$ UFC/g rumen. En trabajos realizados en Venezuela, Obispo et al (2006) reportaron recuentos similares de bacterias celulolíticas, mientras que en los estudios de Vervaeke et al (1972) el recuento de bacterias celulolíticas fue inferior (10^8 UFC/g rumen). Por otra parte en experimentos realizados en Malasya, Dehority, BA (2003), obtuvo un recuento intermedio de bacterias celulolíticas en comparación con los datos reportados en los trabajos anteriores (Vervaeke et al 1972 y Dehority, BA, 2003). Los métodos utilizados en los trabajos anteriores fueron recuento en placa, el método del NMP y Roll-Tube, determinando densidades 2 a 3 veces inferiores a los reportado en el presente trabajo, de manera muy diversa, mientras que en el estudio de Phillipson et al (1970) utilizando el método de Roll-Tube, se detectaron entre 10^3 a 10^8 UFC/g

de rumen. En los estudios realizados por Dehority, BA (2003), y Obispo et al (2006) los resultados fueron de 10^4 UFC/g de rumen por la técnica de recuento NMP y por la técnica de recuento en placa se detectaron 10^7 UFC/g de rumen, lo que indicaba cambio en la cantidad de células viables de acuerdo al método empleado y no se pudo determinar la utilidad de cada método al tiempo y bajo las mismas condiciones. Al evaluar los resultados obtenidos en este trabajo se determinó que el recuento de células viables por placa permitió la cuantificación de células viables existentes e identificar los tipos de bacterias que pudieran estar presentes en la muestra con resultados similares al método empleado tradicionalmente Roll-Tube.

Respecto al método de NMP, es importante considerar que la diversidad encontrada en los medios de cultivo fue baja, correspondiendo de manera predominante a un único tipo de morfología celular. Adicionalmente, el método de NMP presenta la desventaja operativa de requerir de siembras adicionales en medios sólidos, si se pretende la evaluación de la diversidad presente en la muestra mediante la observación de la morfología de las colonias o de la obtención de un cultivo puro. También es importante tener en cuenta que el método de NMP estima de manera cualitativa el crecimiento microbiano (presencia o ausencia de crecimiento en cada dilución), lo que podría hacer que los datos obtenidos no reflejen de manera confiable la densidad microbiana presente en el ecosistema ruminal.^{5,18}

La baja correlación entre el NMP y el recuento de células viables por el método de Roll-Tube y placa, indica que el método del NMP no constituye un buen método para inferir el recuento de células viables del rumen, por el contrario la correlación alta existente entre los métodos de cuantificación de células viables Roll-Tube y placa indica que estos dos métodos pueden estimar la mayor población de bacterias celulolíticas del rumen. No obstante, el método de cuantificación de células viables por placa presenta ventajas sobre los otros métodos de recuento bacteriano, en la medida que a partir del aislamiento bacteriano primario se puede determinar la presencia de diferentes colonias y, por ende, la determinación de diferentes especies en una muestra, lo que permitiría la adecuada interpretación y se eviten acomodaciones subjetivas en la lectura.

CONCLUSIONES

Es posible encontrar una variación significativa en la densidad y diversidad poblacional de bacterias celulolíticas ruminales cultivadas en el laboratorio dependiendo del método de cuantificación y cultivo microbiano que se elija. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el método de recuento de células viables en placa presenta correlación alta en los datos que se obtienen en comparación con el método tradicional de recuento de células viables en Roll-Tube, y en comparación con los resultados obtenidos con el método de NMP. Adicionalmente, esta técnica presenta mayor facilidad operativa en el laboratorio, aunque es importante resaltar que se requiere experiencia para el trabajo con microorganismos anaerobios estrictos y con la infraestructura para ello (cámara de anaerobiosis). El método de recuento de células viables en placa presenta ventajas con respecto a los otros dos métodos evaluados en este trabajo, porque permite en corto tiempo y sin procedimientos de siembra adicionales, la caracterización morfológica de las colonias, el análisis microscópico de las células, así como el aislamiento de las bacterias para la obtención de cultivos puros.

La escasa literatura disponible sobre trabajos en el área de la microbiología ruminal en Colombia evidencia la necesidad de realizar más trabajos en esta temática. Diversas investigaciones han sugerido el potencial que presentan, desde el punto de vista ecológico, industrial y biotecnológico, los diferentes microorganismos que conforman el consorcio microbiano establecido en el ecosistema ruminal. Se estima que la diversidad de microorganismos presentes en el rumen es significativamente mayor a la descrita hasta el momento, y por lo tanto su potencial esta aún subvalorado. A este respecto es necesario resaltar que el presente trabajo es un paso inicial para la implementación de metodologías óptimas que permitirán el estudio de los microorganismos ruminales, y para que finalmente se pueda evaluar y aprovechar adecuadamente su potencial biotecnológico en nuestro medio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Formación Académica de Haciendas adscrito a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia y

al personal administrativo y técnico de la Hacienda La Montaña de la Universidad de Antioquia por su valiosa colaboración para la ejecución de los muestreos y en el cuidado de los animales canulados.

FINANCIACIÓN

Este trabajo estuvo anidado al proyecto financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia código 2008D31067-3724 producto de la alianza entre la Universidad de Antioquia, FUNDAUNIBAN y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Phillipson AT.** Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant. New Castle: Ed. Cornell University; 1970. p.310-23.
2. **Cronjé P.** Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth, and reproduction. New York: Ed. Cabi; 2000. p.475.
3. **Grubb JA, Dehority BA.** Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Environ Microbiol.* 1976 Feb; 31(2): 262-7.
4. **Obispo NE.** Una mirada al ecosistema ruminal. *Revista Ceniap Hoy;* 2006: 12.
5. **Estrada J.** Pastos y forrajes para el trópico colombiano. Caldas: Colección Ciencias agropecuarias; 2002. p.105-40.
6. **Pabon M, Ossa J.** Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca. Ed. Biogenesis. Medellín. 2005. Pag: 330.
7. **Bryant MP, Small N, Bouma C, Robinson IM.** Characteristics of ruminal anaerobic cellulolytic cocci and *Cillobacterium cellulosolvens* n. sp. *J Bacteriol.* 1958 Nov; 76(5): 529-37.
8. **Makkar HP, McSweeney CS.** Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants. Ed. Springer .Netherlands. 2005. Pag: 225.- 230.

9. **Irmak S, Dunford NT, Gilliland SE, Banskalieva V, Eisenmenger M.** Biocatalysis of linoleic acid to conjugated linoleic acid. *Lipids*. 2006 Aug; 41(8): 771-6.
10. **Miron, Morag, Bayer, Lamed, Ben G.** An adhesion-defective mutant of *Ruminococcus albus* SY3 is impaired in its capability to degrade cellulose. *J. Appl. Bacteriol.* 1998; 84(2): 249-54.
11. **An D, Dong X, Dong Z.** Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe*. 2005 Aug; 11(4): 207-15.
12. **Cheng KJ, Costerton JW.** Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a gram-positive bacterium. *J Bacteriol.* 1977 Mar; 129(3):1506-12.
13. **Wolfe RS.** Anaerobic life—a centennial view. *J Bacteriol.* 1999 Jun; 181(11): 3317-20.
14. **Dehority BA.** Carbon dioxide requirement of various species of rumen bacteria. *J Bacteriol.* 1971 Jan; 105(1): 70-6.
15. **Dehority, BA.** Rumen microbiology. Nottingham: Nottingham University Press; 2003. p.372.
16. **Bryant MP.** Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr.* 1972 Dec; 25(12): 1324-8.
17. **Attebery HR, Finegold SM.** Combined screw-cap and rubber-stopper closure for Hungate tubes (pre-reduced anaerobically sterilized roll tubes and liquid media). *Appl Microbiol.* 1969 Oct; 18(4): 558-61.
18. **Dehority BA, Tirabasso PA, Grifo AP Jr.** Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl Environ Microbiol.* 1989 Nov; 55(11): 2789-92.
19. **Vervaeke IJ, Van Nevel CJ.** Comparison of three techniques for the total count of anaerobes from intestinal contents of pigs. *Appl Microbiol.* 1972 Sep; 24(3): 513-5.
20. **Gutiérrez, L.** Manual de procedimientos parte I: Microbiota. Laboratorio de biotecnología ruminal. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
21. **Obispo, NE.** Notebook of media and procedures; 1994.
22. **Rodríguez, F, Diaz, T, Mackenzie, G, Guativa L.** Afanador, G. Aislamiento, patrón de fermentación de carbohidratos y caracterización morfológica de bacterias celulolíticas del rumen bovinos alimentados con heno de Raigras en Colombia. 1996. *Rev. Copoica.* 1996; 1: 23-8.
23. **Marvin P. B.** Bacterial species of the rumen. *Bacteriol Rev.* 1959; 3: 125–53.
24. **MacGregor BJ, Toze S, Alm EW, Sharp R, Ziemer CJ, Stahl DA.** Distribution and abundance of Gram-positive bacteria in the environment: development of a group-specific probe. *J Microbiol Methods.* 2001 Apr; 44(3): 193-203.
25. **Wu SHW, Papas A.** Rumen-stable delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1997; 28(3): 323-34.