

# Importancia de la interacción de bacteriófagos y bacterias ruminales en el desarrollo productivo del rumiante

## Importance of the interaction between bacteriophages and ruminal bacteria in the productive development of ruminants

Diego Felipe Portela-Díaz<sup>1, 2\*</sup>

Cómo citar: Portela-Díaz, D. F., (2018). Importancia de la interacción de bacteriófagos y bacterias ruminales en el desarrollo productivo del rumiante. *Revista Ciencias Agropecuarias*, 4(2), 41-45. DOI: 10.36436/24223484.243

**Resumen:** En el rumen se hospedan especies de bacterias (1010-1011/mL), arqueobacterias (107-109/mL), protozoarios (104-106/mL), hongos (103-106/mL) y virus, definidos como bacteriófagos (109-1010/mL). Este ecosistema es dinámico y las interacciones microbiológicas que favorecen el co-metabolismo para mantener las condiciones físicas y químicas de la fermentación ruminal. Los bacteriófagos pueden influir en el metabolismo ruminal mediante la lisis de un gran número de bacterias (e.j. celulolítica, fibrolíticas, amilolíticas), que participan en la degradación y conversión del alimento en ácidos grasos de cadena corta y otros ácidos orgánicos que pueden reducir el pH ruminal. *Streptococcus bovis* es una bacteria amilolítica productora de ácido láctico y de forma experimental se han usado bacteriófagos específicos, como alternativa de prevención de la acidosis ruminal subclínica (ARS), enfermedad asociada a la proliferación de esta bacteria en el rumen de vacas de alta producción lechera. La presencia de material genético viral en las bacterias ruminales es un indicio de la probable interacción de regulación del crecimiento de una especie y la transducción de ADN, con el fin de compartir patrones de resistencia, manteniendo así un grupo de bacterias adaptadas a la variación ambiental, con lo cual el rumiante adquiere mayor rusticidad para aprovechar y fermentar fuentes de alimentación según su sistema productivo.

**Palabras claves:** rumen, bacteriófago, fermentación, bacteria, lisogénico

### INTRODUCCIÓN

El ecosistema ruminal es dinámico, por tanto, las poblaciones de microorganismos se adaptan al consumo de diferentes ingredientes de la dieta, lo cual permite que se mantengan las condiciones físicas y químicas (pH, potencial de óxido-reducción) de fermentación en este ambiente anaerobio (1). En el rumen se hospedan varias especies de bacterias (1010-1011/mL), arqueobacterias (107-109/mL), protozoarios (104-106/mL), hongos (103-106/mL) y bacteriófagos (109-1010/mL); (2). Los bacteriófagos (virus) son parásitos obligados de las bacterias, que utilizan los recursos de las células para replicarse (3). Están presentes en ecosistemas como el rumen, aguas residuales, suelo, derivados lácticos y heces, sin embargo, se han realizado pocos estudios de la interacción de los fagos y las bacterias que los contienen (4). Bacteriófagos y partículas similares a virus están presentes en el rumen de ovinos y bovinos (5, 6). De forma experimental, se han evaluado bacteriófagos para *Escherichia coli* O157: H7, patógeno considerado como uno de los principales problemas de salud pública ya que se transmite por el consumo de carne de rumiante en donde se hospeda a nivel de intestino y rumen (7, 8). En Estados Unidos de Norteamérica las enteropatías hemorragias causadas por *E. coli* generan costos sobre la salud pública directos e indirectos de 400-700 millones de dólares/año (9). Fuentes de agua contaminadas con *E. coli* O157 son una causa directa de la contaminación del ganado. Los posibles tratamientos químicos (cloración, ozonización, ionización) para el mejoramiento de la calidad del agua, no son totalmente efectivos (10-12). El exceso en la dieta de carbohidratos de fácil fermentación, proporciona un medio de cultivo óptimo para el desarrollo de *Streptococcus bovis*, que favorece la producción de L-lactato, lo que ocasiona la disminución del pH ruminal a valores de 5.0 y 5.5 (13, 14). Como consecuencia se produce la acidosis ruminal subaguda (ARS), en donde la concentración ruminal de lactato se incrementa rápidamente y alcanza valores de hasta 100 mM (15). Esta enfermedad afecta a un 20-40% de los animales en hatos lecheros de alta producción del mundo (16). El desequilibrio entre la producción de ácido láctico y la eliminación desde el rumen, genera períodos transitorios en donde el pH disminuye por debajo del valor ideal fisiológico de 6.8 (16). Junto con la acidosis ruminal se pueden presentar problemas como laminitis, poliencéfalomalacia, ruminitis, abscesos hepáticos, síndrome de no consumo, síndrome de mala absorción e

infecciones clostridiales (17). En *S. bovis*, son varios los bacteriófagos que se han inducidos para ser evaluados in vitro en diferentes cepas. Uno de los beneficios del uso de bacteriófagos está asociado al control de especies de bacterias específicas permitiendo el desarrollo de poblaciones deseadas y el control de bacterias patógenas en un sistema de cultivo continuo como el rumen (4).

Aspectos biológicos de la interacción bacteriófagos-bacterias ruminales A nivel ruminal las bacterias de donde se han inducido, identificado y evaluado algunos bacteriófagos han sido *E. coli* O157:H7, *Prevotella brevis* y *S. bovis* (Tabla 1).

Bacteriófago	Bacteria/ huésped	Referencia
e11/2 y 4/1c	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	18
CEV1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
GA33	<i>Prevotella brevis</i>	20
DC22	<i>E. coli</i> O55:H7 y O157:H7	21
F4, F5 y F6	<i>Streptococcus bovis</i> cepas 47/3. 59/2, 4/1, 46/2 y 44/9	22 23
		24

**Tabla 1.** Bacteriófagos inducidos, identificados y evaluados en bacterias ruminales.

Por su diversidad morfológica los bacteriófagos ruminales se clasifican en los siguientes grupos: grupo A, que presentan colas largas y contráctiles, grupo B, tienen colas largas y no contráctiles, grupo C, lo cuales poseen colas cortas y no contráctiles, grupo D, en donde los capsómeros que forman la cápside son grandes, estos bacteriófagos carecen de cola, grupo E, en este caso los capsómeros que forman la cápside son pequeños y a diferencia del anterior no poseen cola, también, en este grupo se encuentran los fagos filamentosos. La población de bacteriófagos en el rumen tiene un rango de  $2 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  por mL de fluido ruminal (25). Uno de los bacteriófagos ruminales de mayor tamaño ha sido el encontrado por Ambrožič et al, (2001) específico para *P. brevis*, identificado como GA33, el cual tiene una morfología típica, cabeza icosaédrica, con un diámetro de aprox. 120nm y una cola curvada, con dimensiones de 30 nm de ancho y 800 nm de largo (20). El bacteriófago identificado por

<sup>1</sup> Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Cundinamarca,

<sup>2</sup> Licenciatura en Medicina Veterinaria, Universidad de la Costa. Oaxaca, México.

\* Correo electrónico: fporteladiaz@gmail.com

Raya et al (2006) tiene una cabeza en forma de icosaedro unido a la cola contráctil por fibras ubicadas en su extremo distal, teniendo en cuenta su morfología y la secuencia de ADN (788 nucleótidos) este bacteriófago se relaciona con el T4 (16). La interacción entre bacteriófago-bacteria parece antagónica, pero puede ser sinérgica ya que los bacteriófagos, en forma de profagos, pueden insertarse en el genoma del huésped, generando un cambio fenotípico benéfico para la bacteria (26). El ciclo infeccioso comprende dos fases (27). En la fase lítica se genera una rápida lisis y muerte de la bacteria en un tiempo muy corto y depende de la concentración del huésped para continuar con su proceso de replicación (28). Los bacteriófagos en fase lisogénica, son bacteriófagos que en fase lítica causan la infección de la bacteria y posteriormente entra en un estado de latencia ó de lisogenización, su replicación está asociada al cromosoma del huésped, de esta forma se da un intercambio de información para las futuras generaciones (28).

#### **Evidencias de la comunicación de bacteriófagos y bacterias ruminales**

El uso de bacteriófagos para controlar microorganismo patógenos fue liderado por d'Herelle en 1919 (29). La fagoterapia es una antigua idea que presenta un renacimiento, asociado al tratamiento de enfermedades causada por patógenos presentes en los alimentos entre otros ambientes, como el rumen. Esta alternativa es específica y afecta a determinadas bacterias de interés, como *S. bovis* (30). En bacterias Gram-positivas, pequeñas cantidades de endolisinas causa la lisis inmediata en la fase logarítmica lo que causa la muerte de la bacteria, así, en producciones animales su uso ha sido amplio, ya que los antibióticos no son eficaces y las bacterias desarrollan resistencia a ellos. Condiciones como su especificidad, bajas posibilidades de resistencia bacteriana, hace de las endolisinas una alternativa ideal para el control de patógenos (31). Los fagos no filamentosos utilizan endolisinas específicas para inhibir la síntesis de peptidoglicano, estas enzimas son codificadas a partir de ARN o ADN monocatenario y su acción hidrolítica está asociada a la acumulación de endolisinas en el citosol durante el último ciclo lítico del virus, posteriormente, esta enzima aumenta su concentración y rompe la pared celular liberando así a la nueva progenie (32-34). El mecanismo de acción de las endolisinas, comprende la formación de orificios en la pared celular a través de la degradación de peptidoglicano, lo cual produce la extrusión de la membrana citoplasmática y la lisis hipotónica por el aumento en la presión interna (15-25 atmosferas) de las bacterias (35). La hipótesis denominada "Kill The Winner", postula como los bacteriófagos prefieren adaptarse e infectar a linajes de bacterias con la frecuencia más alta de población y en práctica, esta teoría podría predecir una dinámica oscilatoria, mayor en ecosistemas cerrados de microorganismos, tales como el intestino humano y el rumen (26, 36). En la interacción de los bacteriófagos con la bacterias, son tres las condiciones importantes que se cumplen, en primer lugar, los fagos parecen ser específicos para una sola especie de bacteria, pero también pueden presentar afinidad por algunas cepas de la misma especie (37, 38). En segundo lugar, los fagos son construidos teniendo en cuenta su adaptación a su huésped específicos, lo que evidencia el grado de especialización entre bacteriófagos y especies de bacterias en una población (39,40). Finalmente, el tercer punto, indica como a pesar de que los bacteriófagos aumenta durante su fase lítica, este proceso es de corta duración y permite que el proceso de coevolución se mantenga (41). Los fagos lisogénicos pueden desempeñar un importante rol en el proceso de transferencia de genes, ya que el 25 % de las bacterias ruminales aisladas contienen profagos lisogénicos con estabilidad cromosómica. (32). El 23.7 % de las bacterias evaluadas en el experimentos de Klieve et al., en 1989, presentaron partículas similares a virus, lo que indica que el material genético viral puede ser parte de la constitución genética de las bacterias ruminales (42). Bacteriófagos en

forma lítica, no son comunes en el rumen, por lo contrario, los fagos en forma lisogénica ó pseudolisogénica se establecen formando una asociación con las bacterias ruminales (42). Durante la fase lítica los fagos pueden reproducirse dentro del huésped y a su vez puede entrar en fase lisogénica, por lo tanto el ADN cromosómico de las bacterias que es expuesto por el proceso de lisis, puede ser empaquetado dentro de la cápside viral. Durante este movimiento, los bacteriófagos pueden transferir genes que codifican toxinas o factores de virulencia y por lo tanto alterar el fenotipo de resistencia de las bacterias. Incluso en regiones tan conservadas como ARN ribosomal 16S se pueden encontrar parte del genoma de diferentes hospederos de un bacteriófago (43-45). El proceso de adhesión de los fagos en las bacterias es el primer paso de la infección y dependen de la presencia de receptores específicos de la pared celular de la bacteria a los cuales se une las fibras de la cola del fago (46-47). En la interacción bacteriófago-bacteria la presencia de receptores integrados a la membrana celular facilitan la unión del fago, es así como el fago T4, uno de los más estudiados, tiene la capacidad de identificar los lipopolisacáridos presentes en la membrana de *E. coli* O157: H7, en otro fagos, como el fago K12, la señal está asociada a la presencia de la proteína externa integrada a la membrana *OmpC*. (48, 49). La afinidad del bacteriófago DC22 a las cepas *E. coli* O157: H7 y *E. coli* O55: H7 puede estar asociado a la presencia de un constituyente común en la pared celular de estas bacterias. (21). Las endolisinas de los bacteriófagos, representan una alternativa promisorio contra la lucha de enfermedades infecciosas causadas por bacterias. La creciente preocupación generada por la prevalencia de "superbacterias" resistentes a los antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, hace que alternativas como la fagoterapia sean más consideradas para el tratamiento de enfermedades infecciosas (50). Estudios in vitro demuestran que el uso de bacteriófagos tiene un gran potencial para eliminar de forma selectiva patógenos como *E. coli* O157: H7 (19, 51, 52). El estudio realizado por Štyriak et al., (1991) evaluó el efecto de tres bacteriófagos (F4, F5 y F6) sobre la capacidad in vitro de adhesión a células epiteliales del rumen de cinco cepas de *S. bovis* (47/3, 59/2, 4/1, 46/2 y 44/9) encontrando que el bacteriófago F6 fue el que tuvo un efecto negativo ( $P < 0.0001$ ) sobre dicha capacidad, debido a la lisis provocada en el 80% de las cepas evaluadas (22). En el trabajo realizado por Štyriak et al., (2005), indujo y aisló dos bacteriófagos (F5 y F6) a partir de dos cepas de *S. bovis* 46/2 y 59/2 respectivamente. Estos bacteriófagos fueron posteriormente evaluados en un grupo de 12 cepas de *S. bovis*, encontrando que un efecto lítico sobre las cepas 47/3 y 4/1 (24).

#### **Alteraciones fisiológicas y metabólicas asociadas a la interacción bacteriófagos-bacterias ruminales**

Los posibles cambios fisiológicos que presente el rumiante, asociados a esta interacción están relacionados con la regulación de la población patógena y otros de transducción de la información genética entre la población del rumen. Con la fagoterapia en rumen, se puede lograr reducir las infecciones causadas por bacterias, debido a su alta eficiencia que supera a los antibióticos usados en la producción animal, que resultan ineficaces debido al aumento de la resistencia extendida a antibióticos (3). La fagoterapia ha tenido éxitos en el control de otros patógenos en animales como la *E. coli* enteropatógena (53, 54), *S. aureus* (55, 56), *Pseudomonas aeruginosa* (56), y *Enterococcus faecium* (57). Los bacteriófagos en su fase lítica son mejores como alternativa o terapia ante el tratamiento de enfermedades causadas por las bacterias (58). Los bacteriófagos pueden influir en el metabolismo ruminal mediante la lisis selectiva de bacterias (59-61). Al parecer el ecosistema ruminal contiene una población dinámica de bacteriófagos que se mantiene en altas concentraciones y pueden causar una reducción en la eficiencia de la conversión de alimento en el rumiante, debido a una disminución del

alimento degradado que guarda una relación directamente proporcional con la población de bacterias (e.j. celulolíticas, fibrolíticas) (62). Los bacteriófagos ayudan a mantener la diversidad de microorganismo en equilibrio, como *E. coli* O157: H7 en los rumiantes y permiten que microorganismos nativos tengan una rápida adaptación frente a cambios de la dieta (19, 63-65). En condiciones *in vitro* y bajo la presencia de fago e11 / 2, el número de *E. coli* O157: H7 fue reducido ( $P < 0,05$ ) por debajo del límite de detección en 1 h de incubación (106 UFC/mL disminuyó a 101 UFC/mL), en las mismas condiciones el fago e4/1c presentó una reducción ( $P < 0,05$ ) de la concentración de *E. coli* O157: H7 en 2 h de incubación (106 UFC/mL disminuyó a 103 UFC/mL). En condiciones *in vitro*, los resultados demuestran la eficacia de los bacteriófagos en el control de la cepa de *E. coli* O157: H7. La dosis y la vía de administración de los bacteriófagos en condiciones *in vivo*, son factores a tener en cuenta para optimizar el efecto sobre la población de bacterias patógenas (18). En un sistema de rumen artificial con una población inicial de 104 UFC mL<sup>-1</sup> de *E. coli* O157: H7 cepa 3081 fue eliminada 4 h después de la inoculación de 105 UFP del fago DC22 La actividad lítica del bacteriófago DC22 fue observada en las cepas O55:H7 EC990984 (*E. coli* Enteropatógena) y O157:H7 1879S (productora de verocitotoxina; Bach et al., 2003). El descenso en el número de DC22 indica que el fago no se replicó y por lo tanto no produjo partículas infecciosas, se ha informado que este proceso se presenta cuando las bacterias son atacadas por un número muy alto de fagos. Otros factores pueden intervenir en esta interacción, es así como, animales alimentados una vez al día presentan una variación diurna de la población de bacteriófagos asociados a la variación en la concentración de bacterias ruminales. Es probable que el aumento en el número de bacteriófago este asociado a que algún componente de la dieta puede inducir la fase lisogénica facilitando la proliferación de bacterias que posteriormente induce la fase lítica. La disminución de la población de bacteriófagos a las dos horas después de la alimentación, se asocia al incremento de sustratos proteicos con afinidad a los receptores de la pared celular bacteriana usados también por los bacteriófagos (65). La fagoterapia puede ser efectiva en el control de microorganismos patógenos, que logren establecerse en el rumen. El entendimiento de esta interacción entre la bacteria y bacteriófago, puede generar una alternativa en donde la modificación de los periodos de alimentación no limiten la acción de los bacteriófagos por bloqueo (por parte de los sustratos degradados) a los receptores integrados a membrana o proteínas señalizadoras de las bacterias blanco. La utilización de bacteriófagos para el control de *E. coli* O157:H7, permite mejorar el desarrollo productivo del animal, ya que al ser eliminada del rumen, aumenta el alimento para la población nativa e ideal de microorganismos. Como efecto indirecto de esta interacción, al no usar antibióticos para el tratamiento de microorganismos patógenos, la fisiología del rumiante no es alterada por efectos como la disminución en el consumo de alimento que ocurre debido a la disminución parcial de la concentración de bacteria ruminales (66-68). Comprender la interacción entre *S. bovis* y sus bacteriófagos, puede generar una alternativa de prevención de la ARS, evitando así los trastornos metabólicos que afecta el rendimiento productivo de las vacas lecheras. La regulación en la población de esta bacteria, por los bacteriófagos en condiciones *in vitro*, debe ser evaluada en condiciones productivas, con el fin estudiar y comprender los otros mecanismo fisiológicos que pueden intervenir en esta interacción (69).

### Conclusiones

La presencia de material genético viral en las bacterias evaluadas puede indicar que este material es un constituyente normal o por lo menos común en el genoma de las bacterias ruminales. Además el intercambio de material genético durante el proceso de lisis de la bacteria, sumado, al proceso de transducción a otros hospedantes, es un indicio de que

los bacteriófagos probablemente participen en la transducción de información genética con el fin de compartir patrones de resistencia, manteniendo así un grupo de bacterias adaptadas a la variación ambiental. La interacción entre *S. bovis* y sus bacteriófagos, puede ser una alternativa de prevención y reducción de la ARS, evitando así el trastorno metabólico que afecta el rendimiento productivo de las vacas lecheras.

### Referencias

1. Kamra D. N. 2005 Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 89: 124-135.
2. Wright, A.G. and A.V. Klieve. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 248-253.
3. Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow P., Hagens S. and Harper D.R. 2010. Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology* 51: 363-369.
4. Donald, I.E. & M. Paynter, J.B. 1980. Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated-sludge treatment process. *Applied and Environmental Microbiology* 39:(3);576-583.
5. Klieve, A. V., and T. Bauchop. 1988. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1637-1641.
6. Paynter, M. J. B., D. L. Ewert, and W. Chalupa. 1969. Some morphological types of bacteriophages in bovine rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology* 18:942-943.
7. Rasmussen, M.A., Cray, W.C., Casey, T.A. and Whipp, S.C. 1993. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 114: 79-84.
8. Grauke, L.J., Kudva, I.T., Yoon, J.W., Hunt, C.W., Williams, C.J. & Hovde, C.J. 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2269-2277.
9. Frenzen, P.D., Drake, A. & Angulo, F.J. 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *Journal of Food Protection* 68: 2623-2630.
10. LeJeune, J. T., T. E. Besser, D. H. Rice, J. L. Berg, R. P. Stilborn, & D. D. Hancock. 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: Predominance and persistence of specific clonal types despite massive cattle population turnover. *Applied and Environmental Microbiology* 70:377-384.
11. Besser, T. E., J. T. LeJeune, D. H. Rice, J. Berg, R. P. Stilborn, K. Kaya, W. Bae, and D. D. Hancock. 2005. Increasing prevalence of *Campylobacter jejuni* in feedlot cattle through the feeding period. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5752-5758.
12. Zhao, S., P. F. McDermott, S. Friedman, J. Abbott, S. Ayers, A. Glenn, E. Hall-Robinson, S. K. Hubert, H. Harbottle, R. D. Walker, T. M. Chiller, and D. G. White. 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. *Foodborne Pathogen Disease*. 3:106-117.
13. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science* 43: 910-929.
14. Liu, D., Zhou, X. L., Zhao, P.T., Gao, M., Han, H.G., Hu, H.L. 2013. Effects of increasing non-fiber carbohydrate to neutral

- detergent fiber ratio on rumen fermentation and microbiota in goats. *Journal of Integrative Agriculture* 12 (2):319-326.
15. Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science* 76:275-286.
16. Calsamiglia, S., Blanch M., Ferret A., Moya D. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology* 172:42–50.
17. Britton, R. A. 1991. D-Lactic Acidosis, myth or fact. Animal Science Department, University of Nebraska-Lincoln. Ed. Elanco Products Company.
18. Rivas L. Coffey B., McAuliffe O., McDonnell M. J., Burgess C. M., Coffey A., Ross, R.P. & Duffy G. 2010. In Vivo and Ex Vivo Evaluations of Bacteriophages e11/2 and e4/1c for Use in the Control of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (21): 7210–7216.
19. Raya, R. R., Varey, P., Oot, R. A., Dyen, M. R., Callaway, T. R., Edrington, T. S., Kutter E. M. & Brabban A. D. 2006. Isolation and Characterization of a New T-Even Bacteriophage, CEV1, and Determination of Its Potential To Reduce *Escherichia coli* O157:H7 Levels in Sheep. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9):6405- 6410.
20. Ambrožič, J., Ferme, D., Grabnar, M., Ravnikar, M., Ayguštin, G., 2001. The Bacteriophages of Ruminant *Prevotellas*. *Folia Microbiology* 46 (1) : 37-39.
21. Bach, S. J., Mcallister, T. A., Veira, D. M., Gannon, V. P.J., Holley R. A. 2003. Effect of bacteriophage DC22 on *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial rumen system (Rusitec) and inoculated sheep. *Animal research* 52:89–101.
22. Štyriak, I., Gálfı . P and Kmeť .V. 1991. Preliminary observations of interaction between bacteriophages and *Streptococcus bovis* bacteria on ruminal epithelium primoculture. *Veterinary Microbiology* 29 :281-287.
23. Štyriak, I., Pristaš . P and Javorský. 1998. Lack of Surface Receptors not Restriction-Modification System Determines F4 Phage Resistance in *Streptococcus bovis* II/1. *Folia Microbiology* 43 (1), 35-38.
24. Štyriak I., Španová A. and Žitňan. R. 2005. Partial characterization of two ruminal bacteriophages with similar restriction patterns and different capsids morphology. *Archiv Tierzucht* 48 (6): 572-579.
25. Klieve, A. V. & Bauchop, T. 1988. Morphological Diversity of Ruminant Bacteriophages from Sheep and Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (6): 1637-1641.
26. Koskella, B. & Meaden, S. 2013. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses* 5: 806-823.
27. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G. 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (3): 649-659.
28. Harper, D.R. and Kutter, E. 2008. Bacteriophage: therapeutic uses. In *The Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons.
29. d'Herelle, F. 1919. Sur le role du microbe bacteriophage dans la typhose aviare. *Comptes rendus Acad Sci Paris* 169: 932–934.
30. Alisky, J., K. Iczkowski, A. Rapoport, and N. Troitsky. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *Journal of Infection* 36:5–15.
31. Fischetti V. A. 2010. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 357–362.
32. Russel, M., Linderoth, N.A., Sali, A. 1997. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* 192:23-32.
33. Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Gorski, A. 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agent. *Experimental Biology and Medicine* 231:366-77.
34. Young, R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *FEMS Microbiology Reviews* 56:430-81.
35. Loessner, M.J., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S. 2002. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology* 44:335-49.
36. Meyer, J.R., Dobias, D.T., Weitz, J.S., Barrick, J.E., Quick, R.T., Lenski, R.E. 2012. Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science* 335: 428–432.
37. Hyman, P., Abedon, S.T. 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology* 70: 217–248.
38. Miklič, A., Rogelj, I. 2003. Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. *International Journal of Food Science & Technology* 38: 305–311.
39. Vos, M., Birkett, P.J., Birch, E., Griffiths, R.I., Buckling, A. 2009. Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil. *Science* 9: 325, 833.
40. Koskella, B., Thompson, J.N., Preston, G.M., Buckling, A. 2011. Local biotic environment shapes the spatial scale of bacteriophage adaptation to bacteria. *The American Naturalist* 177: 440–451.
41. Hall, A.R., Scanlan, P.D., Morgan, A.D., Buckling, A. 2011. Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecology Letters* 14: 635–642.
42. Klieve, A. V., Hudman, J. F. & Bauchop, T. 1989. Inducible Bacteriophages from Ruminant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (6): 1630-1634.
43. Chen, J., Novick, R.P. 2009. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* 323: 139–141.
44. Mazaheri Nezhad Fard, R. Barton, M., Heuzenroeder, M. 2011. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letters in Applied Microbiology* 52: 559–564.
45. Beumer, A., Robinson, J.B. 2005. A Broad-Host-Range, Generalized Transducing Phage (SN-T) Acquires 16S rRNA Genes from Different Genera of Bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 71: 8301–8304.
46. Adams M.H. 1959. *Bacteriophages*, Interscience Publishers, Inc., New York, 592 p.
47. Hadas, H., Einav, M., Fishov, I., Zaritsky, A. 1997. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology* 143: 179–185.
48. Henning, U. & Hashemolhosseini, S. 1994. Receptor recognition by T-even-type coliphages. In *Molecular Biology of Bacteriophage T4* ed. Karam, J.D. pp. 291–298.

49. Goodridge, L., Gallaccio, A. and Griffiths, M.W. 2003. Morphological, host range, and genetic characterization of two coliphages. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5364–5371.
50. Fenton, M., Ross, P., McAuliffe, O., O'Mahony J. & Coffey, A. 2010. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs* (1) 1: 9-16.
51. Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y. and Unno, H. 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 280–287.
52. Sheng, H., Knecht, H. J., Kudva, I. T. & Hovde C. J. 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5359–5366.
53. Barrow, P., M. Lovell, and A. Berchieri, Jr. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5:294–298.
54. Smith, H. W., & M. B. Huggins. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology* 129:2659–2675.
55. Matsuzaki, S., M. Yasuda, H. Nishikawa, M. Kuroda, T. Ujihara, T. Shuin, Y. Shen, Z. Jin, S. Fujimoto, M. D. Nasimuzzaman, H. Wakiguchi, S. Sugihara, T. Sugiura, S. Koda, A. Muraoka, and S. Imai. 2003. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *The Journal of Infectious Diseases*. 187:613–624.
56. Soothill, J. S. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology* 37:258–261.
57. Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul, A. N. Trostel, B. Powell, R. Carlton, & C. R. Merrill. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity* 70:204–210.
58. Hodgson, K. 2013. Bacteriophage therapy. *Under the Microscope*. 2: 10-20.
59. Iverson, W. G., & Millis, N. F. 1976. Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. *Canadian journal of microbiology*, 22(7), 1040-1047.
60. Iverson, W. G., & Millis, N. F. 1976. Characterization of *Streptococcus bovis* bacteriophages. *Canadian journal of microbiology*, 22(6), 847-852.
61. Iverson, W. G., & Millis, N. F. 1976. Lysogeny in *Streptococcus bovis*. *Canadian journal of microbiology*, 22(6), 853-857.
62. Klieve, A.V., & Rosalind, A.S. 1993. Estimation of Ruminal Bacteriophage Numbers by Pulsed- Field Gel Electrophoresis and Laser Densitometry. *Applied and Environmental Microbiology* 7: 2299-2303.
63. Swain, R. A., Nolan, J. V., & Klieve, A. V. 1996. Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 62(3), 994-997.
64. Klieve, A. V., Swain, R. A., & Nolan, J. V. 1996. Bacteriophages in the rumen: types present, population size and implications for the efficiency of feed utilization. In *Proceedings-australian society of animal production*. 21;92-94.
65. Rosalind, A. S., Nolan, J. V., & Klieve A. V. 1996. Natural Variability and Diurnal Fluctuations within the Bacteriophage Population of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 994–997.
66. Donovan, D.M., Lardeo, M., Foster-Frey, J. 2006. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiology Letters* 265:133-9.
67. Obeso, J.M., Martinez, B., Rodriguez, A., García, P. 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 128:211-8.
68. Wellenberg, G.J., Van der Poel, W.H., Van Oirschot, J.T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology* 88: 27-45.
69. Fineran, P.C.; Petty, N.K.; Salmond, G.P.C. Transduction: Host DNA Transfer by Bacteriophages. In *The Encyclopedia of Microbiology*; Schaechter, M., Ed.; Elsevier, 2009.