



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES SOBRE LA VIABILIDAD Y ACTIVIDAD DE UNA BACTERIA RUMINAL CELULOLÍTICA CONSERVADA POR LIOFILIZACIÓN

JOSÉ CARLOS ESCOBAR ESPAÑA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **Evaluación de dos crioprotectores sobre la viabilidad y actividad de una bacteria ruminal celulolítica conservada por liofilización**, realizada por el alumno: **José Carlos Escobar España** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Ph. D. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR

Ph. D. JOSÉ RICARDO BARCENA GAMA

ASESOR

DR. JAVIER PILONI MARTINI

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre del 2015.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE DOS CRIOPROTECTORES SOBRE LA VIABILIDAD Y ACTIVIDAD DE UNA BACTERIA RUMINAL CELULOLÍTICA CONSERVADA POR LIOFILIZACIÓN

José Carlos Escobar España, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

El uso de crioprotectores en la conservación de microorganismos es importante para preservarlos por largo tiempo utilizando la liofilización. Se evaluó el efecto de la centrifugación (FRC) en fluido ruminal fresco (FRF) para usarlo como inoculo bacteriano, así mismo, se utilizó un grupo control (T), Dimetilsulfoxido (DMSO) y Carbón Activado (CA) como crioprotectores en bacterias ruminales totales con capacidad de degradar celulosa y se liofilizó, posteriormente se reactivó y se evaluó por medio de una prueba de degradación *in vitro* de pasto Bermuda y producción de ácidos grasos volátiles. El diseño estadístico utilizado fue completamente al azar. El pH en el FRC fue diferente ($p \leq 0.05$) de FRF, en las variables concentración de bacterias ruminales totales, celulolíticas y potencial óxido-reducción no se presentaron diferencias respectivamente para FRF y FRC. El pH y la producción de ácidos grasos volátiles totales no se ven afectadas con la inclusión de los lioprotectores ($p > 0.05$) con respecto al testigo, pero la variable concentración de bacterias se afecta ($p \leq 0.05$) con la inclusión de estos, sin embargo el % DEGMS fue diferente ($p \leq 0.05$) con carbón activado (CA) con respecto al testigo y el dimetilsulfoxido (DMSO). El potencial redox se ve modificado con la inclusión del DMSO causando diferencias ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo y CA.

Palabras claves: liofilización, DMSO, carbón activado, agentes crioprotectores bacterias ruminales totales.

ABSTRACT

EVALUATION OF TWO CRYOPROTECTANTS ON THE VIABILITY AND ACTIVITY OF RUMEN BACTERIA CELLULOLYTIC PRESERVED BY LYOPHILIZATION

Jose Carlos Escobar España, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

The use of cryoprotectants in preserving microorganisms is important in order to preserve for a long time using lyophilization. The effect of centrifugation (FRC) in fresh rumen fluid (FRF) was evaluated for use as a bacterial inoculum, also, a control group (T), dimethyl sulfoxide (DMSO) and activated carbon (AC) was used as cryoprotectants in total rumen bacteria capacity to degrade cellulose and lyophilized subsequently reactivated and evaluated by a test *in vitro* degradation of Bermuda grass and volatile fatty acids. The experimental design was completely random. The pH in the FRC was different ($p \leq 0.05$) FRF variables in the concentration of total rumen bacteria, cellulolytic and not redox potential differences respectively for FRF and FRC were presented. The pH and total production of volatile fatty acids are not affected by the inclusion of lyoprotectants ($p > 0.05$) compared the control but the variable concentration of bacteria is affected ($p \leq 0.05$) including not to mention the % DEGMS was different ($p \leq 0.05$) with activated charcoal (AC) compared with the control and dimethyl sulfoxide (DMSO). The redox potential is modified with the addition of DMSO causing differences ($p \leq 0.05$) compared with the control and CA.

Keywords: freezing-drying, DMSO, activated charcoal, total rumen bacteria, cryoprotectants.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado una beca económica para el desarrollo de mis estudios.

Al Ph. D. Mario Antonio Cobos Peralta, por aceptarme bajo su consejería, brindarme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana bajo su dirección y por todos sus consejos.

A los integrantes del comité: Ph. D. José Ricardo Bárcena Gama, Dr. Javier Piloni Martini, por su apoyo y amistad, muchas gracias.

A todos los profesores de Ganadería, que fueron parte del proceso de mi formación.

Al Jefe de laboratorio Sr. Agustín Hernández Romero, por su apoyo y amistad muchas gracias, al auxiliar de laboratorio Sr. Jorge Ayala y Braulio Cervantes García por su apoyo y amistad. Gracias

DEDICATORIA

A Dios, en el cual me he apoyado, gracias por acompañarme y estar al lado de mi familia.

A mi madre Rosalba España Escobar, por su apoyo incondicional, gracias madre. Te amo.

A mis Hermanos Sergio y Ana Fabiola Escobar España, de corazón, gracias.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Ruminal: M.C. Diego Felipe, M.C. Iván, M.C. Karim Roberto; por esos momentos de trabajo arduo, gracias por permitirme conocerlos y fincar tan bonita amistad, Doctores en formación.

A las Doctoras Guadalupe y Mayra Iliana por su amistad y apoyo durante mi estancia en laboratorio. Y al Doctor Paulino Sánchez Santillán por su amistad y experiencia transmitida en el laboratorio y apoyo para el desarrollo de mi tesis. Gracias. Y a todos los amigos a lo largo de mi estancia, Francisco Javier, Angélica Wendoli, Rafa, Jerónimo, Charly, Marcos y muchos más.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Montecillos, por brindarme tan valiosa oportunidad de formarme en sus aulas y laboratorios.

Muy especialmente:

A mi esposa **Marisol Domínguez Vázquez**, por todos los momentos tristes y alegres, por estar ahí en el momento oportuno, por tu valioso apoyo para culminar esta etapa de mi vida, y más especialmente, por darme y cuidar este tiempo de nuestro hijo **José Carlos Escobar Domínguez**, para ustedes y por ustedes, con todo mi amor y cariño, los amo. Gracias mis amores.

CONTENIDO

RESUMEN	III
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA.....	VI
CONTENIDO.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Conservación de cultivos microbianos.....	3
2.1.1. Liofilización.....	4
2.1.2. Congelación	5
2.2. Uso de crioprotectores en la conservación de microorganismos.....	7
2.2.1. Carbón activado	8
2.2.2. Dimetilsulfoxido (DMSO)	8
2.2.3. Carbohidratos.....	9
2.3. Literatura citada:	9
3. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DEL FLUIDO RUMINAL FRESCO (FRF) Y CENTRIFUGADO (FRF) PARA USARSE COMO FUENTE DE INÓCULO	14
3.1. Resumen	14
3.2. Abstract.....	15
3.3. Introducción	16
3.4. Materiales y métodos.....	17
3.4.1. Variables a evaluar	17
3.4.2. Obtención y preparación del inoculo	17
3.4.3. Preparación de medios de cultivos para la prueba celulolítica.....	18
3.4.4. Estimación de la concentración de bacterias ruminales totales en el FRF y FRC.....	19
3.4.5. Prueba de Número Más Probable (NMP).....	20
3.4.6. Análisis estadístico.....	21
3.5. Resultados.....	21

3.5.1. Evaluación de fluido ruminal fresco y después de centrifugado	21
3.6. Discusión	22
3.7. Conclusiones	24
3.8. Literatura citada	24
4. CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN CON DOS LIOPROTECTORES SOBRE LA VIABILIDAD Y ACTIVIDAD DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS RUMINALES TOTALES	26
4.1. Resumen	26
4.2. Abstract.....	27
4.3. Introducción	28
4.4. Materiales y métodos.....	29
4.4.1. Identificación de los tratamientos y variables a evaluar	29
4.4.2. Preparación del inóculo.....	30
4.4.3. Medición de pH, potencial de óxido reducción y concentración de bacterias ruminales totales, del FRF y FRC.....	30
4.4.4. Determinación de la producción de material liofilizado por mL de cultivo.....	31
4.4.5. Proceso de conservación por el método de liofilización	31
4.4.6. Preparación de medios de cultivo para diversas pruebas	32
4.5. Reactivación de los liofilizados con y sin lioprotector.....	33
4.5.1. Hidratación de los tratamientos liofilizados	33
4.5.2. Prueba del Número Más Probable (NMP).....	34
4.5.3. Prueba de degradación <i>in vitro</i> del pasto Bermuda (<i>Cynodon dactylon</i>).....	34
4.5.4. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)	35
4.5.5. Análisis estadístico.....	36
4.6. Resultados.....	36
4.6.1. Diferencias entre el fluido ruminal antes y después de centrifugar	36
4.6.2. Estimación de la eficiencia de liofilizado por cada 100 mL de medio producido	37
4.6.3. Medición de la concentración bacterias totales, celulolíticas, pH y potencial redox del liofilizado hidratado.	38
4.6.4. Prueba de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca de pasto Bermuda ...	39
4.6.5. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)	40

4.7. Discusión	41
4.8. Conclusiones	45
4.9. Literatura citada	46
5. CAPÍTULO 4. EFECTO DEL TIEMPO DE HIDRATACIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS RUMINALES LIOFILIZADAS CON Y SIN LIOPROTECTORES	48
5.1. Resumen	48
5.2. Abstract.....	49
5.3. Introducción	50
5.4. Materiales y métodos.....	51
5.4.1. Variables a evaluar	51
5.4.2. Preparación de medios de cultivo	51
5.4.3. Proceso de hidratación del liofilizado	52
5.4.4. Estimación de la concentración de bacterias totales.....	53
5.4.5. Análisis estadístico.....	53
5.5. Resultados.....	54
5.5.1. Estimación de la concentración de bacterias en base a diferentes tiempos de hidratación	54
5.5.2. Comportamiento de las concentraciones de bacterias totales a diferentes horarios	55
5.6. Discusión	56
5.7. Conclusión	57
5.8. Literatura citada	58
6. CAPÍTULO 5. DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA MATERIA SECA DEL PASTO BERMUDA (<i>CYNODON DACTYLON</i>) INOCULADO CON BACTERIAS RUMINALES TOTALES LIOFILIZADAS CON Y SIN LIOPROTECTORES	60
6.1. Resumen	60
6.2. Abstract.....	61
6.3. Introducción	62
6.4. Materiales y métodos.....	63
6.4.1. Variables a evaluar:.....	63
6.4.2. Medios de cultivos utilizados en la prueba de degradación	63

6.4.3. Prueba de degradación	64
6.4.4. Medición de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV)	65
6.4.5. Análisis estadístico	65
6.5. Resultados	66
6.5.1. Evaluación de la viabilidad y actividad del inóculo fluido ruminal reactivado, y concentración de AGV.	66
6.6. Discusión	68
6.7. Conclusiones	69
6.8. Literatura citada	70
7. CONCLUSIONES GENERALES	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo anaerobio celulolítico.....	19
Cuadro 2. Diferencias entre el fluido ruminal fresco (FRF) y centrifugado (FRC)..	22
Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo anaerobios.....	33
Cuadro 4. Diferencias entre el Fluido Ruminal antes (FRF) y después de Centrifugarlo (FRC).....	37
Cuadro 5. Eficiencia de liofilizado por cada 100 mL de medio producido.	37
Cuadro 6. Concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas, pH y redox del liofilizado hidratado al momento de inocular.....	39
Cuadro 7. Efecto de los lioprotectores en el inóculo fluido ruminal sobre las variables de degradación <i>in vitro</i>	40
Cuadro 8. Participación de los ácidos acético, propiónico y butírico en la concentración final de ácidos grasos volátiles (%)	41
Cuadro 9. Composición del medio de cultivo para la hidratación de liofilizado anaerobio.....	52
Cuadro 10. Concentración de bacterias totales en la hidratación de fluido ruminal liofilizado con diferentes lioprotectores.....	55
Cuadro 11. Concentración de bacterias totales a diferentes tiempos de hidratación de liofilizado.....	55
Cuadro 12. Composición del medio de cultivo para degradación anaerobio.	64
Cuadro 13. Efecto de los lioprotectores en el inóculo fluido ruminal sobre las variables de degradación <i>in vitro</i>	67

Cuadro 14. Participación de los ácidos acético, propiónico y butírico en la concentración final de ácidos grasos volátiles (mM). 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de bacterias ruminales totales en hidratación durante 24 h 56

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las técnicas para mantener y preservar microorganismos que aseguren su disponibilidad para su uso práctico en investigación y estudios taxonómicos, se han incrementado en años recientes (Hasegawa, 1996). La liofilización, comparada con la criopreservación, es mucho más económica y fácil de operar, (Andersen, 1996). La liofilización es un método para la conservación de microorganismos que favorece la viabilidad del cultivo para su almacenamiento (Miyamoto-Shinohara, *et al.*, 2010). En la conservación de microorganismos es importante utilizar agentes crioprotectores o lioprotectores, esto depende también del tipo de microorganismo a conservar (Hubálek, 2003). El campo de la biopreservación tuvo sus inicios con la conservación de espermatozoide aviar y la conservación de glóbulos rojos de humano utilizando glicerol como agente crioprotector (Baust, *et al.*, 2009). El dimetilsulfoxido (DMSO) tiene la capacidad de penetrar en la célula, debido a su bajo peso molecular, previniendo la acumulación excesiva de electrolitos, siendo más efectivo como criopreservante comparado con el glicerol, ya que al liofilizar forma una viscosidad, (Lovelock y Bishop, 1959; Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

La concentración de bacterias en rumen es de 10^{10} a 10^{11} g⁻¹ y 10^5 a 10^6 de protozoarios por mL⁻¹ de contenido ruminal. Estos microorganismos tiene la capacidad de degradar el alimento, haciendo disponibles los sustratos para la fermentación y producción de ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄), (Hungate, 1975). Se ha estudiado el ecosistema ruminal, aislando y caracterizando por análisis de secuenciación del gen 16SrRNA (Chandra y Qin, 2012; Ley de-Coss *et al.*,

2013); esto ha dado pauta a preservar y conservar los microorganismos del rumen. Sánchez-Santillán 2014 obtuvo un consorcio de bacterias celulolíticas del rumen, el cual se preservó por liofilización utilizando 0.1 g de carbón activado (CA) como lioprotector donde posteriormente se reactivó y se evaluó realizando una prueba de degradación, el consorcio de bacterias celulolíticas con (CA) degradó 31.82 % y el tratamiento de bacterias celulolíticas sin (CA) degradó 3.20 %. Domínguez-Ordoñez (2014), aisló, caracterizó y conservó de igual forma una arqueobacteria ruminal metanogénica con 0.4 % de (CA) agregado en el medio de conservación antes de la inoculación la cual se reactivó y se evaluó por medio de una prueba de producción de gas (CH₄), el tratamiento con (CA) adicionado antes de la inoculación produjo 32.17 mM de (CH₄) y 4.77 mM de (CO₂). El dimetilsulfoxido (DMSO) ha sido utilizado en un 5% como crioprotector de bacterias fibrolíticas *Fibrobacter succinogenes* aislada del rumen, después de quince días de conservación por congelación la concentración de bacterias viables es de 6.15 y 9.26X10⁸ UFC mL⁻¹ mostrando una reducción de 3.1 y 3.25X10⁸ UFC mL⁻¹ con la concentración inicial (Arcos, *et al.*, 2004).

El propósito de este trabajo fue evaluar dos crioprotectores, el (DMSO) y el (CA) como agentes de conservación en bacterias ruminales totales por liofilización en la viabilidad y actividad, debido a esto se establece la presente investigación donde en el capítulo 1, se presenta una revisión de literatura referente a los diferentes procesos de conservación y agentes crioprotectores más utilizados; en el capítulo 2, se describe el efecto de la centrifugación en fluido ruminal fresco para la obtención de bacterias ruminales totales como inóculo; así mismo, en el capítulo 3 se presenta el efecto de dos lioprotectores sobre la viabilidad y actividad de un consorcio de bacterias ruminales

totales liofilizadas; en el capítulo 4 se describe la forma de cómo se estimó el tiempo de hidratación en relación a la concentración de bacterias ruminales totales y, en el capítulo 5, se presentan los resultados de una prueba de degradación de materia seca (% DEGMS) *in vitro*, inoculando con bacterias ruminales totales liofilizadas con dos lioprotectores.

2. CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Conservación de cultivos microbianos

La viabilidad de los cultivos depende del método de conservación, en diversos microorganismos el método de conservación debe garantizar su estabilidad genética por largo tiempo, ya que en los laboratorios y muchas áreas de investigación los cultivos o cepas bacterianas son de suma importancia para la investigación o para generar productos biológicos (Rojas-Tapias *et al.*, 2013). En el área de investigación y en la industria, se deben preservar todas aquellas cepas que cuenten con un alto potencial de uso y conservarse sin sufrir cambios fenotípicos y genéticos (Zamora, 2003). Los principales métodos de conservación son el crecimiento continuo, secado (liofilización) y congelación; en el método de crecimiento continuo se utilizan siembras en agar para su uso continuo, no se pueden almacenar más de 30 días, se hacen resiembras o transferencias en agares nuevos para mantener la continuidad. El método del secado se usa más en hongos, esporas u otras estructuras en reposo, los sustratos más utilizados en este proceso son el gel de sílice, perlas de vidrio y suelos, otros métodos son la congelación, liofilización, crioconservación, conservación en nitrógeno

líquido o congeladores de baja temperatura; el proceso de liofilización es muy versátil para preservar bacterias, actinomicetos, levaduras y hongos (Weng, 2005; Kumar *et al.*, 2013). El proceso de liofilización, es más utilizado para evitar altos costos y un arduo trabajo de laboratorio para mantenerlos bajo subcultivos seriados (Malik y Lang, 1996), los procesos de conservación minimizan al máximo el riesgo de un cambio genético en las células y se mantienen viables por 10 años (Weng, 2005), mucho conocimiento se ha generado de forma empírica, de tal forma que todavía hay mucho que explorar en la preservación de bacterias (Morales-García *et al.*, 2010). Es necesario que se pueda asegurar la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética de un cultivo para poder utilizarlo en un futuro en producción y poder mantener así las características principales de la cepa original (Gato, 2010; Kumar *et al.*, 2013), el mantenimiento *in vitro* de cultivos activos requiere una cantidad considerable de trabajo, y ocasiona inestabilidad genética de los aislados microbianos; se han desarrollado nuevas metodologías como la congelación de cultivos a -20 °C o -40 °C y la preservación en nitrógeno líquido a -196 °C,(Arcos *et al.*, 2004).

2.1.1. Liofilización

La liofilización es el método de preservación de microorganismos más utilizado en las diferentes áreas de la investigación (Sakane, 1992; Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006; Celik y O'Sullivan, 2013;). La liofilización extrae el agua de los alimentos, proteínas, sustancias de interés farmacéutico, y células para mantener su estabilidad a temperatura ambiente (Morales-García *et al.*, 2010), es un método de conservación a largo plazo, esto es una de las grandes ventajas contra el método por congelación, (Zhou *et al.*, 2006). Consiste principalmente en extraer por

sublimación, bajo condiciones de alto vacío, el agua de las células congeladas, ya que está pasa directamente a un estado de vapor, debido a que no hay presión molecular que lo impida (Perry, 1998; Morales-García *et al.*, 2010); las soluciones a liofilizar son congeladas previamente, posteriormente son expuestas al proceso de liofilización (vacío) donde el vapor de agua es extraído por un condensador de refrigeración, lo que provoca la evaporación del hielo con la siguiente pérdida de calor que produce el proceso (McLellan y Day, 1995; Morales-García *et al.*, 2010). En el proceso de la liofilización la fase de congelación del cultivo se puede realizar rápidamente o lentamente; sin embargo se deben usar lioprotectores como la leche descremada y carbohidratos como la glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, (Kanmani *et al.*, 2011), el glicerol no se debe ocupar en la liofilización por su elevado punto de evaporación y su higroscopicidad que hace que el líofilo quede viscoso, y el DMSO porque es tóxico y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas (García y Uruburu, 2000). Los lioprotectores deben garantizar tasas de supervivencia de los microorganismo en los medios a preservar (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006), la liofilización es el método que la Culture Collection Worldwide (WFCC), incluyendo la American Culture Collection (ATTC) y la National Collection of Type Culture (NCTC) por décadas han preferido usar (Morgan *et al.*, 2006).

2.1.2. Congelación

La criobiología es el área que busca entender los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas o medios celulares, ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico, puesto

que enlentece estas reacciones (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). La congelación es un método físico químico que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos (Consuelo *et al.*, 2005). Los diferentes métodos de criopreservación como la congelación ultrarrápida y la vitrificación se pueden clasificar de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento, en los protocolos de congelación lenta-descongelación lenta, congelación lenta-descongelación rápida, así la adición de crioprotectores se puede hacer por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable (Hubálek, 2003; Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Gato, 2010). Existen diversos factores que deben ser tomados en cuenta, relacionados con la adaptación bacteriana al proceso de congelación, como el microambiente, membrana citoplasmática, estrés bacteriano, (Consuelo *et al.*, 2005). En la criopreservación a -70 °C a diferencia de la liofilización, este proceso es más rápido con baja contaminación, poco laborioso, económico y mantiene las propiedades genéticas de los microorganismos (Parra *et al.*, 2006). Los investigadores han estudiado el uso de diferentes aditivos protectores en el medio de cultivo, esto para reducir la tasa de muerte de los microorganismos que se preservaran durante su almacenaje, por medio de la congelación (Gibson *et al.*, 1966); tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, se requiere del uso de ultracongeladores que conserven a las células a -80 °C, este método es usado en los laboratorios a nivel mundial por su fácil manejo, y preservar microorganismos por congelación, el método consiste en cultivar al microorganismo en cuestión y se deja crecer hasta la fase estacionaria temprana, las células se lavan o no con una solución buffer y después se les adiciona un volumen de suspensión que contiene una sustancia

que funciona como protectora de las células a la congelación, protegiendo la célula de la formación de cristales de hielo con un grado bajo de toxicidad, estas sustancias son agentes crioprotectores (Hubálek, 2003; Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013).

2.2. Uso de crioprotectores en la conservación de microorganismos

Los crioprotectores impiden por interacción molecular con el agua, la destrucción de la célula por el congelamiento, la protegen de la formación de hielo con grado bajo de toxicidad para las células vivas, las propiedades fisicoquímicas de los crioprotectores confieren afinidad por el agua molecular y de esa forma atrapan la molécula de agua en su interior, lo que a su vez impide que formen cristales geométricos ordenados en el interior de la célula, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y las sustancias protectoras toma el carácter de sustancia vítrea protectora (Consuelo *et al.*, 2005). Actualmente hay muchos compuestos que pueden ser usados como crioprotectores, quizá uno de los más utilizados es el glicerol, en una concentración de 15 a 20%, el dimetilsulfoxido en concentraciones que van de 3% a 15%, leche descremada, y algunos carbohidratos como la glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, (García y Uruburu, 2000). Los crioprotectores se pueden dividir por su bajo peso molecular y permeabilidad a través de la membrana como penetrantes y no penetrantes por su alto peso molecular y efectividad a altas velocidades de congelamiento, (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

2.2.1. Carbón activado

El carbón activado es un sólido donde el proceso de absorción se describe como la transferencia de un soluto en un gas o líquido (adsorbato) hacia la superficie de un sólido (adsorbente) en donde el soluto es retenido como resultado de atracciones intermoleculares con las moléculas sólidas (Méndez *et al.*, 2002), así mismo, se puede utilizar como un crioprotector de bacterias anaeróbicas, conservadas en medio líquido, mejorando los resultados de los agentes crioprotectores más comúnmente usados, se puede agregar de 5 a 10% relación peso/volumen de carbón activado, puede ser una mezcla con algún otro crioprotector 5% de carbón activado más 5% de otro crioprotector (Malik, 1990).

2.2.2. Dimetilsulfoxido (DMSO)

El DMSO es un líquido transparente, sin color y con un ligero olor a acre, fue aislado en 1867 por el Dr. Alexander Saytzeff un químico Ruso, como subproducto de las industrias del papel y la madera, se extrae de forma natural de las ligninas, una las fibras de la madera, se fabrica fácilmente en el laboratorio a partir de productos químicos orgánicos, su fórmula química es $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Davis, 1984; Wang, *et al.*, 2010). Las características crioprotectoras y su uso, fueron descubiertos por primera vez en la conservación de los glóbulos rojos humanos utilizando 5, 10 y 15% en relación peso/volumen (Lovelock y Bishop, 1959); también se ha usado comúnmente en la conservación de embriones de peces en una relación volumen/volumen desde 5% hasta 30% (Zhang *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2008;), nematodos 0.5%, 2% y en concentraciones finales de 12.5 mg/L (Wang *et al.*, 2010). Se conservó por

congelamiento a -80 °C en nitrógeno líquido usando como crioprotector 5% de DMSO con dos tipos de medios de cultivo (Hoefman *et al.*, 2013). En bacterias aeróbicas *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Corynebacterium* y *E. coli* se puede inhibir la actividad de crecimiento con la inclusión del 10% de DMSO pero no sucede en anaerobios (Hubálek, 2003).

2.2.3. Carbohidratos

La glucosa, lactosa, sacarosa, inositol (polialcohol) son algunos de los carbohidratos más utilizados como crioprotectores (García y Uruburu, 2000; Ávila-Portillo *et al.*, 2006), los mecanismos de acción que se ejercen en la protección no se comprenden en su totalidad, se puede deber a la combinación de muchos factores (Kurtmann *et al.*, 2009), estos carbohidratos pueden proteger a la célula por la sustitución del puente de hidrogeno que se pierde en el proceso de liofilizado, la humedad puede colapsar la matriz viscosa obtenida (Miao *et al.*, 2008). En un medio de cultivo de protección se utilizó 200 g/L de sacarosa y 0.15 M de NaCl (Passot *et al.*, 2012). La trehalosa y sacarosa pueden aumentar la supervivencia de bacterias, esto se puede deber a la capacidad de los azúcares de descender la temperatura en la fase de transición de la membrana y poder mantener la estructura proteica en estado liofilizado (Leslie *et al.*, 1995).

2.3. Literatura citada:

Arcos M., L., F. Ossa., y T. Díaz E. 2004. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. Rev. Corpoica. Cienc. y Tecnol. Agropecu. 5: 60–63.

- Anderson, R. A. (1996). Algae. In: Maintaining culture for Biotechnology and Industry. Hunter-Cevera, J, and A. Belt. (Eds) Academic Press Limited. United Kindom. P 259. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=fdRYfPJtMx4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Ávila-Portillo, L., M., J. Madero I., C. López., M. León F., L. Acosta., C. Gómez., L. Delgado G., C. Gómez., J. Lozano M., and M. Reguero T. 2006. Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57, 4: 291–300.
- Baust, J. G., D. Gao and J. M. Baust. 2009. Cryopreservation An emerging paradigm change. *Organogenesis*.5:3, 90-96.
- Celik, O. F., and D. J. O’Sullivan. 2013. Factors influencing the stability of freeze-dried stress-resilient and stress-sensitive strains of bifidobacteria. *J. Dairy Sci*. 96: 3506–16
- Chandra, K. D., and W. Qin. 2012. Isolation and characterization of superior rumen bacteria of cattle (*Bos taurus*) and potential application in animal feedstuff. *Open Journal of Animal Sciences*. 2: (4) 224-228.
- Consuelo L., S. Leal., L. Constanza., and C. Ramírez. 2005. Congelación bacteriana : Factores que intervienen en el proceso. *Nova-Publicación Científica* 3: 109–113.
- Davis, P. W. 1984. An Incipient “Wonder Drug” Movement: DMSO and the Food and Drug Administration. *Social. Problems*. 32: 197–212.
- Domínguez-Ordóñez, M. G. 2014. Caracterización fermentativa de biodigestores de cerdaza y aislamiento de una arqueobacteria metanogénica. Tesis de doctorado. Postgrado en Ganadería. Colegio de postgraduados. Montecillos, Edo. De Méx. 90 p.
- García L., M., D., y F. Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Temas de actualidad. SEM Actual*. 30: 12–16.
- Gato C., Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *trichoderma harzianum* rifai. *Fitosanidad* 14: 189–195.
- Gibson, C. A., G. B. Landerkin and P. M. Morse. 1966. Effects of additives on the survival of lactic streptococci in frozen storage. *Appl. Microbio*. 14:665–669.
- Hasegawa, T. 1996. History and Evolution of Culture Maintenance and Preservation Techniques. In: Maintaining culture for Biotechnology and Industry. Hunter-Cevera, J, and A. Belt. (Eds) Academic Press Limited. United Kindom. P 259. Disponible En: https://books.google.com.mx/books?id=fdRYfPJtMx4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Hoefman, S., A. Pommerening-Röser, E. Samyn, P. De Vos, and K. Heylen. 2013. Efficient cryopreservation protocol enables accessibility of a broad range of ammonia-oxidizing bacteria for the scientific community. *Res. Microbiol.* 164:288–292.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46: 205–229.
- Hungate, R. E. 1975. The Rumen Microbial Ecosystem. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6: 39–66.
- Kanmani, P., R. S. Kumar, N. Yuvaraj, K. A. Paari, V. Pattukumar, and V. Arul. 2011. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochem. Eng. J.* 58-59: 140–147.
- Kumar, S., P. Kashyap, R. Singh, and A. Srivastava. 2013. Preservation and Maintenance of Microbial Cultures. In: D. K. Arora, S. Das, and M. Sukumar, editors. *Analyzing Microbes.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 135–152. Disponible en: http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-3-642-34410-7_11
- Kurtmann, L., C. U. Carlsen, L. H. Skibsted, and J. Risbo. 2009. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): Influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol. Prog.* 25: 265–270.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe and L. M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3592–3597.
- Ley de-Coss, A., C. Arce-Espino, M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez y R. Pinto-Ruiz. (2013). Estudio comparativo entre la cepa de *Pediococcus acidilactici* aislada del rumen de borregos y un consorcio de bacterias ruminales. *Agrociencia.* 47: 567-578.
- Lovelock, J. E., and M. W. H. Bishop. 1959. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature.* 183: 1394–1395.
- Malik, K. A. 1990. Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. *Journal of Microbiological Methods.* 12: 117-124.
- Malik, K. A., and E. Lang. 1996. Successful preservation of *Campylobacteraceae* and related bacteria by liquid-drying under anaerobic conditions. *J. Microbiol. Methods* 25: 37–42.

- McLellan, M. R. and J. G. Day. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction Methods Mol. Biol. 38: 1–5. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. J. G. Day, and G. N. Stacy. (Eds) Second edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 347 p.
- Méndez N., R., I., E. Hernández. M., C. Franco. Q., E. Castillo Borges. R., y M. R. Riancho S. 2002. Tratamiento de lixiviados con carbón activado. Ingeniería. 6-3: 19-27.
- Miao, S., S. Mills, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, Y. Roos, and R. P. Ross. 2008. Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. Dairy Sci. Technol. 88: 19–30.
- Miyamoto-Shinohara, Y., F. Nozawa, J. Sukenobe, and T. Imaizumi. 2010. Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid-drying. J Gen. Appl. Microbiol. 56: 107-119.
- Miyamoto-Shinohara, Y., T. Imaizumi, J. Sukenobe, Y. Murakami, S. Kawamura, and Y. Komatsu. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. Cryobiology 41: 251–255.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. De la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez-Terrón, and J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. Biotecnología 14: 11–29.
- Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. J. Microbiol. Methods 66: 183–193.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. Ramos L. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. Appl. Environ. Microbiol. 72:472–477.
- Parra H., S., L., M. M. Pérez C., M. Bernal M., Z. Suárez M., and D. Montoya C. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). Nova 4.
- Passot, S., S. Cenard, I. Douania, I. C. Tréléa, and F. Fonseca. 2012. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. Food Chem. 132: 1699–1705.
- Perry, S. F. 1998. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Mol. Biotechnol. 9: 59–64.
- Rojas-Tapias, D., M. Ortiz-Vera, D. Rivera, J. Kloepper, and R. Bonilla. 2013. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. Univ. Sci. 18: 129–139.

- Sakane, T. 1992. Long-term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying. 16: 281–287.
- Sánchez-Santillán, P. 2014. Aislamiento de una bacteria ruminal celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación in vitro de sustratos celulolíticos. Tesis de Doctorado. Postgrado en Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de Méx. 94 p.
- Wang, X., X. Wang, L. Li, and D. Wang. 2010. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on *sir-2.1* and *daf-16*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 400: 613–618.
- Weng A., Z., O. E. Díaz R., I. Álvarez M. 2005. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Rev Cuba. Hig Epidemiol. 43: 2–5.
- Wu, X., Q. Hu, D. Hou, X. Xin, B. Miao, Y. Wang, X. Liu, and L. Shen. 2013. Preservation efficiency of new cryoprotectant used for *Acidithiobacillus ferrooxidans* in liquid nitrogen. Trans. Nonferrous Met. Soc. China. 23: 818–823.
- Xiao, Z. Z., L. L. Zhang, X. Z. Xu, Q. H. Liu, and J. Li. 2008. Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. 70: 1086–1092.
- Zamora R., L., M. 2003. Aislamiento, indentificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis Doctoral. Universitat de Girona, España. 255 p.
- Zhang, Y. Z., S. C. Zhang, X. Z. Liu, Y. J. Xu, J. H. Hu, Y. Y. Xu, J. Li, and S. L. Chen. 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Theriogenology 63: 763–773.
- Zhou, X. L., H. Zhu, S. Z. Zhang, F. M. Zhu, G. M. Chen, and L. X. Yan. 2006. Freeze-drying of human platelets: Influence of intracellular trehalose and extracellular protectants. Cryo-Letters. 27: 43–50.

3. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DEL FLUIDO RUMINAL FRESCO (FRF) Y CENTRIFUGADO (FRC) PARA USARSE COMO FUENTE DE INÓCULO

José Carlos Escobar España, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

3.1. Resumen

El objetivo de este experimento fue evaluar las diferencias del Fluido Ruminal Fresco (FRF) y Centrifugado (FRC) para ser utilizado como inóculo de bacterias ruminales totales. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar. El experimento se realizó en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados. El FRF se obtuvo de una vaca Jersey, postprandial, alimentada con forraje y concentrado en una proporción de 70:30, se centrifugó a $1157 \times g$ para sedimentar sólidos y se obtuvo el FRC. Las variables evaluadas para ambos tratamientos fueron: pH, potencial redox, la concentración de bacterias totales [BT] y concentración de bacterias celulolíticas [BC] por medio de la técnica del Número Más Probable. La [BT] y el potencial redox no presentaron diferencias ($p > 0.05$) con una concentración de 6.7×10^{10} y 5.4×10^{10} bacterias mL^{-1} para FRF y FRC respectivamente, y redox fue de -200.17 y -214.37 mV. Y el pH fue diferente ($p \leq 0.05$) con valores de 6.09 y 6.04 para FRF y FRC respectivamente, la [BC] fue de 1.4×10^9 . El FRC presentó mejores condiciones como inóculo debido a la ausencia de sólidos por lo que facilita su manipulación. El potencial redox se mantuvo altamente negativo permitiendo la viabilidad de las bacterias anaerobias presentes en fluido ruminal.

Palabras claves: líquido ruminal, centrifugado, bacterias totales, pH y potencial redox.

ASSESSMENT OF FRESH RUMEN FLUID (FRF) AND CENTRIFUGED (FRC) FOR USE AS A SOURCE OF INOCULUM

José Carlos Escobar España, MC.
Colegio de Postgraduados, 2015.

3.2. Abstract

The aim of this trial was to investigate differences Fresh rumen fluid (FRF) and Centrifuged (FRC) to be used as inoculum total rumen bacteria. The statistical analysis we used a completely randomized design. The trial was conducted in the laboratory of Rumen Microbiology and Microbial Genetics the Colegio de Postgraduados. The FRF was obtained from a cow Jersey, postprandial fed with forage and concentrate in the ratio of 70:30, was centrifuged at 1157 x g to sediment solids and the FRC was obtained. The variables evaluated for both treatments were: pH, redox potential, the concentration of total bacteria [BT] and cellulolytic bacteria concentration [BC] by the Most Probable Number technique. The [BT] and the redox potential no differences ($p > 0.05$) with a concentration of bacteria 6.7×10^{10} and 5.4×10^{10} mL⁻¹ for FRF and FRC respectively, and redox was -200.17 -214.37 mV. And the pH was different ($p \leq 0.05$) with values of 6.09 and 6.04 respectively for FRF and FRC, the [BC] was 1.4×10^9 . The FRC presented as inoculum best conditions due to absence of solids at which facilitates handling. The redox potential remained highly negative allowing the viability of bacteria in anaerobic rumen fluid.

Keywords: rumen fluid, centrifuged, total bacteria, pH and redox potential.

3.3. Introducción

La composición del ecosistema ruminal consta básicamente de bacterias, protozoarios y hongos (Martin, 1994). El número de bacterias que hay en el rumen es de 10^{10} a 10^{11} células g^{-1} de contenido ruminal en su mayoría anaerobias. Los protozoarios en gran parte ciliados están en concentraciones de 10^5 a 10^6 células mL^{-1} de contenido ruminal (Yokoyama y Johnson, 1988); estos microorganismos se encargan de hidrolizar la celulosa, hemicelulosa, pectinas, fructosanos y almidón de las plantas, básicamente a mono y disacáridos, los cuales son fermentados y como producto final se obtienen ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico), dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4) (Hobson y Stewart, 1997; Wang, *et al.*, 2010). Debido a esto, el fluido ruminal está sujeto a muchas investigaciones en laboratorios de microbiología, la disponibilidad y cercanía al laboratorio de animales fistulados, permite una mejor manipulación del fluido. En campo se pueden realizar conteos de protozoarios fijándose en formaldehído, pero se tiene poca información de lo que sucede con bacterias ruminales después de un tiempo determinado de muestreo (Dehority y Grubb, 1980). En el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, se han realizado investigaciones relacionadas con los microorganismos del rumen; por ejemplo, aislamiento y caracterización de bacterias, estudios de protozoarios y hongos, o en consorcios por la interacción que existe con diversos sustratos alimenticios, al degradar la materia seca que utilizan como sustrato. Para este estudio se utilizó un consorcio de bacterias ruminales totales como inóculo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la centrifugación sobre el fluido ruminal.

3.4. Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología ruminal y Genética Microbiana, del programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

3.4.1. Variables a evaluar

Variables que se evaluaron en el FRF y FRC:

- 1) Concentración de hidrogeniones (pH).
- 2) Potencial de óxido reducción (Redox).
- 3) Concentración de bacterias totales por medio de la cámara Petroff-Hausser.
- 4) Concentración de bacterias celulolíticas por medio de la prueba de Número Más Probable.

3.4.2. Obtención y preparación del inculo

Se obtuvieron 800 mL de fluido ruminal fresco (FRF), una hora posterior a la primera alimentación de la mañana, de una vaca raza Holstein, canulada en rumen, alimentada con paja de avena, alfalfa y concentrado en una proporción 70:30. El FRF se filtró a través de una manta doble cielo y se depositó en una hielera a 39 °C para su transportación al laboratorio, posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm (1,157 g) por tres minutos, y se obtuvo el fluido ruminal centrifugado (FRC), el cual se depositó en un matraz con flujo de CO₂ a una temperatura de 39 °C en baño María; Se obtuvo una

muestra de 5 mL por triplicado de FRF y FRC, se midió pH y redox en un potenciómetro modelo 250A (calibración con pH 7 y 4) y un potenciómetro de óxido-reducción Orión modelo 710 A (calibración solución con +220 de óxido-reducción).

3.4.3. Preparación de medios de cultivos para la prueba celulolítica.

Se prepararon 1,200 mL de medio de cultivo Whatman-Celobiosa-Fluido Ruminal (WC-FR; cuadro 1), de los cual se vertieron 4.5 mL en tubos de cultivo (100 x 14 mm). Se aseguró esterilidad por 72 h a 39 °C. De acuerdo a la metodología de Cobos y Yokoyama (1995)

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo anaerobio celulolítico.

Componente 100mL.	WCL-FR
Agua destilada	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ^I	30.0
Solución mineral I (mL) ^{II}	5.0
Solución mineral II (mL) ^{III}	5.0
Rezasurina 0.1% (mL) ^{IV}	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Cisteína-sulfido (mL) ^V	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% (mL) ^{VI}	5.0
Glucosa	-
Celobiosa (g)	0.18
Tira de papel Whatman	Una por tubo
Pasto Bermuda (g)	-

(I). Líquido ruminal fresco, se filtró con una manta de cielo, se centrifugo a 12,857 g / 10 min y se esterilizo 15 min/ 15 PSI /121 °C; el proceso se llevó a cabo dos veces.

(II). Contiene (1 L) K₂HPO₄, 6 g.

(III). Contiene (1 L) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl₂·2H₂O, 1.6 g.

(IV). Agregar 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, aforar a 100 mL.

(V). 3.125 g de L-Cisteína (disuelta en 2N NaOH hasta pH 10), más 3.125 g de Na₂S·9H₂O; la mezcla se aforo a 250 mL con agua destilada y se esterilizo 15 min/ 15 PSI/ 121 °C.

(VI). Contiene (100 mL) Na₂CO₃, 8 g.

3.4.4. Estimación de la concentración de bacterias ruminales totales en el FRF y FRC

La concentración de bacterias totales en el FRF y FRC, se estimó fijando 2 mL de medio de cultivo en 0.5 mL de solución fijadora isotónica al 20 % (54 mL de formaldehído, 5 mL de sol. mineral I y 5 mL de sol. mineral II, 36 mL de agua destilada) por triplicado para observar y medir su concentración en un microscopio Carl Zeiss a

una magnificación de 100X. La ecuación para calcular la concentración total de bacterias por mL de medio inoculado fue la siguiente:

$$[B] = (\bar{X}) (FD) (2 \times 10^7)$$

Dónde:

[B]= Concentración de bacterias por mL.

\bar{X} = Media del conteo de bacterias.

FD= Factor de dilución de la muestra (mL volumen total / mL de la muestra).

2×10^7 = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser.

1 mL= $[1,000 \text{ mm}^3 / (0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm})]$ es igual a 20, 000,000.

3.4.5. Prueba de Número Más Probable (NMP)

La concentración de bacterias celulolíticas se determinó por el método de NMP (Harrigan y McCance, 1979). Los tubos (100 x 14 mm) con medio de cultivo WC-FR se inocularon con 0.5 mL de FRF y FRC por quintuplicado, realizando transferencias de 0.5 mL desde la dilución 10^{-1} a 10^{-13} ; posteriormente se incubaron (incubadora marca Memmert modelo: IN 75) a 39 °C por 10 días. Se consideró como crecimiento positivo de bacterias celulolíticas a los tubos de cultivo donde se degradó la tira de papel Whatman. Para calcular un rango estadístico con 95% de confiabilidad del NMP se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{NMP}/4.68 \text{ a } \text{NMP} \times 4.68$$

3.4.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar, usando el procedimiento GLM de SAS® (2011) y la comparación múltiple de medias fue con el método de Tukey ($\alpha=0.05$). El modelo estadístico fue:

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

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta en el i-ésimo tratamiento y j-ésima repetición.

M = Media general.

τ_i =Efecto del i-ésimo día.

ε_{ij} = Error aleatorio, el cual se supone normalmente distribuido con media 0 y varianza σ^2 .

3.5. Resultados

3.5.1. Evaluación de fluido ruminal fresco y después de centrifugado

El Cuadro 2 muestra las diferencias en la concentración de bacterias totales, pH y potencial redox entre el FRF y FRC. El proceso de centrifugación no afectó ($p>0.05$) la concentración de bacterias ruminales totales y potencial redox, sin embargo, el pH del FRF fue (6.09) mayor ($p\leq 0.05$) al del FRC (6.04). La concentración de bacterias celulolíticas viables para FRF y FRC, no fue diferente con una media de (1.4×10^9) con una concentración máxima y mínima de (6.5×10^9) y (2.9×10^6) para ambos tratamientos.

Cuadro 2. Diferencias entre el fluido ruminal fresco (FRF) y centrifugado (FRC).

Fluido Ruminal	[BT] (10^{10})	pH	Redox	[BC] (10^9)
FRF	6.7 ^a	6.09 ^a	-200.17 ^a	1.4
FRC	5.9 ^a	6.04 ^b	-214.37 ^a	1.4
EEM	0.87	0.01	5.56	-

^{a,b} Medias en una columna con distinta literal son diferentes ($p \leq 0.05$).

FRF, fluido ruminal sin centrifugar; FRC, Fluido ruminal centrifugado (a 1157 g); EEM: error estándar del valor promedio; [BT], concentración de bacterias totales; Redox, potencial de óxido-reducción [BC]; concentración de bacterias celulolíticas, no tiene EEM debido a que se realizó por NMP con una repetición por tratamiento, el límite de confianza es del 95%.

3.6. Discusión

De acuerdo a los resultados el pH del FRC, tiende a acidificarse por efecto de la centrifugación. En la literatura no hay evidencias de estudios previos en líquido ruminal sobre los cambios del pH por efecto de la centrifugación.

A nivel ruminal, las fluctuaciones del pH ruminal están asociados a cambios en la dieta de los animales y varía de acuerdo a su composición, pudiendo ser ricas en carbohidratos solubles, alto porcentaje de proteína o fibra; por lo tanto, esto permite que el perfil microbiano sufra desbalances aumentando el crecimiento de bacterias ácido lácticas que tienden a acidificar el ambiente microbiano (Finol, *et al.*, 1994).

La dieta y el comportamiento del masticado tienen relación directa con el pH ruminal, ya que después de la comida el pH disminuye y durante la rumia aumenta (Allen, 1997). El ambiente ruminal y la asociación con la población microbiana en animales sanos están diseñados para desarrollarse en un rango de pH de 6.2 a 7.2; sin

embargo, en vacas altas productoras de leche, donde la dieta de consumo es alta en concentrado y baja en fibra, el pH oscila de 5.2 a 5.8, facilitando un cuadro de acidosis ruminal subaguda (Yang y Beauchemin, 2007).

Uno de los requerimientos para la caracterización y aislamiento de bacterias ruminales es que requieran CO₂ (Dehority, 1971), lo permite un equilibrio ácido-base en el ecosistema ruminal. El efecto de centrifugar el FRF libera parte del CO₂ disuelto en el fluido ruminal, por lo tanto el equilibrio ácido-base se modifica tendiendo a la acidificación tal como sucede en el tratamiento FRC.

Le Ruyet y Tucker (1992) encontraron que al adicionar carbonato de sodio y algunos elementos buffer en dietas altas en granos, el pH ruminal se acidificaba pero después de un tiempo tendía a incrementarse, mientras que la dieta control mantenía un pH ácido. Tucker *et al.* (1992) reportaron que incorporando 1.5 % de carbonato de sodio la cantidad de hidrogeniones disueltos se incrementaban con la dieta control alta en grano, manteniéndose así de 4 a 6 h, por la rápida fermentación ácida, después de 6 h la concentración de hidrogeniones descendía.

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar si acontecía un cambio con el potencial redox; sin embargo, esto no ocurrió. Al no haber cambios se decidió utilizar el FRC como inóculo, ya que contenía una concentración de bacterias totales alta (10^{10}) y por las características del sobrenadante que permitió una mejor manipulación para depositarlo en los viales por medio de pipetas.

3.7. Conclusiones

El fluido ruminal centrifugado se puede utilizar como inóculo ya que la centrifugación no modifica el potencial de óxido-reducción. Pero tiene la ventaja de que su manejo es más fácil cuando se requiere verter por medio de pipetas debido a que se eliminan las partículas sólidas del alimento consumido.

3.8. Literatura citada

Allen, M. S. (1997). Relationship Between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. *J. Dairy Sci.* 80: 1447-1462.

Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: colonisation and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. P 151-161.

Dehority, B. A. 1971. Carbon Dioxide Requirement of Various Species of Rumen Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 105: 1. 70-76.

Dehority, B. A., and J. A. Grubb. 1980. Effect of Short-Term Chilling of Rumen Contents on Viable Bacterial Numbers. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 2. 376-381.

Finol, P. G., C. Arraga de A., G. Fernández y L. Añez. (1994). Evaluación del licor ruminal en vacunos lecheros alimentados con desechos de cervecería. *Revista Científica, FCV-LUZ*. IV: 3. 175-782.

Harrigan, W. F. y M. E. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos*. Editorial Academia. León, España. 419 p.

Hobson, P. N., and C. S. Stewart. 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Second edition. Blackie Academic & Professional, printed in Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN. Pp. 709.

Le Ruyet, P., and W. B. Tucker. (1992). Ruminal Buffers: Temporal Effect on Buffering Capacity and pH of Ruminal Fluid From Cows Fed a High Concentrate Diet. *J Dairy Sci.* 75: 1069-1077.

- Martin, S. A. 1994. Nutrient Transport by Ruminal Bacteria: A Review. *J. Anim. Sci.* 72: 3019-3031.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Tucker, W. B., M. Aslam, M. Lema, I. S. Shin, P. LE Ruyet, J. F. Hogue, D. S. Buchanan, T. P. Miller, and G. G. Adams. (1992). Sodium Bicarbonate or Multielement Buffer via Diet or Rumen: Effects on Performance and Acid-Base status of Lactating Cows. *J Dairy Sci.* 75: 2409-2420.
- Wang, A., L. Gao, N. Ren, J. Xu, Ch. Liu, L. Duu-Jong. 2010. Enrichment strategy to select functional consortium from mixed cultures: Consortium from rumen liquor for simultaneous cellulose degradation and hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy.* 35: 13413-13418.
- Yang, W. Z, and K. A. Beauchemin. (2007). Altering Physically Effective Fiber Intake Through Forage Proportion and Particle length: Digestion and Milk Production. *J. Dairy Sci.* Vol. 90. No. 7. P. 3410-3421.
- Yokoyama, M. T., y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. En: *El rumiante fisiología digestiva y nutrición.* D. C. Church. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 137-158.

4. CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN CON DOS LIOPROTECTORES SOBRE LA VIABILIDAD Y ACTIVIDAD DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS RUMINALES TOTALES

José Carlos Escobar España, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

4.1. Resumen

Se evaluó el efecto de dos lioprotectores sobre un inóculo de bacterias ruminales totales con capacidad de degradar celulosa presentes en el FRF y FRC. Las variables evaluadas fueron: eficiencia en la producción de liofilizado, concentración de bacterias ruminales totales y celulolíticas, pH y potencial redox del liofilizado hidratado. Se realizó una prueba de degradación de MS de pasto *Cynodon dactylon* y se estimó la producción de AGV. El diseño fue completamente al azar y los tratamientos fueron testigo (T), dimetilsulfoxido (DMSO) y carbón activado (CA). En FRF y FRC el pH presentó diferencias ($p \leq 0.05$), en cuanto a la producción de liofilizado no hubo diferencias por agregar lioprotectores ($p > 0.05$). Al momento de inocular el DMSO fue diferente del T y CA ($p \leq 0.05$) para [BT] y pH, el potencial redox no presentó diferencias ($p > 0.05$), el DMSO alcanzó la mayor [BC]; la determinación del % DEGMS el T fue mejor ($p \leq 0.05$) que CA y DMSO respectivamente. Los ácidos grasos volátiles presentaron ($p \leq 0.05$) diferencias, el uso de lioprotectores disminuye la participación del ácido propiónico con respecto al T ($p \leq 0.05$). El uso de lioprotectores mantiene viables y activas las bacterias ruminales totales y demuestran actividad celulolítica después de reactivarlas.

Palabras claves: Lioprotectores, carbón activado, dimetilsulfoxido, degradación *in vitro*, liofilización.

EVALUATION PROCESS OF A CONSORTIUM LYOPHILIZATION RUMINAL TOTAL BACTERIA ON VIABILITY AND ACTIVITY WITH TWO LYOPROTECTANS

José Carlos Escobar España, MC.
Colegio de Postgraduados, 2015.

4.2. Abstract

The effect of two lyoprotectants on a total inoculum of rumen bacteria capable of degrading cellulose present in the FRF and FRC was evaluated. The variables evaluated were lyophilized production efficiency, total concentration and cellulolytic rumen bacteria, pH and redox potential of hydrated lyophilized. A degradation test of *Cynodon dactylon* grass DM was performed and the production of volatile fatty acids was estimated. The design was completely randomized and the treatments were control (T), dimethyl sulfoxide (DMSO) and activated charcoal (AC). FRF and FRC in pH differences ($p \leq 0.05$), in terms of the production of lyophilized there was no difference by adding lyoprotectants ($p > 0.05$). At the time of inoculating the DMSO was different from T and CA ($p \leq 0.05$) to [BT] and pH, redox potential did not differ ($p > 0.05$), DMSO reached the best [BC]; determining the% T DEGMS was better ($p \leq 0.05$) CA and DMSO respectively. Volatile fatty acids presented ($p \leq 0.05$) differences, the use of lyoprotectants decreases participation propionic acid to T ($p \leq 0.05$). Using lyoprotectants remains viable and active total rumen bacteria cellulolytic activity and demonstrate reactivate after.

Keywords: lyoprotectants, activated charcoal, dimethyl sulfoxide, *in vitro* degradation, lyophilization.

4.3. Introducción

El contenido de agua puede causar autólisis en la conservación del material orgánico o promover el crecimiento de organismo que provoque la descomposición del material almacenado (Adams, 1995). Por lo que liofilización es uno de los métodos más usados en la preservación de microorganismos, porque conlleva una alta viabilidad en términos de vida larga y almacenamiento (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2000); los procesos en los que se basa la liofilización son los siguiente: 1.- congelación (cristalización de solutos y la formación de una matriz amorfa que comprende solutos no cristalizables asociados a la humedad no congelable), 2.- la sublimación del hielo al vacío, 3.- evaporación de agua de la matriz amorfa, y 4.- desorción de la humedad presente en la masa (McLellan y Day, 1995; Morgan *et al.*, 2006). La adición de sustancias nombradas crioprotectoras o lioprotectoras pueden ser o no eficaces en los procesos de liofilizado, el aditivo puede no proteger al cultivo, de hecho puede ser incompatible con el proceso (McLellan y Day; 1995 Kanmani *et al.*, 2011;). Piloni (2008) evaluó un consorcio de bacterias quitinolíticas ruminales aisladas de rumen de borregos obteniendo después de 5 años de conservación por liofilización concentraciones de bacterias de 2.8×10^{12} lo que indica una viabilidad de la cepa bacteriana. Durante el proceso de liofilización la congelación es punto crítico que influye en la sobrevivencia de cepas, cultivos mixtos y de tipo múltiples (Baumann y Reinbold, 1966). Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de dos lioprotectores en un inoculo de bacterias ruminales totales con capacidad de degradar celulosa, en la viabilidad y actividad de las bacterias.

4.4. Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del colegio de postgraduados, el cual se encuentra ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

4.4.1. Identificación de los tratamientos y variables a evaluar

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Testigo (T): consistió en 10 mL de FRC.
2. Dimetilsulfoxido (DMSO): consistió en 1,000 μ L (1 mL) de DMSO (C_2H_6OS), marca Sigma D-8779, más 9.0 mL de FRC.
3. Carbón activado (CA): consistió en 10 mg de CA, marca HYCEL Cat. 55615, más 10 mL de FRC.

Los viales serológicos (100 mL) para cada uno de los tratamientos se esterilizaron previamente en seco (134° C por 3 min a 304.2 kPa equivalentes a 29.4 psig), solo el tratamiento 3 se esterilizo nuevamente con el CA, mientras que el DMSO se esterilizo por medio de un filtro para jeringa Acrodisc® de 0.2 μ m.

Las variables a evaluar fueron las siguientes:

- Estimación de la producción de liofilizado por cada 100 mL de medio
- Medición de pH, potencial de óxido-reducción y concentración de bacterias totales para las 3 h de hidratación.

- Concentración de bacterias celulolíticas por medio de NMP utilizando como inóculo los tratamientos liofilizados.
- Estimación del % DEGMS *in vitro* de pasto Bermuda.
- Medición de la producción de ácidos grasos volátiles.

4.4.2. Preparación del inóculo

Se extrajeron 300 mL FRF por triplicado, de una vaca fistulada raza Holstein, posterior a la primera alimentación matutina (9:00 a.m.). El FRF se filtró con una manta doble cielo, se transportó con la ayuda de un termo hielera con agua a 39° C al laboratorio para su manipulación, posteriormente el FRF se centrifugó a 1,157 x g por tres minutos y se obtuvo un sobrenadante, denominado Fluido Ruminal Centrifugado (FRC), el cual se depositó en un matraz bajo flujo de CO₂ a una temperatura de 39 °C en baño María.

4.4.3. Medición de pH, potencial de óxido reducción y concentración de bacterias ruminales totales, del FRF y FRC

Se midió el pH y el redox con un potenciómetro modelo 250 A (calibración con pH 7 y 4) y un potenciómetro de óxido-reducción Orión modelo 710 A (calibración solución con +220 de óxido-reducción). Para estimar la concentración de bacterias ruminales totales del FRF y del FRC, se fijó 2 mL de inóculo en 0.5 mL de solución fijadora isotónica al 20% (54 mL de formaldehído, 5 mL de sol minera I, 5 mL de sol mineral II, y 36 mL de agua destilada). Se determinó la concentración en una cámara Petroff-Hausser

utilizando un microscopio Carl Zeiss a una magnificación de 100X. La concentración de bacterias totales por mL de medio inoculado se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[B] = (\bar{X}) (FD) (2 \times 10^7)$$

Dónde:

[B] = Concentración de bacterias por mL.

\bar{X} = Media del conteo de bacterias.

FD = Factor de dilución de la muestra (mL volumen total / mL de la muestra).

2×10^7 = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser.

1 mL = $[1,000 \text{ mm}^3 / (0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm})]$ es igual a 20, 000,000.

4.4.4. Determinación de la producción de material liofilizado por mL de cultivo

Para estimar la producción de liofilizado se pesaron los viales serológicos (100 mL) vacíos, más cada uno de los niveles de inclusión de los tratamientos, así como el peso del FRC (inoculo de bacterias ruminales totales), después de liofilizados se pesaron los viales sin tapón y arillo metálico, donde, por diferencia de peso se estimó la cantidad de material liofilizado.

4.4.5. Proceso de conservación por el método de liofilización

Los viales serológicos con cada uno de los tratamientos, se colocaron en un congelador de rodillo Labconco Shell Freezer durante 40 min para alcanzar una temperatura de -35 °C. Inmediatamente el vial se almacenó en un ultracongelador

marca Refri Med. Posteriormente los viales se liofilizaron durante 8 h en una liofilizadora Labconco Freezone 6L en modo automático (bajo las siguientes condiciones: Temperatura de -50 °C y una presión de -0.135 mBar).

4.4.6. Preparación de medios de cultivo para diversas pruebas

Se prepararon tres tipos de medios de cultivo anaerobios. (1) Se preparó 400 mL de medio glucosa-celobiosa, fluido ruminal para Hidratación (H-FR), se vertieron 10 mL en tubos de cultivo (150 x 18 mm). (2) se preparó 1,000 mL de medio Whatman-celobiosa, fluido ruminal (WC-FR), se vertieron 4.5 mL en tubos de cultivo (100 x 14 mm), (3) por último se preparó 700 mL de medio Bermuda, fluido ruminal (B-FR) y se depositaron 9 mL de medio en tubos de cultivo conteniendo, el pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) que con antelación se molió (1 mm Ø), se lavó con agua corriente para eliminar macropartículas (<25 µm), se filtró el exceso de agua con la ayuda de una manta doble cielo y se llevó a peso constante. Los tubos se colocaron en incubación a 39° C por 72 h para asegurar esterilidad, siguiendo la metodología de Cobos y Yokoyama, (1995), (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo anaerobios.

Componente 100mL.	WC-FR	H-FR	B-FR
Agua destilada	52.6	52.6	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ^I	30.0	30.0	30.0
Solución mineral I (mL) ^{II}	5.0	5.0	5.0
Solución mineral II (mL) ^{III}	5.0	5.0	5.0
Rezasurina 0.1% (mL) ^{IV}	0.1	0.1	0.1
Peptona de soya (g)	0.2	0.2	0.2
Cisteina-sulfido (mL) ^V	2.0	2.0	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1	0.1	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% (mL) ^{VI}	5.0	5.0	5.0
Glucosa	-	0.09	-
Celobiosa (g)	0.18	0.09	-
Tira de papel Whatman	Una por tubo	-	-
Pasto Bermuda (g)	-	-	0.05

(I). Líquido ruminal fresco, se filtró con una manta de cielo, se centrifugo a 12,857 g / 10 min y se esterilizo 15 min/ 15 PSI /121 °C; el proceso se llevó a cabo dos veces.

(II). Contiene (1 L) K₂HPO₄, 6 g.

(III). Contiene (1 L) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl₂·2H₂O, 1.6 g.

(IV). Agregar 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, aforar a 100 mL.

(V). 3.125 g de L-Cisteína (disuelta en 2N NaOH hasta pH 10), más 3.125 g de Na₂S·9H₂O; la mezcla se aforo a 250 mL con agua destilada y se esterilizo 15 min/ 15 PSI/ 121 °C.

(VI). Contiene (100 mL) Na₂CO₃, 8 g.

4.5. Reactivación de los liofilizados con y sin lioprotector

4.5.1. Hidratación de los tratamientos liofilizados

Se tomaron 10 viales serológicos con material liofilizado, el cual se hidrató agregando 10 mL de medio hidratante (H-FR; ver cuadro 2), bajo flujo de CO₂, esto se realizó en una campana Labconco de bioseguridad con purificador de clase II provista de rayos ultravioleta, se colocaron en incubación a 39 °C por 3 h, donde cada hora se

homogenizó con 30 giros manuales en sentido de las manecillas del reloj, posteriormente se procedió a medir pH y potencial redox de tres repeticiones, adicionalmente se determinó la concentración de bacterias totales por medio de la cámara Petroff-Hausser.

4.5.2. Prueba del Número Más Probable (NMP)

La concentración de bacterias celulolíticas se midió por el método NMP (Harrigan y McCance, 1979). El inóculo tenía 3 h de incubación pasando por el proceso de hidratación. Los tubos (100 x 14 mm) con medio de cultivo WC-FR se inocularon con 0.5 mL de cada tratamiento por quintuplicado realizando transferencias de 0.5 mL de la dilución 10^{-1} a 10^{-13} . Se colocaron en incubación a 39 °C por 10 días. Para calcular un rango estadístico con 95% de confiabilidad del NMP se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{NMP}/4.68 \text{ a } \text{NMP} \times 4.68$$

4.5.3. Prueba de degradación *in vitro* del pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*)

Se inocularon 7 tubos de cultivo (B-FR; ver cuadro 2) por tratamiento con 1 mL de los liofilizados hidratados, posteriormente se colocó en incubación a 39 °C por 72 h. Para medir la capacidad de degradación *in vitro* de la materia seca (% DEGMS) las muestras se filtraron en papel filtro Whatman No. 541 con ayuda de una bomba de vacío (marca Siemens, modelo: FE-1500L vacío de 500 mmHg) el pasto Bermuda no degradado, se

secó a 60° C por 72 h en una estufa Riosa H8-62 y se pesó para estimar por diferencia de peso la cantidad de sustrato degradado, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DEGMS} = \frac{g \text{ MSi} - g \text{ MSn}}{g \text{ MSi}} \times 100$$

Dónde:

%DEGMS= porcentaje de degradación in vitro de la materia seca

g MSi = g de materia seca inicial.

g MSn = g de materia seca no degradada

4.5.4. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

Se obtuvo (1 mL) de muestra de cada vial de la degradación a las 72 h y se fijaron en 0.25 mL de ácido metafosfórico (25 %; en una proporción 4:1) en viales para centrifuga Ependorff. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 18,800 x g por 10 min en una centrifuga Ilettich EBA21, el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía, los AGV se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer modelo Clarus 500 con detector de ionización de flama (FID); las condiciones del análisis fueron: 1µL de volumen de inyección; columna 15 m x 0.32 mm (Elite FFAP; temperatura de 130 °C en horno, 250 °C en inyector y 250 °C en columna; se usó nitrógeno como gas acarreador (flujo 8 mL min⁻¹); hidrógeno y oxígeno como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min⁻¹); con tiempos de retención de 1.26 min para acetato, 1.60 min para propionato

y 2.09 para butirato, la concentración de ácidos grasos volátiles es en unidades miliMolar (mM).

4.5.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar, usando el procedimiento GLM de SAS® (2011) y la comparación múltiple de medias fue con el método de Tukey ($\alpha=0.05$). El modelo estadístico fue:

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

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta en el i-ésimo crioprotector y j-ésima repetición.

μ = Media general.

τ_i =Efecto del i-ésimo día.

ϵ_{ij} = Error aleatorio, el cual se supone normalmente distribuido con media 0 y varianza σ^2 .

4.6. Resultados

4.6.1. Diferencias entre el fluido ruminal antes y después de centrifugar

El Cuadro 4 muestra las diferencias en la concentración de bacterias totales, pH y potencial redox entre fluido ruminal fresco (FRF) y después de centrifugar (FRC). El proceso de centrifugación no afectó ($p>0.05$) la concentración de bacterias totales, ni el potencial redox. Sin embargo, el FRF presentó un pH de 6.1 que fue diferente ($p\leq 0.05$) al FRC (5.9).

Cuadro 4. Diferencias entre el Fluido Ruminal antes (FRF) y después de Centrifugarlo (FRC).

Fluido Ruminal	[Bacterias]	pH	Redox
FRF	8.1x10 ^{10a}	6.1 ^a	-138.23 ^a
FRC	5.6 x10 ^{10a}	5.9 ^b	-138.13 ^a
EEM	8.26	0.03	4.69

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

FRF, fluido ruminal sin centrifugar; FRC, Fluido ruminal centrifugado (a 1157 g); EEM: error estándar del valor promedio; [Bacterias], concentración de bacterias totales; Redox, potencial de óxido-reducción.

4.6.2. Estimación de la eficiencia de liofilizado por cada 100 mL de medio producido

El Cuadro 5 muestra la eficiencia de producción mediante el procedimiento de liofilizado. No hubo diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$), sin embargo, el tratamiento dimetilsulfoxido (DMSO) cuantificó la mejor eficiencia de recuperación de liofilizado (0.24 g 100 mL⁻¹), y el carbón activado fue el segundo tratamiento con mayor eficiencia que el testigo. Aunque se agregue lioprotectores a los medios de cultivos a liofilizar estos no afectan los pesos de liofilizado.

Cuadro 5. Eficiencia de liofilizado por cada 100 mL de medio producido.

Tratamientos	Liofilizado recuperado (g 100 mL ⁻¹)
Testigo	0.20
Dimetilsulfoxido (DMSO)	0.24
Carbón activado (CA)	0.23
EEM	0.01

No se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$).

EEM, error estándar del valor promedio.

4.6.3. Medición de la concentración bacterias totales, celulolíticas, pH y potencial redox del liofilizado hidratado.

El Cuadro 6 muestra la concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas, pH y potencial redox, para los tres tratamientos. Para las variables determinadas el tratamiento DMSO fue diferente ($p \leq 0.05$) al testigo y CA. El DMSO tuvo la mayor concentración de bacterias totales $5.3 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ de cultivo mejorando la concentración en 3.5×10^{10} bacterias mL^{-1} de cultivo con respecto al testigo, el pH para DMSO fue diferente ($p \leq 0.05$) (7.05), con respecto al testigo (6.95) y CA (6.94), pero el potencial redox no fue diferente ($p > 0.05$) entre tratamientos.

También se reportan (Cuadro 6) las estimaciones del número más probable de bacterias celulolíticas para cada tratamiento, de acuerdo a la fórmula del NMP (Harrigan y McCance, 1979), con un límite de confianza del 95% (Cochran, 1950) solo se realizó una repetición por tratamiento. Para DMSO la concentración de bacterias celulolíticas $2.8 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ cultivo es fue mayor numéricamente con respecto al testigo (0.024×10^6) y al CA (0.0002×10^6). Alcanzando una concentración mínima y máxima de (8.4×10^5) y (9.2×10^8) el DMSO, el testigo (7.0×10^3) y (0.7×10^7) y el CA tiene un mínimo de (0.06×10^3) y un máximo (0.6×10^8).

Cuadro 6. Concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas, pH y redox del liofilizado hidratado al momento de inocular.

Tratamiento	[BT]	[BC]	pH	Redox
Testigo	1.8x10 ^{10b}	0.024x10 ⁶	6.95 ^b	-33.37 ^a
DMSO	5.3x10 ^{10a}	2.8x10 ⁶	7.05 ^a	-28.47 ^a
CA	0.09x10 ^{10c}	0.0002x10 ⁶	6.94 ^b	-35.27 ^a
EEM	0.76		0.02	1.43

^{a, b, c}; Medias en una columna con distinta literal son diferentes ($p \leq 0.05$), EEM, error estándar del valor promedio. DMSO, dimetilsulfoxido; CA, carbón activado; [BT] concentración de bacterias ruminales totales; [BC] concentración de bacterias celulolíticas, no se estimó el EEM porque se utilizó una sola repetición por tratamiento, para verificar la viabilidad y actividad y estimar la concentración celulolítica.

4.6.4. Prueba de degradación *in vitro* de la materia seca de pasto Bermuda

El Cuadro 7 muestra el efecto de lioprotectores en el inóculo utilizado para la prueba de degradación *in vitro*. El pH del medio cambia con la utilización de los lioprotectores presente en la conservación del inóculo fluido ruminal. Lo anterior se concluye porque los tratamientos DMSO y CA no presentaron diferencias entre ellos ($p > 0.05$); pero ambos son diferentes ($p \leq 0.05$) al testigo. El potencial redox fue diferente entre los lioprotectores ($p \leq 0.05$); sin embargo, cada lioprotector no fue diferente al testigo ($p > 0.05$). Los niveles redox y pH se reflejaron en la degradación *in vitro* de la materia seca (% DEGMS) porque el testigo presentó el mayor nivel de degradación (54.98%) y fue diferente ($p \leq 0.05$) al resto de los tratamientos. El uso de los lioprotectores DMSO o CA no cambia el nivel de %DEGMS, al no haber diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$).

Cuadro 7. Efecto de los lioprotectores en el inóculo fluido ruminal sobre las variables de degradación *in vitro*

Variable	Testigo	DMSO	CA	EEM
%DEGMS	54.98 ^a	33.97 ^b	42.13 ^b	2.66
pH	6.54 ^b	6.62 ^a	6.58 ^a	0.01
Redox	-196.10 ^{ab}	-147.42 ^a	-214.52 ^b	10.69

a,b, valores promedio con distinta letra en una misma hilera son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); EEM, error estándar del valor promedio; DMSO, dimetilsulfoxido, CA, carbón activado; %DEGMS, porcentaje de degradación de la materia seca a 72 h de incubación; pH, potencial de hidrogeno medido a las 72 h de incubación; Redox, Potencial de óxido-reducción (mVRel).

4.6.5. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

El Cuadro 8 muestra la concentración total e individual de los principales AGV. Los ácidos acético y butírico no presentaron diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo, los lioprotectores disminuyeron la producción de ácido propiónico respecto al testigo ($p \leq 0.05$). Sin embargo la producción total de ácidos grasos volátiles no afectó por el tipo de lioprotector utilizado.

Cuadro 8. Participación de los ácidos acético, propiónico y butírico en la concentración final de ácidos grasos volátiles (%)

Tratamiento	Acético, %	Propiónico, %	Butírico, %	AGV total, %
Testigo	62.33 ^a	22.62 ^a	15.05 ^a	87.74 ^a
DMSO	62.84 ^a	16.08 ^b	21.08 ^a	77.68 ^a
CA	65.63 ^a	18.55 ^b	15.82 ^a	84.25 ^a
EEM	0.87	0.73	1.11	2.24

a, b, valores promedios en una columna con distinta literal son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$); Acético%, Propiónico%, Butírico%, concentración en (mM) de los ácidos grasos volátiles a 72 h de incubación. AGV, ácidos grasos volátiles totales a las 72 h de incubación (mM). EEM, error estándar del valor promedio.

4.7. Discusión

Previamente en el capítulo 2 se reportó que no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre FRF y FRC en la concentración de bacterias totales y potencial redox; por lo que se asume que las bacterias ruminales totales permanecen viables para su utilización como inóculos. El pH mostró diferencias ($p \leq 0.05$) teniendo el mismo comportamiento de acidificación por efecto de la centrifugación.

Una de las variables importantes en este experimento fue la eficiencia del liofilizado producido por cada 100mL de medio de cultivo. El DMSO numéricamente fue más alto (0.24 g 100 mL⁻¹;) con respecto a los otros dos tratamientos sin mostrar diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, la producción de liofilizado del tratamiento Testigo (sin lioprotector) fue de 0.20 g 100 mL⁻¹, similar a lo obtenido por (Rodríguez-Carrillo,

2009), así mismo, Cobos *et al.* (2004) obtuvo 0.17 g de masa bacteriana liofilizada de *Clostridium sordelli* y 0.26 g de *Peptostreptococcus tetradius* L⁻¹ de cultivo producido.

Los procesos de conservación a largo plazo mayormente están basados en gran parte en lo empírico donde particularmente se dificulta hacer comparaciones y aplicar los datos reportados en la literatura (Hoefman, *et al.*, 2012). Algunos de los factores pueden afectar la viabilidad y actividad de una cepa bacteriana en el proceso de conservación son: la contaminación, mantener números exponenciales de la población bacteriana y que deba mantener su estabilidad genética (Morales-García, *et al.*, 2010). El DMSO puede presentar un efecto de acción coligativa donde a mayor nivel de inclusión del lioprotector puede presentar mayor sobrevivencia de bacterias (McGann, 1978). Carvalho *et al.* (2004) reportan que diferentes especies de un género de bacterias pueden presentar comportamientos desiguales en los procesos de conservación, también el tamaño de la célula a proteger puede marcar una diferencia en la técnica de conservación, por ejemplo, en los enterococos pueden ser más resistentes que los lactobacilos, esto es debido al área superficial de la célula, entre más grande sea, mayor será el daño causado por la formación de cristales de hielo en el proceso de congelación.

Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) señalan que las tasas de sobrevivencia durante el almacenamiento de las especies Gram negativas son más bajas que las Gram positivas, también la estructura de la pared y membrana celular están relacionada a la sobrevivencia, la presencia de polisacáridos extracelulares y el ácido teicoico están

relacionados directamente con la tasas de sobrevivencia ya que esta tiende a disminuir la recuperación de células viables.

Portner *et al.* (2007) liofilizaron cultivos de *Campylobacter jejuni* utilizando diferentes lioprotectores, donde su concentración de bacterias al momento de liofilizar fue de 6.7×10^5 UFC mL⁻¹; posteriormente un mes después de almacenadas las cepas realizaron conteos viables de 5.1×10^5 y 1.9×10^5 UFC mL⁻¹ a los 2 meses de almacenado, esto por efecto de la trehalosa al 10% usada como lioprotector. Para este experimento se utilizaron lioprotectores diferentes el DMSO y CA, los resultados obtenidos en el presente estudio fueron mayores, donde la concentración de bacterias totales del inóculo antes de liofilizar (concentraciones de bacterias en FRC; ver cuadro 3) presento un exponencial de (10^{10} bacterias mL⁻¹), y en la reactivación del liofilizado la población bacteriana tuvo la misma base exponencial.

Se puede considerar que el DMSO tiene capacidad lioprotectora de bacterias ruminales totales, y se observa una importante conservación de bacterias celulolíticas con una concentración de 2.8×10^6 bacterias mL⁻¹, y una diferencia numérica respecto al testigo 0.024×10^6 bacterias mL⁻¹, con respecto al CA la concentración fue de 0.0002×10^6 este resultado fue menor a lo obtenido por Sánchez-Santillán (2014), él reporta una concentración de bacterias totales 9.58×10^8 mL⁻¹ de inóculo utilizando CA y 31.82% DEGMS. En este caso fue mayor el % DEGMS (42.13%) utilizando el mismo lioprotector.

Se evaluó la capacidad de degradación de la materia seca *in vitro* del inoculo de bacterias ruminales totales conservadas por liofilización con y sin crioprotector. En los rumiantes, la digestión de las paredes celulares de las plantas se lleva a cabo por bacterias celulolíticas, debido a que ocurre una asociación de ésta con la pared celular, rica en celulosa (Bhat, *et al.*, 1990). El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de dos lioprotectores en un inoculo de bacterias ruminales totales, como se pudo observar en los resultados anteriores (cuadro 7), el inoculo de bacterias ruminales totales conservadas por liofilización con dos tipos de lioprotectores mas el (T) conservaron su capacidad genética para poder generar las enzimas necesarias para degradar celulosa. Estas enzimas son: celulasas, Exo-1-4- β -D-Glucanasas, Endo-1-4- β -D-Glucanasas, β -Glucosidasas, (Bhat y Bhat, 1997; Galindo *et al.*, 2004).

En líquido ruminal están presentes varias enzimas, donde el pH para cierta actividad o diferentes sustratos se encuentran separados entre sí, es por eso que los microorganismos muestran sus diferentes adaptabilidades en rumen (Galindo, *et al.*, 2004), esto se puede observar por la modificación del pH al finalizar la prueba de degradación, causado por la adición de los lioprotectores lo cual puede limitar la regulación del crecimiento de bacterias y su actividad degradadora.

Stewart (1997) y Galindo *et al.* (2004) definen que la degradación de la MS está dada por la actividad celulolítica a partir de fluido ruminal como inoculo, sin embargo esta actividad puede cambiar mostrando una actividad enzimática mayor cuando se tiene un pH de 6.5, esto parece tener sentido con lo sucedido en este trabajo ya que el

tratamiento (T) obtuvo mayor porcentaje de degradación que los otros dos tratamientos DMSO y CA, el pH fue el idóneo (6.54) para una mayor actividad enzimática tal como lo reporta (Stewart,1997 y Galindo *et al.*, 2004)

La adición de DMSO y CA no modifican el perfil de ácidos acético y butírico, con respecto al testigo, pero si para el ácido propiónico, ya que con la adición de estos lioprotectores se encontraron concentraciones menores (16.08 y 18.55%) respectivamente, siendo diferentes ($p \leq 0.05$) con respecto al (T) (22.62%). Cabe mencionar que en la literatura no existe información alguna sobre la producción de ácidos grasos volátiles a partir de una prueba *in vitro* utilizando como inóculo bacterias ruminales totales conservadas por liofilización con estos dos lioprotectores utilizados.

4.8. Conclusiones

- a. La producción de material bacteriano liofilizado no se ve afectada con respecto a la adición de lioprotectores.
- b. Se puede concluir que el uso de lioprotectores preserva bacterias ruminales totales, sin perder su actividad metabólica.
- c. La degradación de papel Whatman fue positiva para la actividad celulolítica de las bacterias liofilizadas.
- d. El uso de lioprotectores no aumenta el porcentaje de degradación de la materia seca, pero las bacterias ruminales totales con carbón activado muestran mayor degradación que con el uso de dimetilsulfoxido.

4.9. Literatura citada.

- Adams, G. 1995. The principles of Freeze-Drying. *Methods Mol. Biol.* 38:1–5. *In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* J. G. Day and G. N. Stacy (eds) Second edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 347 p.
- Baumann, D. P, and G. W. Reinbold. 1966. Freezing of lactic cultures. *J. Dairy Sci.* 49: 259–264.
- Bhat, M. K, and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances.* Vol. 5 Nos. 3-4. Pp. 583-620.
- Bhat, S., R.J. Wallace, and E.R. Ørskov. 1990. Adhesion of Cellulolytic Ruminant Bacteria to Barley Straw. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 56. No. 9. p. 2698-2703.
- Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Texeira, F. J. Malcata, and P. Gibbs. (2004). Relevant Factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 14: 835-847.
- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: colonisation and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning.* Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. p 151-161.
- Cobos P., M., A., C. Gutiérrez O, D. Hernández S, S. S. González M, y G. D. Mendoza M. 2004. Isolation and characterization of two rabbit cecum bacteria with potential use for rabbit feeding. *Vet. Méx.* 35: (2) 109-120.
- Cochran, W. G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the “most Probable Number”. *Biometrics*, Vol. 6, No. 2, pp. 105-116.
- Galindo, J., Y. Marrero., N. González y A. I. Aldama. 2004. Caracterización de la actividad celulolítica en el líquido de rumen filtrado. *Revista Cubana de Ciencias Agrícola*, Tomo 38, No. 3, pp. 259-263.
- Harrigan, W. F, y M. E. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos.* Editorial Academia. León, España. 419 p.
- Hoefman, S., K. V. Hoorde, N. Boon, P. Vandamme, P. De Vos and K. Heylen. 2012. Survival: Long-Term preservation induces a Reversible Viable but Non-Culturable State in Methane-Oxidizing Bacteria. 7: (4) 1-9.
- Kanmani, P., R. Satish Kumar., N. Yuvaraj., K. A. Paari., V. Pattukumar, and V. Arul. 2011. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium

- Enterococcus faecium MC13 for long-term storage. *Biochem. Eng. J.* 58-59: 140–147. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.006>
- McGann, L. E. (1978). Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents. *Cryobiology*. 15: 382-390.
- McLellan, M. R, and J. G. Day. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. *Methods Mol. Biol.* 38:1–5. *In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* J. G. Day and G. N. Stacy (eds) Second edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 347 p.
- Miyamoto-Shinohara, Y., J. Sukenobe., T. Imaizumi and T. Nakahara. (2008). Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 9-24.
- Miyamoto-Shinohara, Y., T. Imaizumi, J. Sukenobe, Y. Murakami, S. Kawamura, and Y. Komatsu. 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 41:251–255.
- Morales-García, Y.-E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. De la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez-Terrón and J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Biotecnología* 14:11–29.
- Morgan, C. a., N. Herman, P. a. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. *J. Microbiol. Methods* 66: 183–193.
- Piloni, M. J. (2008). Aislamiento y caracterización de bacterias quitinolíticas ruminales. Tesis de Doctorado. Postgrado en Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. De Méx. P. 96.
- Portner, D. C., R. G.K. Leuschner and B. S. Murray. (2007). Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 54: 265-270.
- Rodríguez-Carrillo, J. A. 2009. Aislamiento y caracterización *in vitro* de una bacteria acetogenica ruminal. Tesis de Maestría. Postgrado en Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. De Méx. p. 78
- Sánchez-Santillán, P. 2014. Aislamiento de una bacteria ruminal celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación *in vitro* de sustratos celulolíticas. Tesis de Doctorado. Postgrado en Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. De Méx. 94 p.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Stewart, C. S. 1997. Factors Affecting the Cellulolytic Activity of Rumen Contents. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 33, No. 3, p. 497-502.

5. CAPÍTULO 4. EFECTO DEL TIEMPO DE HIDRATACIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS RUMINALES LIOFILIZADAS CON Y SIN LIOPROTECTORES

José Carlos Escobar España, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

5.1. Resumen

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto de hidratación, determinando la concentración de bacterias ruminales totales cada 3 h durante 24 h. El diseño estadístico para la concentración de bacterias totales fue un diseño en parcelas divididas en el tiempo, con tiempo de incubación como parcela grande y tipo de lioprotector como parcela chica. Los tratamientos fueron: testigo (T), dimetilsulfoxido (DMSO) y carbón activado (CA). El análisis de varianza mostró que no existe interacción entre tratamientos y tiempos de medición de la concentración de bacterias totales; de modo que se analizó por factor principal. No se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de bacterias totales con respecto al tiempo ($p>0.05$). Se determinó que el mejor tiempo de hidratación fue a las 5 h, debido a la concentración máxima de bacterias ruminales totales alcanzada en los tres tratamientos.

Palabras claves: medio de hidratación, reactivación, liofilizado, tiempo de hidratación y lioprotectores.

EFFECT OF MOISTURE ON TIME IN THE CONCENTRATION OF RUMINAL BACTERIAS WITH AND WITHOUT RUMINAL LYOPHILIZED LYOPROTECTANTS

José Carlos Escobar España, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

5.2. Abstract

The objective of this investigate was to evaluate the effect of hydration, determining the concentration of total rumen bacteria every 3 h for 24 h. The statistical design for the concentration of total bacteria was a design in split plots in time, with incubation time as large plot and type of lyoprotectant as small plot. The treatments were: control (T), dimethyl sulfoxide (DMSO) and activated charcoal (AC). The analysis of variance showed no interaction between treatment and time of measuring the concentration of total bacteria; so he analyzed by principal factor. No statistical differences in the concentration of total bacteria over time ($p>0.05$). It was determined that the best hydration time was 5 h, due to the high concentration of total rumen bacteria achieved in all three treatments.

Keywords: Hydration media, recovery, lyophilized, hydration time and lyoprotectants.

5.3. Introducción

Se han realizado trabajos de investigación en el área de conservación de microorganismos por liofilización, (Choate y Alexander, 1967). Uno de los puntos con mayor énfasis es la tasa de recuperación de microorganismos por rehidratación, (Font de Valdez *et al.*, 1985; Teixeira *et al.*, 1995; Yi-Chieh, *et al.*, 2004; Hsi-Chia *et al.*, 2006) El proceso de rehidratación o reconstitución del liofilizado se divide en cuatro etapas: humectación, inmersión, dispersión y disolución; sin embargo existen parámetros directos que pueden intervenir en el proceso como: el agente protector, composición del medio de hidratación, osmolaridad, pH, temperatura, volumen y tiempo de hidratación; de tal manera que estos aspectos se reflejan en la tasa de sobrevivencia de microorganismos (Zhao y Zhang, 2005; Muller *et al.*, 2010). La hidratación se considera un proceso primordial para poder recuperar microorganismos liofilizados con mayor tasa de sobrevivencia (Costa *et al.*, 2000) Teixeira *et al.* (1995) encontraron diferencias en la tasa de recuperación con dos tipos de hidratación (remojar (soaking) y sacudir (shaking)) de 7.95 y 7.28 CFU mL⁻¹ respectivamente en *Lactobacillus bulgaricus* incubándolos a 20 °C. El procedimiento de remojo limita la cantidad de shock por estrés osmótico siendo un factor importante para el porcentaje de sobrevivencia. El determinar la causa de muerte en los microorganismos por la liofilización, la protección del mismo o por el daño sufrido durante el proceso, es complejo (Font de Valdez *et al.*, 1983). En base a lo anterior, el objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto del tiempo de hidratación, en la concentración de bacterias ruminales totales por 24 h a intervalos de 3 h.

5.4. Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología ruminal y Genética microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del colegio de postgraduados, el cual se encuentra ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

5.4.1. Variables a evaluar

- ✓ Concentración de bacterias totales.
- ✓ Tiempo óptimo de hidratación con base en la concentración de bacterias totales.

5.4.2. Preparación de medios de cultivo

Se preparó 400 mL de medio de cultivo (GC-FR) para hidratación, el cual se vertió (10 mL) en tubos de cultivo (150 x 18 mm), se preparó 1,000 mL; siguiendo la metodología de Cobos y Yokoyama, (1995), (ver Cuadro 9).

Cuadro 9. Composición del medio de cultivo para la hidratación de liofilizado anaerobio.

Componente 100mL.	GC-FR
Agua destilada	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ^I	30.0
Solución mineral I (mL) ^{II}	5.0
Solución mineral II (mL) ^{III}	5.0
Rezasurina 0.1% (mL) ^{IV}	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Cisteína-sulfido (mL) ^V	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% (mL) ^{VI}	5.0
Glucosa	0.9
Celobiosa (g)	0.9

I. Líquido ruminal fresco, se filtró con una manta de cielo, se centrifugo a 12,857 g / 10 min y se esterilizo 15 min/ 15 PSI /121 °C; el proceso se llevó a cabo dos veces.

II. Contiene (1 L) K_2HPO_4 , 6 g.

III. Contiene (1 L) KH_2PO_4 , 6 g; $(NH_4)_2SO_4$, 6 g; NaCl, 12 g; $MgSO_4$, 2.45 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.6 g.

IV. Agregar 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, aforar a 100 mL.

V. 3.125 g de L-Cisteína (disuelta en 2N NaOH hasta pH 10), más 3.125 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$; la mezcla se aforo a 250 mL con agua destilada y se esterilizo 15 min/ 15 PSI/ 121 °C.

VI. Contiene (100 mL) Na_2CO_3 , 8 g.

5.4.3. Proceso de hidratación del liofilizado

A partir de muestras liofilizadas se tomaron tres repeticiones de cada tratamiento para hidratarlas con 10 mL de medio de hidratación GC-FR (ver cuadro 1), bajo flujo de CO_2 , posteriormente, se colocaron en incubación a 39 °C, cada hora se procedió a mover oscilatoriamente el hidratado para homogenizar la mezcla dándole 30 vueltas en el sentido de las manecillas del reloj, los tiempos de medición fueron a las 3, 6, 9, 12 y 24 h.

5.4.4. Estimación de la concentración de bacterias totales

Se estimó la concentración de bacterias totales al momento de la inoculación por triplicado. Se fijó 0.5 mL de muestra más 0.125 µL de solución fijadora isotónica al 20% (contiene: 54 mL de Formaldehído, más 5 mL de sol. mineral I y 5 mL de sol. mineral II, más 36 mL de agua destilada) para medir su concentración en un microscopio de contraste Carl Zeiss a una magnificación de 100X. El cálculo se realizó con la siguiente ecuación:

$$[B] = (\bar{X}) (FD) (2 \times 10^7)$$

Dónde:

[B] = Concentración de bacterias por mL.

\bar{X} = Media del conteo de bacterias.

FD= Factor de dilución de la muestra (mL volumen total / mL de la muestra).

2×10^7 = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser.

1 mL= $[1,000 \text{ mm}^3 / (0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm})]$ es igual a 20, 000,000.

5.4.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la concentración de bacterias totales se utilizó un diseño en parcelas divididas en el tiempo, con tiempo de incubación como parcela grande y tipo de lioprotector como parcela chica, usando el procedimiento GLM de SAS[®] (2011).

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + \delta_{ij} + D_k + (CB)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta

μ = Media general

A_i = Efecto del tiempo de incubación en su nivel i

δ_{ij} = Error asociado con tiempo de incubación, E(C).

B_k = Efecto del tipo de crioprotector k

$(AB)_{ik}$ = Efecto de la interacción tiempo de incubación*tipo de crioprotector nivel i, k

ε_{ijk} = Error aleatorio asociado con tipo de crioprotector, E(D).

5.5. Resultados

5.5.1. Estimación de la concentración de bacterias en base a diferentes tiempos de hidratación

El análisis de varianza mostró que no existe interacción entre tratamientos y tiempos de medición de la concentración de bacterias totales; de modo que se analizó por factor principal. El Cuadro 10 y Cuadro 11 muestran la concentración de bacterias totales durante la hidratación del inóculo liofilizado usando 2 tipos de lioprotectores. Los lioprotectores DMSO y CA usados en el proceso de liofilización de fluido ruminal no afectaron ($p>0.05$) la concentración de bacterias totales durante la hidratación del liofilizado hasta las 24 horas (Cuadro 1) respecto al testigo. El tiempo de medición no afecta la concentración de bacterias totales durante la hidratación de fluido ruminal usando diferentes lioprotectores (Cuadro 2).

Cuadro 10. Concentración de bacterias totales en la hidratación de fluido ruminal liofilizado con diferentes lioprotectores.

Tratamientos	Concentración de bacterias totales
Testigo	3.56 x10 ¹⁰
DSMO	3.61 x10 ¹⁰
CA	3.43 x10 ¹⁰

No se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$).

Cuadro 11. Concentración de bacterias totales a diferentes tiempos de hidratación de liofilizado.

HORA	Concentración de bacterias totales
0	5.00 x10 ¹⁰
3	0.99 x10 ¹⁰
6	3.20 x10 ¹⁰
9	4.41 x10 ¹⁰
12	2.75 x10 ¹⁰
24	3.28 x10 ¹⁰

No se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$).

5.5.2. Comportamiento de las concentraciones de bacterias totales a diferentes horarios

En la figura 1 se observan los promedios de concentraciones de bacterias de los tres tratamientos, el análisis de los datos no arrojó ninguna diferencia ($p > 0.05$), todas las concentraciones están homologadas a la misma base exponencial (10^{10}), a partir de estos datos se generó una gráfica para poder observar el comportamiento exponencial de las bacterias a diferentes tiempos de medición.

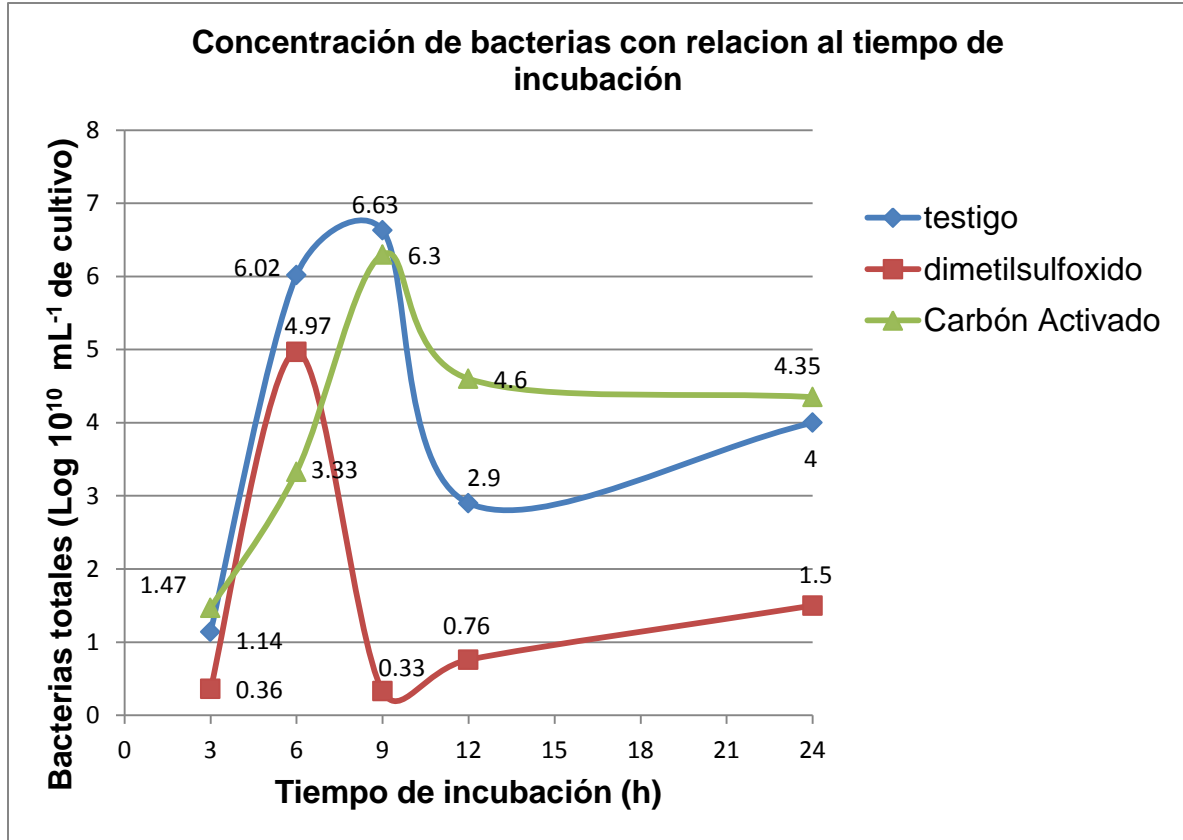


Figura 1. Crecimiento de bacterias ruminales totales en hidratación durante 24 h

5.6. Discusión

Se evaluó el efecto de hidratación en relación a la concentración de bacterias totales mL⁻¹ de cultivo. En los resultados no se observó diferencias al incluir un lioprotector con respecto al testigo, esto indica que la concentración de bacterias no se ve afectada por la inclusión de agentes protectores como el DMSO y el CA.

Al obtener un material liofilizado, el contenido de humedad es importante ya que de este depende la viabilidad de la cepa; se ha observado que a mayor humedad la

actividad y viabilidad es menor, y por el contrario un sobre secado también disminuyen la actividad y viabilidad de la cepa liofilizada (Yi-Chieh *et al.*, 2004).

En investigaciones pasadas no se describía específicamente los procesos de rehidratación o condiciones de los medios, donde simplemente se apoyaban con comparaciones de procedimientos alternativos (Leach y Scott, 1959; Teixeira *et al.*, 1995). Muller *et al.* (2010) señalan que los parámetros como la calidad del liofilizado, la composición de los agentes protectores, la cantidad de humedad presente en el material liofilizado, el medio de rehidratación, la osmolaridad, pH y las fuentes de energía, la temperatura, tiempo y volumen de rehidratación afectan la tasa de recuperación y supervivencia; sin embargo en este experimento resulta difícil medir todas estas variables, por lo tanto solo se midió la concentración de bacterias a en diferentes tiempos.

La reconstitución del liofilizado con medio hidratante fue igual al volumen original de medio de cultivo antes de liofilizar (10 mL) tal como lo reportado por Costa *et al.* 2000 donde tiene un volumen original de 5 mL y reconstituye su liofilizado con 5 mL de medio hidratante y señala que si aumentas el volumen del medio de hidratación decrece la viabilidad antagonista.

5.7. Conclusión

- a) El tiempo de hidratación optimó en base a la máxima concentración de bacterias totales fue de 5 h.

- b) Los agentes protectores no influyeron sobre la concentración de bacterias totales.
- c) No hubo diferencias en la concentración de bacterias totales entre los tratamientos

5.8. Literatura citada

- Choate, R. V, and M. T. Alexander. 1967. The Effect of the rehydration temperatura and rehydration medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. *Cryobiology*. 3: 5 419-422.
- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: colonisation and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. p 151-161.
- Costa, E., J.Usall., N. Teixidó., N. García, and I. Viñas. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 793-800.
- Font de Valdez, G. G. Savoy de Giori., A. P. de Ruiz Holgado and G. Oliver. 1985. Effect of the rehydration medium on the recovery of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*. 50: 3 1339-1341.
- Font de Valdez, G., G. Savoy de Giori., A. P. de Ruiz Holgado, and G. Oliver. 1983. Comparative Study of the Efficiency of Some Additives in Protecting Lactic Acid Bacteria Against Freeze-Drying. *Cryobiology*. 20: 560-566.
- Hsi-Chia, C., C-W. Lin, and M-J. Chen. 2006. The Effects of Freeze Drying and Rehydration on Survival of Microorganisms in Kefir. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 19: 1 126-130.
- Leach, R. H. and W. J. Scott. 1959. The influence of rehydration on the viability of Dried Micro-Organisms. *J. Gen. Microbiol*. 21: 295-307.
- Muller, J. A., C. Stanton., W. Sybesma., G.F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2010. Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 1369-1379.

SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Teixeira, P., H. Castro, and R. Kirby. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated culture of *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Applied Microbiology. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03433.x

Yi-Chieh, W. R-Ch. Yu, and Ch-Ch. Chou. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. International Journal of Food Microbiology. 93: 209-217.

Zhao, G. and G. Zhang. 2005. Effect of protective agents, Freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. Journal of Applied Microbiology. 99: 333-338.

6. CAPÍTULO 5. DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE LA MATERIA SECA DEL PASTO BERMUDA (*CYNODON DACTYLON*) INOCULADO CON BACTERIAS RUMINALES TOTALES LIOFILIZADAS CON Y SIN LIOPROTECTORES

José Carlos Escobar España, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

6.1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de degradación *in vitro* de materia seca (% DEGMS) inoculada con bacterias ruminales totales liofilizadas e hidratadas a 5 h. Los tratamientos fueron: testigo (T), dimetilsulfoxido (DMSO) y carbón activado (CA). El diseño experimental fue completamente al azar. El tratamiento CA presento el mayor %DEGMS ($p \leq 0.05$) con respecto al (T) y (DMSO), pero la concentración de bacterias totales fue mayor en el T. El uso de (DMSO) modificó el potencial redox. El pH y la producción de ácidos grasos volátiles totales no se modificaron ($p > 0.05$), así como la concentración de cada uno de ellos (acético, propiónico y butírico). El uso de CA mejora el porcentaje de degradación de la MS del pasto Bermuda.

Palabras claves: degradación *in vitro*, crioprotectores, Carbón activado, bacterias ruminales.

**TEST DEGRADATION *IN VITRO* DRY MATTER OF (*CYNODON DACTYLON*)
BERMUDA GRASS INOCULATED WITH RUMINAL TOTAL BACTERIA WITH AND
WITHOUT LYOPROTECTANTS LYOPHILIZED**

José Carlos Escobar España, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015.

6.2. Abstract

The aim of this study was to determine the percentage of *in vitro* degradation of dry matter (% DEGMS) total rumen bacteria inoculated with lyophilized and hydrated to 5 h. The treatments were: control (T), dimethyl sulfoxide (DMSO) and activated charcoal (AC). The experimental design was completely random. The AC treatment had the highest % DEGMS ($p \leq 0.05$) with respect to (T) and (DMSO), but the concentration of total bacteria was higher in T. Using (DMSO) modified the redox potential. The pH and total production of volatile fatty acids were not changed ($P > 0.05$) and the concentration of each them (acetic, propionic and butyric). Using AC improves the percentage of degradation of DM Bermuda grass.

Keywords: *in vitro* degradation, cryoprotectants, activated charcoal, rumen bacteria.

6.3. Introducción

La técnica de digestibilidad *in vitro* puede ser usada para evaluar dietas completas, un solo alimento y forrajes, simulando la fermentación ruminal. Esta consiste en incubar en lotes, y medir por diferencias los sustratos degradados, acumulación de los productos finales como gas, productos de la fermentación y ácidos grasos volátiles, puede ser a diferentes tiempos, inoculados con fluido ruminal (Dhanoa *et al.*, 2004). Por el contrario, un sistema para estimar la digestibilidad *in vivo*, requiere de inversión en animales, alimentos, y periodos prolongados de prueba, esto limita el uso de este tipo de ensayos, (López, 1998; Iantcheva *et al.*, 1999).

La celulosa, hemicelulosa, ligninas, pectinas, β -glucanos y ácidos fenólicos son compuestos de la fibra contenida en gramíneas y leguminosas (Bach y Calsamiglia, 2006). La alimentación a base gramíneas y leguminosas en rumiantes se lleva a cabo por el mecanismo de fermentación que ejercen los microorganismos del rumen, ya que son capaces de hidrolizar los enlaces β -1-4 de la celulosa contenida en la fibra, las bacterias celulolíticas más predominantes son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* (Weimer, 1996). Por tanto, el objetivo de este capítulo fue determinar el porcentaje de degradación *in vitro* de materia seca inoculada con bacterias ruminales totales liofilizadas con o sin lioprotectores hidratadas a 5 h.

6.4. Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del colegio de postgraduados, el cual se encuentra ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

6.4.1. Variables a evaluar:

1. Concentración de bacterias ruminales totales a final de la prueba de degradación
2. Porcentaje de degradación
3. pH
4. producción de ácidos grasos volátiles
5. potencial óxido-reducción

6.4.2. Medios de cultivos utilizados en la prueba de degradación

Se preparó 300 mL de medio cultivo Bermuda (B-FR) (ver cuadro 12) siguiendo la metodología de Cobos y Yokoyama, (1995), se aseguró esterilidad por 72 h a 39 °C,

Cuadro 12. Composición del medio de cultivo para degradación anaerobio.

Componente 100mL.	B-FR
Agua destilada	52.6
Líquido ruminal clarificado (mL) ^(a)	30.0
Solución mineral I (mL) ^(b)	5.0
Solución mineral II (mL) ^(c)	5.0
Rezasurina 0.1% (mL) ^(d)	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Cisteína-sulfido (mL) ^(e)	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% (mL) ^(f)	5.0
Sustrato pasto Bermuda (g)	0.05

^(a). Líquido ruminal fresco, se filtró con una manta de cielo, se centrifugo a 12,857 g / 10 min y se esterilizo 15 min/ 15 PSI /121 °C; el proceso se llevó a cabo dos veces.

^(b). Contiene (1 L) 6 g de K_2HPO_4 .

^(c). Contiene (1 L) 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g de $(NH_4)_2SO_4$; 12 g de NaCl; 2.45 g de $MgSO_4$; 1.6 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

^(d). (0.1 g de Rezasurina) aforar a un volumen final de 100 mL agua destilada calentar y para disolver y esterilizar.

^(e). 2.5 g de L-Cisteína (disuelta en NaOH 2N), más 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$; la mezcla se aforo a 100 mL con H_2O destilada y se esterilizo 15 min/ 15 PSI/ 121 °C.

^(f). Contiene 8 g de Carbonato de Calcio (Na_2CO_3) en 100 mL de H_2O destilada.

6.4.3. Prueba de degradación

Previamente se hidrato el liofilizado y se puso en incubación a 39 °C por 5 h, ya que este fue el tiempo de hidratación óptimo encontrado en el ensayo previo. Se utilizaron 24 tubos de cultivo de cultivo B-FR (150 x 18 mm) los cuales se inocularon con 1 mL de liofilizado hidratado, 7 tubos por tratamiento (Testigo, DMSO y CA), y se incubaron por 72 h a 39 °C. Se mido pH y potencial redox al finalizar la prueba, además se determinó

la concentración de bacterias totales por medio de la cámara Petroff-Hausser utilizando un microscopio Carl-Zeiss a una magnificación de 100X.

6.4.4. Medición de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

Se tomó una muestra (1 mL) de cada uno de los viales y se fijó en 0.25 mL de ácido metafosfórico (25%; en una proporción 4:1) en viales para centrifuga Ependorff, las muestras se centrifugaron a 18,800 g por 10 min en una centrifuga Ilettich EBA21, el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía, los AGV se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer modelo Clarus 500 con detector de ionización de flama (FID); las condiciones de análisis fueron: 1 μ L de volumen de inyección; columna 15 m x 0.32 mm (Elite FFAP; temperatura de 130 °C en horno, 250 °C en inyector y 250 °C en columna; se usó nitrógeno como gas acarreador (flujo 8 mL min⁻¹); hidrógeno y oxígeno como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min⁻¹; con tiempos de retención de 1.26 min para acetato, 1.60 min para propionato y 2.09 para butirato, la concentración de ácidos grasos volátiles es en unidades miliMolar (mM).

6.4.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente al azar, usando el procedimiento GLM de SAS[®] (2011) y la comparación múltiple de medias fue con el método de Tukey ($\alpha=0.05$). El modelo estadístico fue:

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

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta en el i-ésimo tratamiento y j-ésima repetición.

μ = Media general.

τ_i =Efecto del i-ésimo día.

ϵ_{ij} = Error aleatorio, el cual se supone normalmente distribuido con media 0 y varianza σ^2 .

6.5. Resultados

6.5.1. Evaluación de la viabilidad y actividad del inoculo fluido ruminal reactivado, y concentración de AGV.

El Cuadro 13 muestra el efecto de los lioprotectores en el inoculo fluido ruminal sobre las variables de degradación *in vitro*. El pH y la producción de AGV totales no se afectaron ($p > 0.05$) con la inclusión de los lioprotectores con respecto al testigo, pero la concentración de bacterias se afectó ($p \leq 0.05$) con la inclusión de estos, sin embargo el % DEGMS fue diferente ($p \leq 0.05$) en CA con respecto al testigo y DMSO. El potencial redox se modificó con la inclusión del DMSO causando diferencias ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo y CA. No hubo diferencia ($p \leq 0.05$) en la concentración de acético, propiónico o butírico (Cuadro 14).

Cuadro 13. Efecto de los lioprotectores en el inóculo fluido ruminal sobre las variables de degradación *in vitro*.

Variable	Testigo	DMSO	CA	EEM
[Bacterias]	9.8X10 ^{9a}	3.1X10 ^{9b}	4.5X10 ^{9b}	0.89
%DEGMS	24.90 ^{ab}	20.71 ^b	28.50 ^a	1.20
pH	6.75 ^a	6.77 ^a	6.77 ^a	0.47
AGV	57.87 ^a	53.44 ^a	58.86 ^a	1.33
Redox	-260.48 ^b	-132.78 ^a	-256.22 ^b	20.66

a,b, valores promedio con distinta letra en una misma hilera son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); DMSO, dimetilsulfoxido, CA, carbón activado; EEM, error estándar del valor promedio; [Bacteria] concentración de bacterias totales a las 72 h de la degradación; %DEGMS, porcentaje de degradación de la materia seca a 72 h de incubación; pH, potencial de hidrogeno medido a las 72 h de incubación; AGV, ácidos grasos volátiles totales a las 72 h de incubación (mM); Redox, Potencial de óxido-reducción (mVRel).

Cuadro 14. Participación de los ácidos acético, propiónico y butírico en la concentración final de ácidos grasos volátiles (mM).

Tratamiento	Acético, %	Propiónico, %	Butírico, %
Testigo	56.62	19.22	24.15
DMSO	51.42	20.10	28.47
CA	58.87	19.18	21.96
EEM	1.36	0.36	1.59

No se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$); Acético%, Propiónico%, Butírico%, concentración en mM de los ácidos grasos volátiles a 72 h de incubación.

EEM, error estándar del valor promedio.

6.6. Discusión

Kapp *et al.* (1976) dice que la digestibilidad *in vitro* es uno de los parámetros más evaluados y utilizados como indicadores de valores nutritivos de los alimentos. Este capítulo comprende determinar el porcentaje de degradación *in vitro* de materia seca inoculado con bacterias ruminales totales liofilizadas y que fueron hidratadas por 5 h, sin embargo los porcentajes de degradación fueron bajos. El tratamiento CA fue mejor con respecto al Testigo y al DMSO, los % DEGMS demuestran que hubo actividad celulolítica y producción de ácidos grasos volátiles.

Miranda *et al.* (1999) menciona que la actividad celulolítica se puede ver por la degradación de la celulosa. Malik, (1990) expresa que las recuperaciones de sobrevivencia se comprueban antes de liofilizar, inmediatamente después de liofilizar y después de un periodo de almacenamiento para poder hacer un recuento de la viabilidad; en el caso de esta prueba se realizaron pruebas de viabilidad antes y después de liofilizar encontrando viabilidad en ambas fases.

Kapp *et al.* (1979) realizaron un experimento de digestibilidad *in vitro* de Materia Seca de granos de maíz, donde utilizó como inóculo fluido ruminal fresco liofilizado sin lioprotectores, replicó tres veces el experimento obteniendo digestibilidades diferentes en cada replicación, los resultados en este experimento se asemejan a los obtenidos en esta prueba y a los del capítulo 3 ya que dio % de DEGMS diferentes en los dos trabajos realizados.

Malik, (1990) reporta viabilidad de especies de bacterias purpuras no sulfúricas y bacterias Gram-negativas antes y después de liofilizar midiendo por conteos de

bacterias viables presentes antes y después de liofilizar, obtuvo antes de liofilizar concentraciones de bacterias ($\text{Log}10^5$) y después de reactivarlas ($\text{Log}10^5$). Como se puede observar en el capítulo 2, las concentraciones de bacterias alcanzadas son de 10^{10} mL^{-1} de cultivo para los tres tratamientos antes de liofilizar, en este caso se obtuvieron concentraciones de bacterias al final de la prueba de degradación de 10^9 mL^{-1} de cultivo. Se puede asumir que el % de DEGMS en pasto Bermuda por el tratamiento CA fue mejor que el testigo y DMSO debido a que una parte de la población de bacterias ruminales totales son celulolíticas y por ende degradaron el pasto. En el caso de la variable de potencial redox, disminuye con la adición de DMSO como lioprotector en comparación con el T y CA.

En este experimento la concentración total y la del ácido acético, propiónico y butírico no fueron diferentes entre tratamientos.

6.7. Conclusiones

- a) Los lioprotectores dimetilsulfoxido y carbón activado adicionados como agentes de conservación en el proceso de conservación mantienen la viabilidad y actividad de las bacterias ruminales totales.
- b) El carbón activado incrementó el porcentaje de degradación.
- c) El pH no se ve modificado por la utilización de agentes lioprotectores al finalizar la prueba de degradación.
- d) El uso del dimetilsulfoxido como lioprotector modifica el potencial redox.

- e) El uso de lioprotectores en este caso no modifica la producción de ácidos grasos volátiles totales y la participación de cada uno de ellos (acético, propiónico y butírico).

6.8. Literatura citada

- Bach, A y S. Calsamiglia. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿Química o Física? XXII curso de especialización FEDNA. Barcelona. P. 99-103
- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: colonisation and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In: Rumen Ecology Research Planning. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. p 151-161.
- Dhanoa, M.S., J. France, L. A. Crompton, R. M. Mauricio, E. Kebreab, J.A.N. Mills, R. Sanderson, J. Dijkstra and S. López. 2004. Technical note: A proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the in vitro gas production technique using feces as the inoculum. *Journal of Animal Science*.82: 733-746.
- Iantcheva, N., H. Steingass, N. Todorov and D. Pavlov. 1999. A comparison of in vitro rumen fluid and enzymatic methods to predict digestibility and energy value of grass and alfalfa hay. *Animal Feed Science and Technology*. 81:333-344.
- Kapp, J., R. L. Hintz and D. G. Wagner. 1976. Lyophilized Rumen Fluid for Use in In Vitro Dry Matter Disappearance Studies with Grain. *Animal Science Research Report*. Oklahoma Agricultural Experiment Station. Pp. 42-44. Disponible en: http://beefextension.com/research_reports/research_56_94/rr79/rr79_13.pdf
- López, S., M.D. Carro, J.S. González y F.J. Ovejero. 1998. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 73: 99-113.
- Malik, K. A. 1990. Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. *Journal of Microbiological Methods*. 12: 117-124.
- Miranda, R. L. A., M. A. Cobos P, G. D. Mendoza M, S. S. González M, y C. M. García B. 1999. Degradación in vitro de rastrojo de maíz con cultivos mixtos de bacterias ruminales. *Agrociencia*. 33: 133-139.

SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Weimer, P. J. 1996. Why Don't Ruminant Bacteria Digest Cellulose Faster? J. Dairy Sci. 79: 1496-1502.

7. CONCLUSIONES GENERALES

- A. El inóculo de bacterias ruminales totales a partir de fluido ruminal fresco se puede utilizar centrifugado para su manipulación y mantiene las condiciones de anaerobiosis.
- B. La producción de liofilizado no aumenta sustancialmente con la utilización de los lioprotectores.
- C. El fluido ruminal sin lioprotectores tiene la propiedad de conservar bacterias ruminales totales.
- D. El uso de lioprotectores mantiene la viabilidad y la actividad de un consorcio de bacterias ruminales totales.
- E. También se mantiene viables bacterias celulolíticas conservadas en la población bacteriana total liofilizada, demostrado por la actividad de degradación de la celulosa del papel Whatman.
- F. Las bacterias ruminales totales conservadas sin ningún lioprotector mantienen su viabilidad y actividad fermentativa.
- G. El lioprotector carbón activado puede mejorar el porcentaje de degradación de pasto bermuda en comparación con los otros dos tratamientos.