

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

EVALUACIÓN DE UNA BACTERIA RUMINAL ACETOGÉNICA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*

AMAURY ÁBREGO GARCÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2012

La presente tesis titulada: **Evaluación de una bacteria ruminal acetogénica en la producción de metano *in vitro***, realizada por el alumno: **Amaury Ábrego García** 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

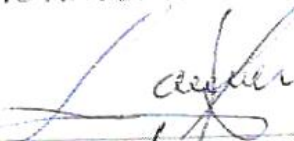
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



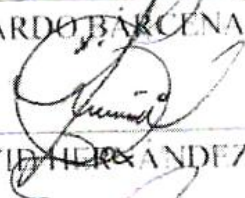
DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR



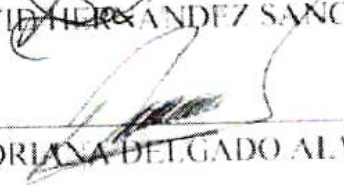
DR. RICARDO BARCENA GAMA

ASESOR



DR. DAVID HERNANDEZ SANCHEZ

ASESOR



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2012

EVALUACIÓN DE UNA BACTERIA RUMINAL ACETOGÉNICA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*

Amaury Ábrego García, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2012.

Resumen

Una alternativa para disminuir las emisiones de metano de los rumiantes es mediante la inoculación de bacterias acetogénicas, estas bacterias pueden competir por los sustratos (CO_2 e H^+) que usan las bacterias metanogénicas para producir metano. Los objetivos del estudio fueron identificar mediante secuenciación del gen ADNr 16S una bacteria ruminal acetogénica (BRA) aislada en medios selectivos, y evaluar el efecto de su inclusión sola o en cocultivo con un inóculo de bacterias ruminales totales (IBRT) en la producción de metano, ácidos grasos volátiles (AGV), y la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS). La bacteria aislada se identificó como *Clostridium paraputrificum*. La BRA fue inoculada a dos concentraciones (1×10^6 y 1×10^8 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo). De acuerdo con los resultados obtenidos, la BRA inoculada a una concentración de 1×10^6 bacterias mL^{-1} en cocultivo con el IBRT (BRA+IBRT) disminuyó ($p < 0.05$) la producción total de gas ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4$), pero no disminuyó la proporción de metano ($p > 0.05$); la concentración total de AGV aumentó ($p < 0.05$), y no se observaron diferencias ($p > 0.05$) en la DIVMS. Cuando la BRA fue inoculada a una concentración de 1×10^8 bacterias mL^{-1} en cocultivo (BRA+IBRT) la producción total de gas fue similar ($p > 0.05$) entre BRA+IBRT e IBRT, sin diferencias ($p > 0.05$) en la proporción $\text{CH}_4:\text{CO}_2$, la concentración de acetato fue mayor ($p < 0.05$) en cocultivo (BRA+IBRT), y no se detectaron diferencias ($p > 0.05$) en la DIVMS entre tratamientos. Se concluye que la bacteria ruminal acetogénica identificada como *Clostridium paraputrificum* tiene capacidad para interactuar con otras bacterias ruminales y disminuir la producción de biogas total (CH_4 y CO_2), sin un efecto negativo en la DIVMS o en la producción de AGV. Por tanto, se sugiere estudiar *in vivo* su potencial como inóculo alimenticio para disminuir las emisiones antropogénicas de gases efecto invernadero en rumiantes.

Palabras clave: Bacteria ruminal acetogénica, producción de gas *in vitro*, metano, dióxido de carbono, bacterias ruminales.

IN VITRO EVALUATION OF AN ACETOGENIC-RUMEN BACTERIUM ON METHANE PRODUCTION

Amaury Ábrego García, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2012.

Summary

An alternative to decrease the methane emissions from ruminants is by means of rumen inoculation of acetogénica bacteria, these bacteria are able to compete against methanogenic bacteria for the substrates (CO_2 and H^+) used to produce methane. The objectives of this study were addressed to identify by 16S rDNA gene sequencing an acetogenic-rumen bacteria (ARB) isolated in selective media, and to evaluate the effect of its inclusion alone or in co-culture with an inoculum of total rumen bacteria (TRBI) on methane and volatile fatty acids (VFA) production, and in vitro dry matter degradation (IVDMD). The ARB was inoculated at two concentrations (1×10^6 y 1×10^8 bacteria ml^{-1} of culture medium). The isolated bacterium was identified as *Clostridium paraputrificum*. According with the results obtained, the ARB inoculated at 1×10^6 in co-culture with ITRB (ARB+TRBI) decreased ($p < 0.05$) the total gas production increased ($p < 0.05$), however, the methane rate was not decreased ($p > 0.05$); the total VFA production increased ($p < 0.05$), and no effects were observed on IVDMD. When the ARB was inoculated at 1×10^8 bacteria ml^{-1} of culture medium with the TRBI, the total gas production was similar ($p > 0.05$) between ARB+TRBI and TRBI, without differences ($p > 0.05$) on the $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ proportion; the acetate concentration was bigger ($p < 0.05$) in co-culture (ARB+TRBI), and no differences ($p > 0.05$) on IVDMD were observed among treatments. It is concluded that the acetogénica-rumen bacterium identified as *Clostridium paraputrificum* has capacity to interact with others rumen bacteria to decrease the total biogas production (CH_4 and CO_2) without negative effects on the IVDMD and the VFA production. Therefore it is suggested to evaluate *in vivo* its potential as feedstuff inoculums to decrease ruminants' emissions of anthropogenic greenhouse gases.

Key words: Acetogenic-rumen bacteria, *in vitro* gas production, methane, carbon dioxide, rumen bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por haberme permitido formar parte de su comunidad y realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó durante mis estudios de postgrado y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo para finalizar esta tesis.

A la línea prioritaria de investigación 8 del Colegio de Postgraduados. "Impacto y Mitigación del Cambio Climático: Sector Agrícola, Pecuario y Forestal". Por el apoyo económico para la realización de esta investigación de tesis.

Al Dr. Mario A. Cobos Peralta por abrir las puertas del laboratorio a esta investigación y regir mi formación durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gamma por las sugerencias y disposición para mejorar la presente investigación.

Al Dr. David Hernández Sánchez por su amistad, apoyo y consejos para mejorar la presente tesis.

A la Dr. Adriana Delgado Alvarado por las sugerencias y contribuciones para mejorar la redacción de la presente tesis.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por su apoyo y disposición en la identificación molecular de la bacteria aislada.

A los profesores que forman parte del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería, en especial al Dr. Sergio S. González Muños, Dr. Omar Hernández Mendo y Dr. José G. Herrera.

Al personal que colaboró durante mi investigación en el Colegio de Postgraduados. Al Sr. Agustín Hernández Romero por su apoyo en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana.

Dedico este trabajo a mi madre Francisca García Silva por su amor, paciencia e infinito apoyo, a mi padre Enrique Ábrego Cabrera por motivar siempre mi camino.

A mis hermanas Tania y Dxuladi, mi ejemplo de esfuerzo y valor. Para dos nanos que me ayudan a restar con alegría el sinsentido de la cotidianidad: L. Enrique y L.

Amaury. A mis amigos y compañeros de postgrado, en especial a Lorena Luna,

Marisol Galicia, Liliana Galicia, José Hernández y Jorge Bonilla. A Liliana

Valdiviezo por su apoyo y compañía en horas de desvelo. A mis entrañables

amigos: Viridiana Juárez, Mariana Franco, Erick Rodríguez y Aldo Soriano.

A Tarres por amenizar con juicio y delirio nuestros escenarios.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Metanogénesis en rumiantes.....	3
2.2. Metabolismo de metanógenos.....	3
2.3. Reducción de CO ₂	4
2.4. Fermentación de acetato.....	5
2.5. Dismutación de metanol o metilaminas.....	7
2.6. Acetogénesis en rumiantes.....	8
2.7. Metabolismo de acetógenos.....	9
2.8. Ruta Wood-Ljungdahl.....	10
2.9. Comparación energética entre acetogénesis y metanogénesis.....	12
2.10. Opciones para disminuir la metanogénesis ruminal.....	12
2.11. Bacteria ruminal acetogénica.....	14
III. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
IV. HIPÓTESIS.....	17
V. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UNA BACTERIA ACETOGÉNICA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO <i>IN VITRO</i>	18
5.1. Introducción.....	18
5.2. Materiales y métodos.....	19
5.2.1. Hidratación del liofilizado de la bacteria ruminal acetogénica y concentración bacteriana.....	19
5.2.2. Liofilización de la bacteria ruminal acetogénica.....	20
5.2.3. Producción <i>in vitro</i> de CH ₄ , CO ₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica.....	21

5.2.4. Montaje del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	22
5.2.5. Rehidratación del inóculo liofilizado de la bacteria ruminal acetogénica e inoculación del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	22
5.2.6. Medición de gas total, CH ₄ y CO ₂ por cromatografía de gases.....	24
5.2.7. pH del medio de cultivo a 72 h de incubación.....	25
5.2.8. Concentración de ácidos grasos volátiles.....	25
5.2.9. Concentración de bacterias totales.....	26
5.2.10. Concentración de bacterias celulolíticas.....	26
5.2.11. Concentración de bacterias formatotróficas.....	27
5.2.12. Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	27
5.3. Diseño experimental.....	28
5.4. Identificación molecular de la bacteria ruminal acetogénica.....	29
5.4.1. Extracción de ADN.....	29
5.4.2. Amplificación del ADNr 16S.....	29
5.4.3. Análisis de la secuencia y la construcción de árbol filogenético.....	30
5.5. Resultados y discusión.....	31
5.5.1. Bacterias viables en el liofilizado.....	31
5.5.2. Concentración de AGV.....	31
5.5.3. Degradación <i>in vitro</i> de materia seca (DIVMS) y concentración bacteriana.....	34
5.5.4. Producción <i>in vitro</i> de gas total, CO ₂ y CH ₄	36
5.5.5. Identificación molecular de la bacteria ruminal acetogénica.....	40
5.6. Conclusiones.....	42
VI. EFECTO DE UNA BACTERIA ACETOGÉNICA A BAJA CONCENTRACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE METANO <i>IN VITRO</i>	43
6.1. Introducción.....	43
6.2. Materiales y Métodos.....	45
6.2.1. Producción <i>in vitro</i> de CH ₄ , CO ₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica.....	45

6.2.2. Dieta experimental.....	45
6.2.3. Montaje del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	45
6.2.4. Rehidratación del inóculo liofilizado de la bacteria ruminal acetogénica e inoculación del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	46
6.2.5. Medición de CH ₄ y CO ₂ por cromatografía de gases.....	47
6.2.6. pH del medio de cultivo a 72 h de incubación.....	47
6.2.7. Concentración de ácidos grasos volátiles.....	47
6.2.8. Concentración de bacterias totales.....	48
6.2.9. Concentración de bacterias celulolíticas.....	49
6.2.10. Concentración de bacterias utilizadoras de formato.....	49
6.2.11. Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	49
6.3. Diseño experimental.....	50
6.4. Resultados y discusión.....	51
6.4.1. Concentración de AGV.....	51
6.4.2. Degradación <i>in vitro</i> de materia seca (DIVMS) y concentración bacteriana.....	54
6.4.3. Producción <i>in vitro</i> de gas total, CO ₂ y CH ₄	56
6.5. Conclusiones.....	63
VII. LITERATURA CITADA.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
2.1 Cambios de energía estándar en las etapas de fermentación.....	8
2.2 Pares redox utilizados por acetógenos.....	10
2.3 Reacciones involucradas en el metabolismo de acetato e hidrógeno.....	12
5.1 Composición del medio de cultivo selectivo para aislar la bacteria ruminal acetogénica.....	20
5.2 Dieta integral experimental para ovinos en crecimiento.....	21
5.3 Medio de cultivo para aislamiento de bacterias ruminales totales (BRT) sin glucosa, celobiosa y almidón.....	23
5.4 pH y concentración de AGV producidos por la fermentación <i>in vitro</i> de una dieta para ovinos a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1×10^8 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1}).....	33
5.5 Degradación <i>in vitro</i> de materia seca (%) y concentración bacteriana (bacterias mL^{-1}) en los medios de cultivo a las 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1×10^8 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1}).....	35
5.6 Producción <i>in vitro</i> de gas total, porcentajes de dióxido de carbono y metano (alta concentración de la bacteria ruminal acetogénica 1×10^8 mL^{-1}).....	39
6.1 pH y concentración de AGV producidos por la fermentación <i>in vitro</i> de una dieta para ovinos a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1}).....	52
6.2 Degradación <i>in vitro</i> de materia seca (%) y concentración bacteriana (bacterias mL^{-1}) en los medios de cultivo a las 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1}).....	54
6.3 Producción total de gas <i>in vitro</i> , porcentajes de dióxido de carbono y metano, (baja concentración 1×10^6 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1}).....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
2.1 Metanogénesis. Pasos para la reducción de CO ₂	5
2.2 Metanogénesis. Pasos en la fermentación de acetato.....	6
2.3 Ruta Wood-Ljungdanl.....	11
5.1 Sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	24
5.2 Producción total de gas <i>in vitro</i> (mL) a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1x10 ⁸ bacterias ruminales acetogénicas mL ⁻¹).....	36
5.3 Porcentaje de CO ₂ con respecto al gas total a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1x10 ⁸ bacterias ruminales acetogénicas).....	37
5.4 Porcentaje de CH ₄ con respecto al gas total a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1x10 ⁸ de bacterias ruminales acetogénicas mL ⁻¹).....	38
5.5 Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia.....	41
6.1 Producción total de gas <i>in vitro</i> (mL) a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1x10 ⁶ bacterias ruminales acetogénicas mL ⁻¹).....	57
6.2 Porcentaje de CH ₄ con respecto al gas total a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1x10 ⁶ bacterias ruminales acetogénicas mL ⁻¹).....	58
6.3 Porcentaje de CO ₂ con respecto al gas total a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1x10 ⁶ bacterias ruminales acetogénicas mL ⁻¹).....	59

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La microbiota ruminal y el animal hospedero han co-evolucionado por miles de años, el proceso de fermentación ruminal es una ventaja para el animal hospedero ya que facilita la degradación de alimento fibroso que por sí mismo no podría digerir (Morgavi *et al.*, 2010). Las consecuencias negativas de la fermentación son la pérdida de energía disponible en el alimento (6 a 12 %) como gas metano el cual es liberado a través de eructos del rumiante a la atmósfera (Johnson y Johnson, 1995).

Actualmente la contribución del ganado a la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) representa cerca del 18 % del total, un porcentaje aún mayor que el emitido por el sector del transporte en todo el mundo. A la producción pecuaria se debe cerca del 9 % del total de las emisiones de dióxido de carbono, 35 % del metano y 65 % de óxido nitroso (FAO, 2006). El metano es el segundo GEI responsable del calentamiento global, después del CO₂ y tiene un potencial de calentamiento 21 veces mayor que el del CO₂ (Moss *et al.*, 2000). Las emisiones globales de CH₄ por rumiantes oscilan entre 80 a 100 x 10¹² g año⁻¹ (Kumar *et al.*, 2008).

Las alternativas para reducir las emisiones de metano ruminal se enfocan principalmente en manejo animal, composición de la dieta y manipulación del rumen (Eckard *et al.*, 2010). Sin embargo, en las últimas dos décadas, los programas de investigación en Europa, Oceanía y América del Norte han explorado una variedad de sustratos que tratan de reducir el suministro de hidrógeno metabólico para la metanogénesis (McAllister y Newbold, 2008).

A pesar de que el hidrógeno es un producto final de la fermentación de protozoarios, hongos y bacterias; este no se acumula en rumen, porque es utilizado por algunas bacterias, sobre todo metanogénicas (Boadi *et al.*, 2004). La producción de ácido acético por acetógenos en el rumen, es una vía alterna que puede ser receptora de electrones, lo que podría inhibir la metanogénesis y contribuir a cubrir los requerimientos energéticos del animal hospedero (Boccazzi y Patterson, 2011). Los objetivos de la investigación fueron, evaluar la capacidad *in vitro* de una bacteria ruminal acetogénica sobre la producción de CH₄ en una dieta con una relación forraje: concentrado de 50:50 e identificar molecularmente la bacteria ruminal aislada.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Metanogénesis en rumiantes

En ambientes anaerobios como el rumen, la eficiencia para degradar alimentos lignocelulósicos se debe a la diversidad microbiana compuesta por bacterias, protozoarios, hongos anaerobios y bacteriófagos (Kamra, 2005). Un consorcio de por lo menos tres grupos de bacterias anaerobias contribuyen en la transformación de la materia orgánica ingerida por los rumiantes a formas reducidas de carbón (metano). Un grupo de bacterias fermentadoras producen ácidos grasos de cadena corta, formato, hidrógeno y CO₂, a partir del metabolismo de aminoácidos y monosacáridos; el segundo grupo (acetógenos u homoacetógenos) oxidan los ácidos grasos a acetato, hidrógeno y formato, un último grupo (metanógenos) transforma los productos metabólicos de los primeros dos grupos en metano (Ferry y Kasted, 2007).

Los hábitats para las bacterias metanogénicas deben ser libres de oxígeno, con un potencial redox por debajo de -300 mV y un pH neutro. La mayoría de las bacterias metanogénicas son mesófilas, aunque también se han descrito especies "extremófilas" que pueden crecer a temperaturas elevadas o en concentraciones altas de sal (Boadi *et al.*, 2004; Madigan *et al.*, 2009).

2.2. Metabolismo de metanógenos

Los metanógenos generalmente compiten con tres grupos anaerobios (bacterias sulfato reductoras, acetogénicas y bacterias reductoras de hierro férrico) por los sustratos (Ferry y Kasted, 2007; Show *et al.*, 2008). Resulta interesante que los sustratos para la

metanogénesis no sean compuestos orgánicos como la glucosa, aminoácidos y ácidos orgánicos; aunque algunos componentes de la glucosa pueden convertirse en metano, pero sólo mediante la cooperación entre metanógenos y otras bacterias anaerobias (Madigan *et al.*, 2009). Las rutas metabólicas metanogénicas se clasifican en tres categorías de acuerdo a la adquisición del grupo metilo; a) reducción de CO₂, b) fermentación de acetato, c) dismutación de metanol o metilaminas (Stams y Plugge, 2010).

2.3. Reducción de CO₂

La mayoría de los metanógenos pueden crecer con hidrógeno molecular y CO₂ como única fuente energética (Thauer *et al.*, 2008; Welte y Deppenmeier, 2011). Los electrones para reducir CO₂ a CH₄ durante la metanogénesis proceden principalmente del hidrógeno (Figura 2.1), el CO₂ se activa con una enzima que contiene metanofurano. El donador de electrones es la ferredoxina. El grupo formilo se transfiere del metanofurano a una enzima que contiene metanopterina. Posteriormente se deshidrata y se reduce en dos etapas diferentes a los niveles de metileno y metilo. El grupo metileno se transfiere desde la metanopterina a una enzima que contiene coenzima M (CoM). El metil-CoM se reduce a metano con la metil-reductasa mediante una reacción en la que intervienen F₄₃₀ y la coenzima B (CoB), y forman un complejo Ni²⁺-CH₃, que se reduce mediante la CoB para generar CH₄ y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S-S-CoB). La CoM y CoB libres se regeneran mediante la reducción de CoM-S-S-CoB con hidrogeno (Madigan *et al.*, 2009).

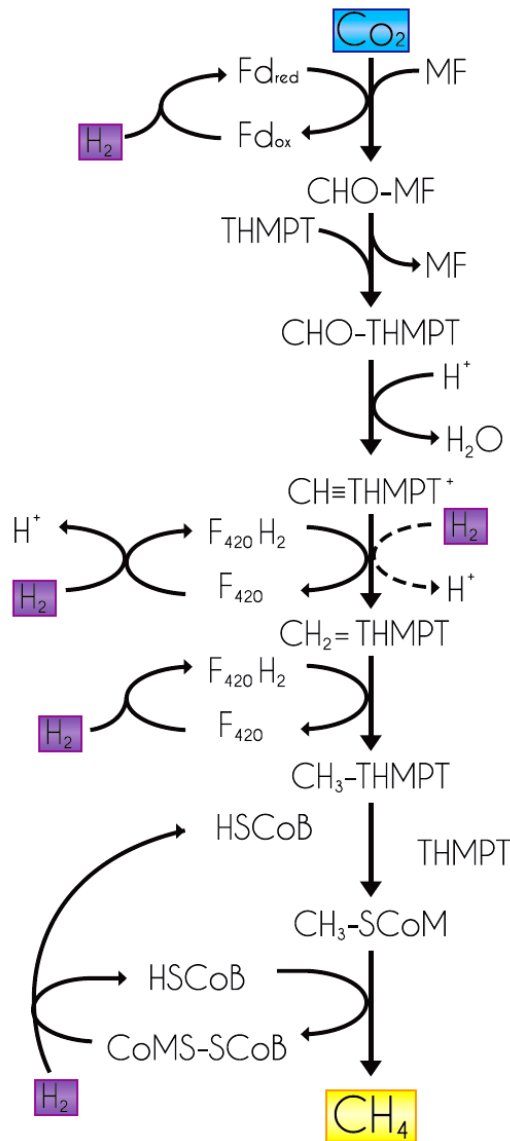


Figura 2.1. Metanogénesis. Pasos para la reducción de CO₂ (Adaptada de Ferry y Kasted, 2007).

2.4. Fermentación de acetato

La mayoría del metano producido en la naturaleza se deriva del grupo metilo del acetato sin embargo, la cantidad de metano producido del grupo metilo del acetato o de la reducción de acetato puede variar dependiendo de la presencia de otras bacterias

anaerobios en el ambiente. Durante este proceso el acetato es activado a acetyl-CoA, seguido de un rompimiento de los enlaces carbono-carbono y carbono sulfuro

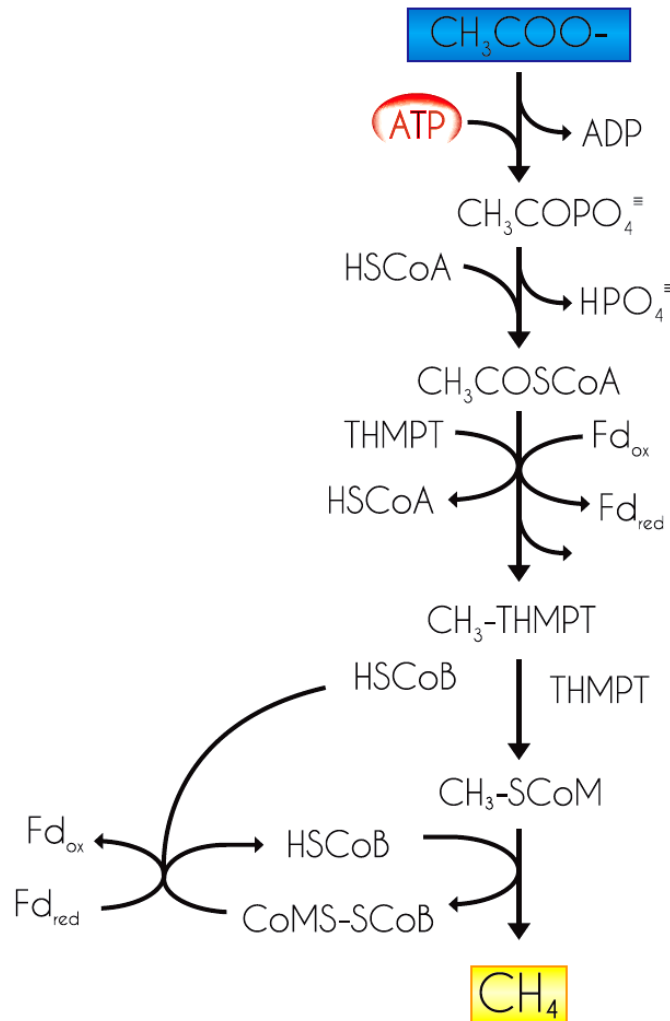


Figura 2.2. Metanogénesis. Pasos en la fermentación de acetato (Adaptada de Ferry y Kasted, 2007).

(descarbonización), catalizado por el componente níquel/ión-sulfuro del complejo enzimático CODH (CO deshidrogenasa). Posteriormente el componente níquel/ion-

sulfuro del complejo oxida el grupo carbonilo hasta CO_2 y reduce una ferredoxina. El grupo metilo es transferido al otro componente del complejo enzimático (cobalto/ion sulfuro) y finalmente la coenzima M (HS-CoM) cataliza por lo menos dos metiltransferasas. La $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$, que es reductivamente desmetilada a metano (Figura 2.2) con electrones derivados de átomos de sulfuro de $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ y HS-HTP formando heterodisulfuro CoM-S-S-HTP (Ferry, 1993).

2.5. Dismutación de metanol o metilaminas

Los géneros *Methanosarcina* y *Methanococoides* convierten los grupos metilo de compuestos simples de un sólo carbono, como el metanol y metilaminas a metano y dióxido de carbono para su crecimiento (Ferry y Kasted, 2007). Los compuestos metilados (metanol) se catabolizan donando grupos metilo a una proteína corrinoide para formar $\text{CH}_3\text{-corrinoide}$. Los corrinoideos son las estructuras de las que derivan compuestos como la vitamina B_{12} y contiene un anillo de corrina porfirinoide con un átomo de cobalto en el centro. El complejo $\text{CH}_3\text{-corrinoide}$ transfiere el grupo metilo a la CoM, lo que produce $\text{CH}_3\text{-CoM}$ a partir de la cual se forma metano del mismo modo que en la etapa final de la reducción del CO_2 .

Si no se dispone de poder reductor (como el H_2) para impulsar la etapa final, parte del metanol se debe oxidar a CO_2 para producir los electrones necesarios gracias a la inversión de las etapas de la metanogénesis (Madigan *et al.*, 2009). El Cuadro 1 muestra las posibles reacciones estequiometrias involucradas en cada una de las etapas de fermentación descritas.

Cuadro 2.1. Cambios de energía estándar en las etapas de fermentación.

Reacciones	$\Delta G^{0'}$ (Kj mol ⁻¹)	Referencia
Acidogénesis		
$C_6 H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H^+ + 2CO + 4H_2$	-418.1	Thauer, 1998.
$C_6 H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCOO^- + 4H^+$	-208.7	Thauer, 1998.
$C_6 H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 0.7 CH_3CH_2CH_2 COO^- + 0.6 CH_3COO^- + 1.3 H^+ + 2CO_2 + 2.6 H_2$	-280	Schink, 1997.
Acetogénesis		
$4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-105	Madigan <i>et al.</i> , 2009.
$2CO_2 + 4H_2 + nADP + nPi \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O + nATP$	-95	Müller, 2003.
Reducción de CO₂		
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-131	Tahuer <i>et al.</i> , 1993.
Fermentación de acetato		
$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + H_2O$	-36	Ferry, 1993.
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31	Madigan <i>et al.</i> , 2009.
Dismutación de metanol o metilaminas		
$4 CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + H^+ + 2H_2O$	-315	Lovley y Klug, 1983.
$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-112.5	Keltjens y Vogels, 1993.
$4 (CH_3)_3 N + 6 H_2O \rightarrow 9 CH_4 + 3CO_2 + 4 NH_3$	-75.8	Keltjens y Vogels, 1993.
$2 (CH_3)_2 NH_2 + 3 H_2O \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + 2NH_4^+ + H^+$	-220	Lovley y Klug, 1983.

2.6. Acetogénesis en rumiantes

Las bacterias metanogénicas son predominantes en la utilización de hidrógeno en el rumen; sin embargo, podría ser benéfico para el animal hospedero si el hidrógeno y el CO₂ fueran reducidos a acetato, ya que, esto podría minimizar pérdidas de energía para el animal (Drake y Küsel, 2003). Algunos estudios demuestran el potencial que tienen las bacterias acetogénicas como estrategia para disminuir las emisiones de metano (Le Van *et al.*, 1998; López *et al.*, 1999; Fonty *et al.*, 2007). Dependiendo del animal en

experimentación y de la dieta, la concentración de bacterias acetogénicas varía entre 10^6 y 10^9 g⁻¹ de fluido ruminal, mientras que el número de metanógenos en el rumen es de aproximadamente 10^8 a 10^9 g⁻¹ de fluido ruminal (Drake y Küsel, 2003).

2.7. Metabolismo de acetógenos

La metanogénesis es un proceso que coexiste con la acetogénesis en ambientes anaerobios. Las bacterias acetogénicas son anaerobias estrictas, usan la vía reductiva acetil-CoA o la ruta Wood-Ljungdahl como sus principales mecanismos de conservación de energía. (Müller, 2003; Ragsdale y Pierce, 2008). Algunas bacterias acetogénicas pueden usar una variedad de sustratos, incluyendo productos de la biodegradación de polímeros naturales, azúcares, alcoholes, componentes aromáticos y gases inorgánicos; CO, H₂, CO₂ (Ragsdale, 2008).

La acetogénesis es mínima en el rumen, aunque está presente probablemente debido a la capacidad de las bacterias para utilizar una diversidad de sustratos, además de CO₂/H₂ como fuente energética (Ungerfeld y Kohn, 2006), estos sustratos y el producto reducido se muestran en el Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Pares redox que pueden ser utilizados por acetógenos.

Donadores de electrones		Aceptores de electrones		Producto Reducido
CO, H ₂	Alcoholes	CO ₂	→	Acetato
Formato	Hexosas	Fumarato	→	Succionato
CH ₃ Cl	Pentosas	Nitrato	→	Nitrito
Piruvato	Betaína	Nitrito	→	Amonio
Lactato	Acetoína	Tiosulfato	→	Sulfato
Glicolato	Citrato	Piruvato	→	Lactato
Glioxilato	Celobiosa	CO ₂	→	Formato
Oxalato		H ⁺	→	H ₂

Adaptado de Ragsdale y Pierce (2008).

2.8. Ruta Wood-Ljungdanl

La ruta Wood-Ljungdanl (Figura 2.3) es usada por bacterias autótrofas en dirección reductiva para conservar energía y de asimilación de carbono en acetógenos (Ragsdale y Pierce, 2008). La primera fase en la formación del grupo metilo es la reducción del CO₂ a formato, catalizado por la enzima formato deshidrogenasa. El formato es activado y enlazado a la molécula de tetrahidrofolato (H₄F), produciendo formil-H₄. En este proceso se libera agua, resultando un grupo metenil que es reducido de metileno-H₄F a metilo-H₄F. El grupo metilo es transferido a una proteína que contiene un co-factor corrinoide y grupos de hierro azufre; la proteína corrinoide de hierro azufre (CFeSP). De aquí, el grupo metilo es transferido a la bi-funcional CO-deshidrogenasa/acetil-CoA sintetasa (CODH/ACS) que juega un papel central en la ruta. El grupo metilo es condensado sobre la CODH/ACS con monóxido de carbono, derivado de otra molécula de CO₂ oxidada por la actividad de la CODH a acetil-CoA. El

acetato es producido de la Acetil-CoA, por la acción de la fosfotrasacetilasa y la acetato quinasa (Müller, 2003).

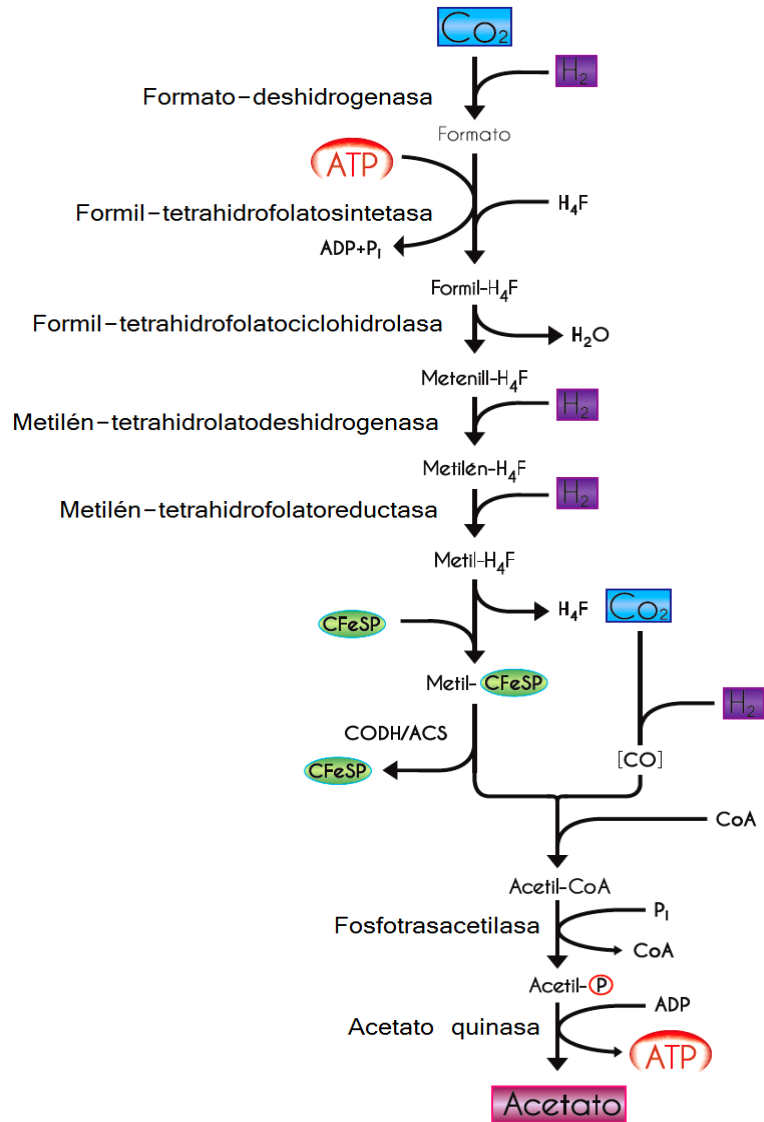


Figura 2.3. Ruta Wood-Ljungdahl (Adaptado de Drake y Küsel, 2003).

2.9. Comparación energética entre acetogénesis y metanogénesis

En condiciones estándares el cambio de energía para metanogénesis a partir de hidrógeno y CO₂, es más exergónica que el de la acetogénesis ($\Delta G^{\circ} = -135.6 \text{ KJ mol}^{-1}$ de metano y $\Delta G^{\circ} = -104.6 \text{ KJ mol}^{-1}$ de acetato, respectivamente; Drake y Küsel, 2003). El ΔG° para acetogénesis es poco probable que genere suficiente síntesis de ATP y que permita un crecimiento significativo (Ungerfeld y Kohn, 2006). Sin embargo, bajo ciertas condiciones o en ambientes donde se inhibe la metanogénesis (Nollet *et al.*, 1997; López *et al.*, 1999) se puede favorecer la acetogénesis Drake y Küsel (2003).

Cuadro 2.3. Reacciones involucradas en el metabolismo de acetato e hidrógeno (Hattori, 2008).

Proceso	Reacción	ΔG° (Kj/mol)
(1) Metanogénesis acetoclástica	$*\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow *\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31.0
(2) Oxidación de acetato	$*\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^* \text{CO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$	+ 104.6
(3) Metanogénesis (hidrogenotrófica)	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
(4) Suma (2)+(3)	$*\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^* \text{CO}_3^- + \text{CH}_4$	-31.0
(5) Acetogénesis (hidrogenotrófica)	$4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-104.6

(*) Representa el carbono libre del grupo metilo del acetato. Asumiendo que 100 % del carbono marcado fue convertido a metano.

2.10. Opciones para disminuir la metanogénesis ruminal

La importancia y el interés del tema se han remarcado considerablemente a raíz del impacto ambiental (FAO, 2006). Las tecnologías para reducir las emisiones de

metano ruminal pueden agruparse en tres grupos; fisiológicas y de manejo animal, composición de la dieta, y manipulación ruminal (Eckard *et al.*, 2010).

La estrategia de manejo básicamente se divide en dos partes: la forma de crianza y el de sistema de explotación animal. Desechar animales viejos y reducir los periodos de lactancia minimizan la emisión de GEI y mejoran la rentabilidad de la explotación. Algunos autores plantean que el ganado sometido a sistemas de producción intensivas, producen menos cantidades de metano, en relación a los animales criados en sistemas extensivos (Clemens y Ahlgrimm, 2001).

Los componentes de la dieta especialmente referido al tipo de carbohidratos, son capaces de modificar el pH ruminal y por consiguiente alterar la microbiota presente (Calsamiglia *et al.*, 2008). La producción de metano en rumiantes tiende a decrecer en forrajes de mayor calidad nutritiva. La fermentación acética es resultado de dietas altas en forraje, como resultado se incrementa la producción de metano comparada con la obtenida en la fermentación propiónica (Mirzaei y Maheri, 2011). Por lo tanto, el uso de los forrajes de mejor digestibilidad y consumo de materia seca por el animal, reducen las emisiones de CH₄ (Eckard *et al.*, 2010).

Existe una variedad de aditivos capaces de inhibir la producción de metano (Itabashi *et al.*, 2000). La adición de grasas en la ración es una estrategia común. Los ácidos grasos insaturados compiten con la metanogénesis por los equivalentes de reducción durante la biohidrogenación en el rumen (Czerkawski *et al.*, 1966). Los inhibidores más efectivos incluyen ácidos grasos como linoléico y ácido cis-oleico y algunos ácidos grasos saturados como behénico y esteárico (Zawadzki, 1986).

Manipulación ruminal. Ecológicamente las bacterias sintróficas son conexiones claves en las porciones anóxicas del ciclo del carbono, sin ellos se generaría un cuello de botella y los aceptores de electrones alternativos al CO₂ serían escasos (Madigan *et al.*, 2009). Es importante reconocer que la reducción de CO₂ a metano proporciona la misma función en el rumen como en otros hábitats anaerobios, es un mecanismo para eliminar continuamente el hidrógeno producto de la fermentación. Por consiguiente, la reducción o inhibición de la metanogénesis requerirá del establecimiento de rutas que dispongan de los electrones generados (Weimer, 1998; Morgavi *et al.*, 2010). La acetogénesis como una opción para reducir CH₄ ruminal es todavía muy conceptual, aún se requiere de una amplia investigación para comprender su ecología, se conoce su dominio relativo en algunos entornos pero no en el rumen (Eckard *et al.*, 2010).

2.11. Bacteria ruminal acetogénica

Con un medio de cultivo anaerobio a base de formato, líquido ruminal clarificado y cloranfenicol, Rodríguez (2009) aisló del rumen de ovinos adultos alimentados con paja de avena y concentrado, una bacteria ruminal acetogénica, la bacteria se conservó liofilizada, se determinó una concentración de 1.5×10^8 bacterias g⁻¹ de liofilizado a 48 h de incubación. La inoculación de la bacteria aislada en cocultivo con bacterias ruminales disminuyó en 66 % la producción de metano respecto a un cultivo de bacterias ruminales, no afectó la digestibilidad de la materia seca y la producción de AGV no mostró diferencias significativas. La primer identificación molecular en base a la subunidad ARN 16 ribosomal indicó que la bacteria aislada pertenece a la especie *Pantoea agglomerans* (FJ357811), como esta especie es fitopatógena y no concuerda

con la morfología, ni pruebas bioquímicas evaluadas en la bacteria, se realizó una segunda identificación molecular, de la cual obtuvo una secuencia de 1125 pb que registró 90% de pariedad con una bacteria del epitelio ruminal no cultivable (AM884100.1; GenBank).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad *in vitro* de una bacteria ruminal acetogénica a dos concentraciones, 10^6 y 10^8 bacterias mL^{-1} en la producción de CH_4 con una dieta para ovinos con una relación forraje: concentrado de 50:50, e identificar molecularmente la bacteria aislada con base a la secuencia del gen ADNr 16S.

3.2. Objetivos específicos

Cuantificar la producción *in vitro* de CO_2 y CH_4 de una bacteria ruminal acetogénica sola y en cocultivo con bacterias ruminales, con una dieta para ovinos con relación forraje: concentrado de 50:50 como sustrato.

Caracterizar el perfil de ácidos grasos volátiles de la bacteria acetogénica sola o en cocultivo con bacterias ruminales.

Estimar el efecto de la bacteria ruminal acetogénica en la degradación *in vitro* de la materia seca y la concentración de bacterias a 72 h de incubación.

Identificar molecularmente a la bacteria acetogénica aislada con base en la secuencia de la subunidad del ribosoma ADNr 16S.

IV. HIPÓTESIS

La bacteria ruminal acetogénica aislada tiene potencial para disminuir la producción de metano *in vitro* y aumentar la producción de acetato en cocultivo con bacterias ruminales en dieta para ovinos con una relación forraje: concentrado de 50:50.

La concentración de 10^6 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1} tiene un efecto similar a una concentración de 10^8 bacterias mL^{-1} , en la producción de metano *in vitro*, sola o en cocultivo con bacterias ruminales.

La bacteria ruminal acetogénica no afecta la degradación *in vitro* de la materia seca en cocultivo con bacterias ruminales.

V. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UNA BACTERIA ACETOGÉNICA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*

5.1. Introducción

La sustentabilidad de la producción ganadera ha sido debate de investigaciones recientes, el enfoque principal no sólo cuestiona prácticas comunes como deforestación de bosques y erosión de pastizales; sino también examina los efectos que provocan los gases efecto invernadero emitidos durante el eructo, derivados de la fermentación entérica ruminal.

Disminuir las emisiones de metano ruminal, sin alterar negativamente los parámetros productivos de los rumiantes, es la mejor estrategia para reducir los gases de efecto invernadero (Martin *et al.*, 2008). La intervención directa en el rumen tiene potencial para controlar las emisiones de metano. Al respecto las bacterias acetogénicas que normalmente se encuentran en el rumen son de interés, porque pueden usar hidrógeno, un intermediario esencial en la formación de metano (Joblin, 1999).

Identificar grupos importantes o especies microbianas utilizando técnicas basadas en genética molecular puede ayudar a explicar su papel en el metabolismo ruminal. Alrededor de 3000 secuencias de la subunidad pequeña del ribosoma ADNr 16S de bacterias ruminales han sido archivadas en bases de datos internacionales (Firkins y Yu, 2006). Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue cuantificar el efecto de una bacteria ruminal acetogénica sobre la producción de metano *in vitro* e integrar los aspectos metabólicos con su identificación molecular.

5.2. Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

5.2.1. Hidratación del liofilizado de la bacteria ruminal acetogénica y concentración bacteriana.

Se utilizó un cultivo puro de bacterias acetogénicas (BRA) obtenido por Rodríguez (2009). La concentración de bacterias por mililitro se determinó por el método del número más probable (NMP) según (Harrigan y McCance, 1979). Se hidrató 0.5 g de liofilizado en 9 mL del medio selectivo (Cuadro 5.1) bajo flujo de CO₂ en una campana de flujo laminar vertical marca Labconco modelo Purifier Class II y se dejó incubar por 6 h a 39 °C. Al término de las 6 horas se realizaron diluciones (1 mL del medio rehidratado en 9 mL del medio selectivo estéril, Cuadro 5.1) de 10⁻¹ a 10⁻¹² por quintuplicado y se incubaron durante 48 h a 39 °C. Se consideró crecimiento positivo aquellos tubos que presentaron turbidez. El medio selectivo se preparó siguiendo la metodología descrita por Cobos y Yokoyama (1995) y Hungate (1969). En tubos de 18 x 150 mm se depositaron 9 mL del medio y se incubaron a 39 °C por 48 h para comprobar esterilidad.

Para calcular un rango estadístico del NMP (Harrigan y McCance, 1979) con 95% de confiabilidad se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de bacterias} = \text{NMP}/6.61 \text{ a } \text{NMP} \times 6.61.$$

Cuadro 5.1. Composición del medio de cultivo selectivo para aislar la bacteria ruminal acetogénica.

Componente	Cantidad por 100 mL
Agua destilada, mL	48.5
Líquido ruminal clarificado, mL ¹	30.0
Solución mineral I, mL ²	5.0
Solución mineral II, mL ³	5.0
Resazurina 1 %, mL ⁴	0.1
Extracto de levadura, g	0.2
Carbonato de sodio 8 %, mL ⁵	7.0
Solución cisteína – sulfito de sodio, mL ⁶	2.0
Acetato de sodio, g	0.1
Formato de sodio, g	1.0

(1) Líquido ruminal clarificado, previamente filtrado en una gasa triple, centrifugado a 11,000 rpm (15,550 Xg) y esterilizado por 15 min a 15 psi y 121°C.

(2) Contiene 6 g de K₂HPO₄ por 1000 mL de H₂O.

(3) Contiene 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl*H₂O por 1000 mL de H₂O.

(4) Agregar 0.1 mL de solución 1% en agua y aforar a 100 mL con agua destilada.

(5) 8 g de carbonato de sodio en 1000 mL de agua destilada.

(6) 2.5g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH); 2.5 g de Na₂S-9H₂O y 0.1 ml de resazurina en un vol. final de 100 mL.

5.2.2. Liofilización de la bacteria ruminal acetogénica

Antes de liofilizar la BRA se comprobó que provenía de un cultivo axénico. Se realizaron pruebas de tinción Gram con el kit de la compañía Hycel de México S. A. de C. V., siguiendo las instrucciones del proveedor. La caracterización morfológica bacteriana y tinción Gram se realizó con un microscopio de contraste de fases marca Carl Zeiss a una magnificación de 100x. El proceso de liofilización de la BRA, se realizó de la siguiente manera, se hidrató 0.5 g en 9 mL de su medio selectivo (Cuadro

5.1) y se dejó incubar por 24 h, se transfirieron 3 mL del cultivo hidratado con jeringas estériles de 5 mL en seis viales serológicos de 100 mL que contenían 42 mL de medio selectivo BRA previamente esterilizados, se dejaron incubar 24 h al termino, los viales se congelaron a -45°C en un congelador de rodillo Labconco, Shell Freezer. Finalmente, se colocaron en una liofilizadora Labconco, modelo FreeZone 4.5, unida a una bomba de vacío Labconco, modelo 117. La liofilización se realizó a una temperatura de -40 °C, y una presión de 133×10^{-3} mBar durante 24 h.

5.2.3. Producción *in vitro* de CH₄, CO₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica

Para estimar la producción de gas *in vitro* de la BRA, se balanceó una dieta integral para ovinos en crecimiento (Cuadro 5.2), se calculó el aporte de energía metabolizable (2.5 Mcal) y de proteína cruda (PC) 12 % de acuerdo a los requerimientos

Cuadro 5.2. Dieta integral experimental para ovinos en crecimiento.

Ingrediente	% ¹
Maíz molido	18.0
Sorgo (8-10 PC)	13.8
Pasta de soya	3.0
Heno de alfalfa	10.0
Rastrojo maíz	40.0
Gluten maíz	10.0
Mezcla mineral	0.1
Melaza	5.0
Urea	0.1

¹En base seca

nutritivos y composición de los alimentos del NRC (1985), con una relación forraje: concentrado de 50:50. Los ingredientes fueron molidos hasta un tamaño de partícula \leq 2.0 mm.

5.2.4. Montaje del sistema de producción de gas *in vitro*

Se usaron 15 viales serológicos de 100 mL como digestores a cada uno se le adicionaron 2 g de la dieta experimental (Cuadro, 5.2), más 43 mL del medio de cultivo para bacterias ruminales totales, sin glucosa, celobiosa y almidón (Cuadro, 5.3) bajo flujo de CO₂. Los viales fueron sellados con tapones de plástico y tapas de aluminio. Se esterilizaron a 125 °C y 15 psi, durante 15 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 6 h y se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

La trampa de solución salina donde se capturó el gas producido se preparó con 400 g de NaCl en 1 Litro de H₂O destilada, se ajustó el pH \leq 2 y se agregó 5 mL de indicador anaranjado de metilo al 20 %. Se depositó en viales serológicos de 100 mL sin dejar espacio de cabeza y fueron sellados con tapones de hule y casquillos de aluminio.

5.2.5. Rehidratación del inóculo liofilizado de la bacteria ruminal acetogénica e inoculación del sistema de producción de gas *in vitro*.

Con la finalidad de contar con suficiente inóculo de bacterias acetogénicas para los diferentes estudios, se rehidrató 1 g de la BRA en 100 mL de su medio selectivo (Cuadro 5.1) bajo flujo de CO₂, en una campana de flujo laminar vertical y se dejó incubar a 39 °C por 24 h.

El inóculo de bacterias ruminales totales (IBRT) se extrajo de una vaca Holstein (450 kg de peso vivo) fistulada en el rumen, alimentada en una pradera de alfalfa, se filtró con tela "velo de novia" y fue centrifugado a 3000 rpm (4240 Xg) por 3 minutos. La concentración de la BRA fue de 2.28×10^8 bacterias mL^{-1} , mientras la concentración IBRT fue aproximadamente de 8.45×10^{10} bacterias mL^{-1} por lo que se diluyeron 10 mL del IBRT en 90 mL del medio para bacterias ruminales totales (BRT) sin nutrientes energéticos (Cuadro 5.3), hasta tener una concentración bacteriana similar entre los dos inóculos de 10^8 bacterias mL^{-1} .

Cuadro 5.3. Medio de cultivo para aislamiento de bacterias ruminales totales (BRT) sin glucosa, celobiosa y almidón.

Componente	Cantidad por 100 mL de medio
Agua destilada, mL	50.6
Líquido ruminal clarificado, mL ¹	30.0
Solución mineral I, mL ²	5.0
Solución mineral II, mL ³	5.0
Resarzurina 0.1%, mL	0.1
Extracto de levadura, g	0.1
Peptona de soya, g	0.2
Carbonato de sodio 8%, mL	7.0
Cisteína-sulfido ⁴ , mL	2.0

(1) El fluido ruminal fresco se filtró con tela velo de novia, se centrifugó a 11 000 rpm (15,550 Xg) por 10 min a 4°C y se esterilizó por 60 minutos a 121°C.

(2) Contiene (por cada 1000 mL) K_2HPO_4 , 6.0 g.

(3) Contiene (por cada 1000 mL) KH_2PO_4 , 6.0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.0 g; NaCl, 12.0 g; MgSO_4 , 2.45 g; $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g.

(4) 2.5 g de L-cisteína (disuelto en 15 mL de NaOH 2N) más 2.5 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. La mezcla es aforada en 100 mL de agua destilada y esterilizada por 15 min a 15 psi y 121°C.

La inoculación se realizó por quintuplicado con jeringas estériles desechables de 10 mL en los digestores antes descritos; 5 mL del inóculo de la BRA sola, 5 mL de un inóculo de bacterias ruminales totales IBRT y una mezcla de 2.5 mL de IBRT más 2.5 mL de BRA (IBRT+BRA). Cada digestor se conectó con mangueras de tygon, de 40 cm de largo y 5 mm de diámetro a una trampa de solución salina.

Las trampas contaron con una válvula de alivio para igualar la presión atmosférica y se colocaron invertidas sobre probetas de 50 mL. Solamente los digestores se colocaron en un baño María a 39°C (Figura 5.1). El registro de solución salina desplazada se midió en las probetas de 50 mL, a las 24, 48 y 72 h de incubación. Por lo que en cada tiempo de incubación se cambiaron todas las trampas de solución salina.

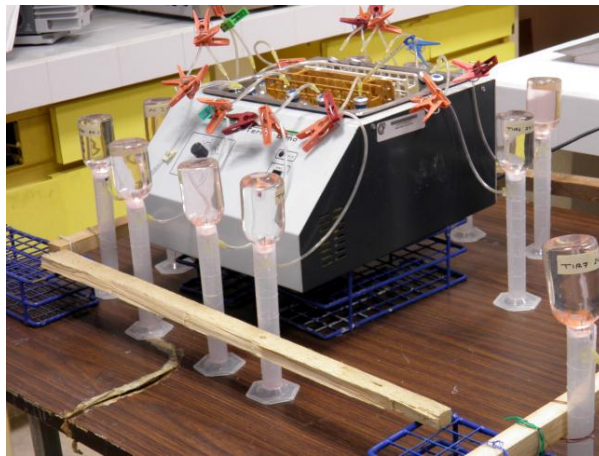


Figura 5.1. Sistema de producción de gas *in vitro*.

5.2.6. Medición de gas total, CH₄ y CO₂ por cromatografía de gases

El gas total se registró con el desplazamiento de las trampas de solución salina y fue medido en probetas de 50 mL, el gas capturado en las trampas de solución salina fue sometido a conductividad térmica (TCD) por cromatografía de gases para determinar el

porcentaje de CH₄ y CO₂. Se utilizó un cromatógrafo de gases Claurus 500, Perkin Elmer y una columna PE 6'x1/8 ODSS: Porapak 080/100. Se inyectó 0.1 mL de muestra de forma manual. Las características y condiciones del método fueron: a) temperatura de la rampa en el horno de inicio 28°C min.⁻¹, rampa 2.5°C min.⁻¹, final 35°C 0.5 min.⁻¹; b) temperatura del inyector TCD 130°C; c) volumen de inyección 0.1 mL., d) flujo del gas acarreador (helio) 23.5 mL min⁻¹, y e) tiempo de retención fue: CH₄ 1 min ± 0.05 y CO₂ 2 min ± 0.05.

5.2.7. pH del medio de cultivo a 72 h de incubación

El pH se determinó después de 72 h de incubación en cada digestor con un potenciómetro marca Orion modelo 240A calibrado a dos puntos (4.0 y 7.0).

5.2.8. Concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV se determinó después de 72 h de incubación. De cada digestor se transfirió 1.5 mL del medio de cultivo a un vial de 2 mL que contenía 0.375 mL de ácido metafosfórico al 25 %. En una centrifuga Eppendorf 5810R, se centrifugaron a 14,000 rpm (20,000 Xg) por 15 min a 4 °C. El sobrenadante recuperado fue usado para determinar AGV en un cromatógrafo de gases Claurus 500, Perkin Elmer con auto muestreador y columna capilar Elite FFAP. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador. La calibración del estándar se realizó por triplicado. Las características y condiciones fueron: a) temperatura de horno: inicio 95° C 0.5 min.⁻¹, rampa 15°C min⁻¹, final 160° 1.5 min⁻¹; b) temperatura FID 250° C; c) temperatura del inyector 196° C; d) volumen de inyección 1.0 µL; e) flujo de inyección 15 µL min⁻¹; f) tiempo de retención

fue: acetato 3.244 min, de propionato 3.869 min, y butirato 4.549 min g) tiempo de la corrida total 4.80 min por muestra.

5.2.9. Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales se determinó a las 72 h de incubación en los digestores, usando una cámara para Petroff-Hausser y un microscopio de contraste de fases marca Carl Zeiss a una magnificación de 100x. Las bacterias se fijaron en una solución de formaldehído al 18.5 % (3 mL de muestra en 1 mL de la solución de fijadora). Debido a la alta concentración bacteriana en los tratamientos, se diluyó 0.5 mL de la muestra fijada en 4.5 mL de H₂O destilada. La concentración de bacterias por mililitro se determinó como el promedio de bacterias observado en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de dilución y el factor de la cámara (2×10^7), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias mL}^{-1} = \bar{X} \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2 \times 10^7$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de células en cada cuadrícula por tratamiento

FD1 = Primer factor de dilución (3).

FD2 = Segundo factor de dilución (9).

5.2.10. Concentración de bacterias celulolíticas

La concentración de bacterias celulolíticas se estimó por método del número más probable (NMP) según Harrigan y McCance (1979) después de 72 h de incubación en los digestores. La prueba se realizó por triplicado con diluciones de 0.5 mL en tubos de

13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo para BRT (Cuadro 5.3) más una tira de papel Whatman 541. Las diluciones fueron de 10^{-1} a 10^{-12} . Se consideró como crecimiento positivo de bacterias celulolíticas a aquellos tubos de cultivo que presentaron degradación de la tira de papel después de 7 días de incubación a 39°C.

5.2.11. Concentración de bacterias formatotróficas

La concentración de bacterias utilizadoras de formato se estimó por método del NMP (Harrigan y McCance, 1979) después de 72 h de incubación en los digestores. La prueba se realizó por triplicado con diluciones de 0.5 mL en tubos de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL del medio de aislamiento a base de formato (Cuadro 5.1). Las diluciones fueron de 10^{-1} a 10^{-12} . Se consideró como crecimiento positivo a todos los tubos de cultivo que desarrollaron turbidez después de 72 h de incubación.

5.2.12. Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Después de las 72 h de incubación, se filtró la materia seca (MS) no degradada de los digestores en papel Whatman 514 de 12 cm de diámetro; con un equipo de filtración con bomba de vacío, el residuo se secó a 70 °C durante 24 h, para obtener el peso constante y se pesó en una balanza analítica.

Se determinó la degradación de la MS por la diferencia entre el peso de la MS inicial y final, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DIVMS} = \frac{(\text{Peso del papel} + \text{muestra}) - \text{Peso del papel}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

5.3. Diseño experimental

La producción total de gas y el porcentaje de CH₄ y de CO₂ del gas acumulado se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo con el procedimiento PROC MIXED (SAS, 1998). Los tratamientos evaluados fueron: a) inóculo de bacteria ruminal acetogénicas (BRA), b) bacteria ruminal acetogénica + inóculo de bacterias ruminales totales (IBRT+BRA) y c) inóculo de bacterias ruminales totales (IBRT) con cinco repeticiones por tratamiento. La estructura de covarianza se determinó individualmente a cada variable: gas total = componentes de varianza (VC); porcentaje de CH₄ = simetría compuesta (CS); porcentaje de CO₂ = auto regresiva de primer orden AR(1). Para las variables expresadas en porcentaje (Y_i) primero se efectuó una transformación angular [arcoseno (Y_i)^{1/2}]. La comparación de medias se efectuó con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). Finalmente los resultados se presentan en unidades originales.

Las variables AGV (acetato, propionato y butirato), pH, degradación *in vitro* de la materia seca, concentración de bacterias totales, celulolíticas y formatotróficas se analizaron mediante un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones. La comparación de medias se realizó con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$), de acuerdo con el procedimiento PROC GLM (SAS, 1998). Para las variables concentración de bacterias totales, celulolíticas y formatotróficas, se realizaron repeticiones por triplicado y se realizó una transformación logarítmica, con la función log(1) de (SAS, 1998) presentándose los datos en unidades originales.

5.4. Identificación molecular de la bacteria ruminal acetogénica

5.4.1. Extracción de ADN

Se hidrató 0.5 de la BRA liofilizada en 9 mL de su medio selectivo y se incubó a 39 °C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó 5000 Xg por 2 min, se eliminó el sobrenadante y sobre el pellet formado se agregaron 30 µL de buffer de lisis (desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas IREGED, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo), la muestra se dejó incubar a 95 °C por 5 min, posteriormente a 4° C por 5 min y nuevamente a 95 °C por 5 min, se centrifugó a 5000 Xg por 2 min, el sobrenadante se colocó en un tubo limpio estéril, se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop, modelo 2000c (ThermoUSA) para las amplificaciones de los genes ribosomales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.4.2. Amplificación del ADNr 16S

Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, el alineamiento a 57 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 2 min; finalmente un ciclo de amplificación a 72 °C por 10 min. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México). Las amplificaciones se visualizaron por electroforesis horizontal en el equipo Thermo EC Maxicell Primo EC 340; en geles de agarosa de baja electroendosmosis al 1.5 % (p/v) [1.5 g de agarosa/100 mL solución TAE 1X (Tris 40 mM pH 8,0; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM)]. Usando como buffer de corrida TAE

1X. Las bandas se visualizaron bajo luz UV (365 nm) con SYBR Green (invitrogen) en concentración 1:10000 en el transiluminador KODAK Gel Logic 100 Imaging System. El producto de PCR amplificado ADNr 16S se purificó usando el Kit Wizard SV gel and PCR Cleand VP-System PROMEGA, siguiendo las indicaciones del proveedor.

5.4.3. Análisis de la secuencia y la construcción del árbol filogenético

La secuenciación nucleotídica del segmento de ADN se llevó a cabo con el equipo 3130 Genetic Analice. Las secuencias se ensamblaron y editaron usando BioEdit Sequence Alignmet (versión 7.0.9.0) (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia fue comparada en el BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para el análisis filogenético, la secuencia consenso se compiló en un archivo fasta y se alineó con el profile mode Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el programa MEGA versión 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) y analizada con el método de Máxima Parsimonia. Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, un análisis bootstrap se estimó con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985). La secuencia de *Clostridium paraputrificum*, la especie filogenética más cercana y otras especies de *Clostridium* se obtuvieron del GenBank (NCBI), y se incluyeron como especies de referencia en el presente estudio. *Enterobacter hormaechei* JN244975 se asignó como fuera de grupo para la construcción del árbol filogenético (Figura 5.5).

5.5. Resultados y discusión

5.5.1. Bacterias viables en el liofilizado

Después de rehidratar el cultivo puro liofilizado previamente aislado por Rodríguez (2009), se observó que conservó un sólo tipo de morfología microbiana y se determinó que la bacteria aislada era un coco Gram+, por lo que se liofilizó nuevamente la BRA para disponer de suficiente material en los diferentes experimentos.

La concentración del cultivo puro (BRA) fue de 7.5×10^7 bacterias viables 0.5 g^{-1} de liofilizado a 48 h de incubación, con un intervalo de confianza de acuerdo a la técnica del NMP, de 1.13×10^7 a 4.9×10^8 bacterias viables 0.5 g^{-1} de liofilizado. Aunque liofilizar es un método muy utilizado para conservar microorganismos, algunas bacterias son sensibles a este proceso, por lo que es importante determinar las características termo físicas del proceso, que minimicen la muerte celular durante la congelación, como durante la sublimación, la desorción e incluso, el almacenamiento (Borrego, 2001).

5.5.2. Concentración de AGV

De todos los factores del medio ruminal, el pH es más susceptible a variación y la composición de la ración es uno de los factores más importante de estos cambios (Calsamiglia y Ferret, 2002). El pH del tratamiento IBRT estuvo en un rango normal de acuerdo a las condiciones del rumen de animales sanos (Cunningham y Bradley, 2009), mientras que en los tratamientos BRA e IBRT+BRA disminuyó ($p < 0.05$; Cuadro 5.4) lo que se atribuye a los metabolitos ácidos que produjeron las bacterias acetogénicas.

Aunque se desconoce el tiempo en que inició el pH ácido después de incubar los digestores con los inóculos (BRA e IBRT+BRA), Cerrato *et al.* (2008), reportaron que la actividad microbiana sometida a un pH de 5.6 por 4 h d⁻¹, durante tres días, en una dieta con 38 % de forraje, no tiene influencia en el perfil de AGV.

La concentración total de AGV fue mayor ($p<0.05$; Cuadro 5.4) en el IBRT, seguido del cultivo IBRT+BRA y la BRA. El porcentaje de propionato fue mayor ($p<0.05$) en el IBRT debido probablemente a que se extrajo el fluido ruminal después del consumo de alimentos por el animal (Posada y Noguera, 2005). El efecto de la bacteria ruminal acetogénica sobre el perfil de AGV es significativo y modifica la relación acetato: propionato (a:p) en los tratamientos que la involucran (BRA e IBRT+BRA), la concentración de acetato fue mayor ($p<0.05$) para ambos casos, mientras que en el IBRT fue menor (Cuadro 5.4). Los desenlaces de perfil de AGV sobre el animal hospedero no siempre son favorables, mientras que la formación de propionato conserva más energía fermentada en rumen, concentraciones excesivas pueden tener consecuencias indeseables sobre la producción animal como, reducción en consumo de alimento, bajo contenido de grasa en leche y síndrome de la grasa blanda en borregas (Ungerfeld y Kohn, 2006).

El porcentaje de acetato fue mayor ($p<0.05$) en el tratamiento IBRT+BRA respecto a los tratamientos BRA e IBRT. La interacción de la BRA con bacterias ruminales indica su alta capacidad para sintetizar ácido acético de los sustratos disponibles durante la fermentación. López *et al.* (1999) señalaron el efecto significativo de la bacteria acetogénica *Eubacterium limosum* ATCC 8486 en cocultivo con bacterias

ruminales, la concentración de acetato aumentó en un medio inoculado con *E. limosum* con relación al medio testigo (658 y 436 $\mu\text{mol } 24 \text{ h}^{-1}$, respectivamente).

Cuadro 5.4. pH y concentración de AGV producidos por la fermentación *in vitro* de una dieta para ovinos a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1×10^8 bacterias ruminales acetogénicas mL^{-1}).

Variable	Tratamiento			EEM
	BRA	IBRT+BRA	IBRT	
pH ¹	5.93 ^c	5.33 ^b	6.10 ^a	0.20
Total AGV mol L ⁻¹	41.01 ^c	72.52 ^b	117.23 ^a	7.60
Acetato, %	72.44 ^b	83.23 ^a	42.40 ^c	1.28
Propionato, %	3.81 ^c	11.39 ^b	42.76 ^a	0.68
Butirato, %	23.74 ^a	5.38 ^c	14.83 ^b	1.35
Acetato: Propionato	19.15 ^a	7.34 ^b	0.99 ^c	0.71

^{a, b, c} Medias con literales diferentes en la misma hilera difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

¹pH inicial del medio de cultivo = 6.97.

IBRT = inóculo de bacterias ruminales totales; BRA = inóculo de la bacteria ruminal acetogénica; IBRT+BRA = inóculo de bacterias ruminales totales + bacteria ruminal acetogénica.

Chaucheyras *et al.* (1995) demostraron que la bacteria acetogénica "Ser 8" en cocultivo con *S. cerevisiae* produjo más acetato ($250.76 \pm 9.2 \mu\text{mol}$) que sola o en cocultivo con *Methanobrevibacter ruminantium* (37.86 ± 4.2 y $40.26 \pm 9.9 \mu\text{mol}$, respectivamente), lo que evidenció la importancia de las vitaminas del complejo B y de los ácidos orgánicos proporcionados por *S. cerevisiae*. Algo similar pudo ocurrir en la interacción microbiana del tratamiento IBRT+BRA.

El porcentaje de butirato fue mayor ($p < 0.05$) en el cultivo de la BRA que en los tratamientos IBRT e IBRT+BRA. Al respecto, Rodríguez (2009) reportó el perfil de

AGV (3.94, 0.82 y 0.38 mol L⁻¹ de acetato, propionato y butirato, respectivamente) en una bacteria formatotrófica, con una dieta relación forraje: concentrado (f:c) de 40:60 como sustrato. Lopez *et al.* (1999) en una dieta con 50 % de forraje inoculada con *Acetitomaculum ruminis* ATCC 43876 obtuvieron un relación a:p de 1.9, lo que indica que los principales metabolitos de *A. ruminis* son el acetato y propionato. A diferencia de los reportes mencionados y basado en la relación a:p de la BRA sus principales metabolitos son acetato y butirato.

5.5.3. Degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS) y concentración bacteriana

No se encontraron diferencias ($p>0.05$; Cuadro 5.5) en la DIVMS entre los tratamientos IBRT e IBRT+BRA, lo que indica que la BRA no afectó la DIVMS en cocultivo con bacterias ruminales, al respecto Rodríguez (2009) reportó que la degradación de la materia seca a las 72 h de incubación fue similar ($p>0.05$) entre un cultivo de bacterias ruminales y un inóculo de bacterias formatotróficas más el cultivo de bacterias ruminales (60.84 vs 60.51 %).

La concentración de bacterias totales (BT) disminuyó ($p<0.05$; Cuadro 5.5) en los tratamientos BRA y IBRT+BRA en relación al IBRT, Martínez *et al.* (2010) quienes en experimentos *in vitro* usando una dieta relación f:c de 70:30, determinaron una población de bacterias totales de 1.91×10^8 células mL⁻¹, que resultó muy similar a la concentración del inóculo de bacterias ruminales.

La concentración de bacterias celulolíticas (BC) fue mayor ($p<0.05$; Cuadro 5.5) en el tratamiento IBRT y no hubo diferencias ($p>0.05$) entre los tratamientos BRA e

Cuadro 5.5. Degradación *in vitro* de materia seca (%) y concentración bacteriana (células mL⁻¹) en los medios de cultivo a las 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1 x 10⁸ de bacterias ruminales acetogénicas mL⁻¹).

Variable	Tratamiento			EEM
	BRA	IBRT ¹ +BRA	IBRT	
Bacterias totales	1.5 x 10 ^{7b}	4.7 x 10 ^{6b}	2.6 x 10 ^{8a}	0.99
Bacterias celulolíticas	9.5 x 10 ^{4b}	5.7 x 10 ^{4b}	1.8 x 10 ^{7a}	1.01
Bacterias formatotróficas	8.0 x 10 ^{5a}	4.3 x 10 ^{6a}	4.1 x 10 ^{5a}	2.29
DIVMS	62.56 ^b	75.58 ^a	72.95 ^a	2.81

^{a y b} Literales diferentes en la misma hilera difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

¹ Concentración inicial de Bacterias ruminales totales, 1 x 10⁸ mL⁻¹.

² Concentración inicial de Bacterias ruminales acetogénicas, 1x 10⁸ mL⁻¹.

IBRT = inóculo de bacterias ruminales totales; BRA = inóculo de la bacteria ruminal acetogénica; IBRT+BRA = inóculo de bacterias ruminales totales + bacteria ruminal acetogénica.

IBRT+BRA, tomando al IBRT como testigo la población microbiana de bacterias celulolíticas en el rumen, es congruente con los resultados de Martínez *et al.* (2010) cuando evaluaron una dieta relación f:c de 70:30 como sustrato y en la cual observaron concentraciones de bacterias celulolíticas *in vivo* en *in vitro* (5.15 x 10⁶ y 2.35 x 10⁶ mL⁻¹ respectivamente).

La concentración de bacterias formatotróficas (BF) fue similar ($p > 0.05$; Cuadro 5.5) entre tratamientos. Mohammed *et al.* (2004) reportaron una concentración de bacterias acetogénicas inferior (2.51 x 10² mL⁻¹) en relación con bacterias metanogénicas (3.981 x 10⁸ mL⁻¹), sulfato-reductoras (3.98 x 10⁶ mL⁻¹) y celulolíticas (1.995 x 10⁷ mL⁻¹) en fluido ruminal de novillos alimentados con un dieta relación f:c de 60:40.

5.5.4. Producción *in vitro* de gas total, CO₂ y CH₄

El Cuadro 5.6 muestra los efectos estadísticos principales de tratamientos y del tiempo de incubación. La producción total de gas (GT) fue mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento BRA (Figura 5.2); sin embargo, el porcentaje de CH₄ del gas total fue menor ($p < 0.05$) respecto al resto de los tratamientos. El efecto de la bacteria acetogénica en cocultivo con bacterias ruminales (IBRT+BRA) en la producción de gas total fue significativo en comparación con el IBRT (76.60 vs 115.73 mL), desde un punto de vista

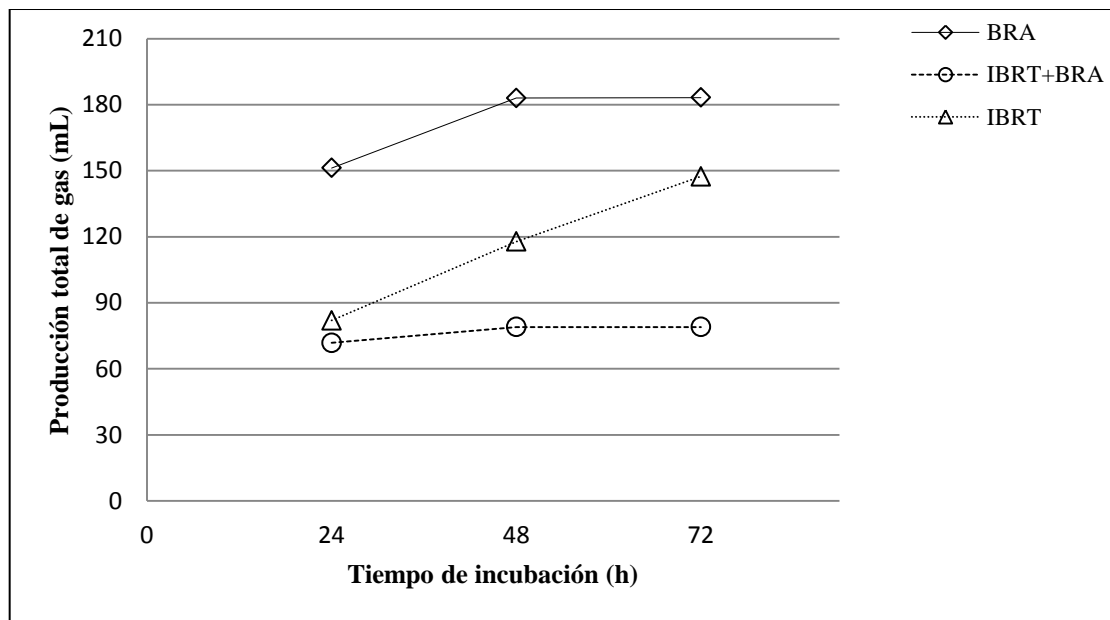


Figura 5.2. Producción total de gas *in vitro* (mL) a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1×10^8 de la BRA mL^{-1}).

productivo para el rumiante, la interacción de la BRA con la microbiota ruminal es favorable. La mayor producción de GT se registró a las 24 h y no hubo diferencias ($p > 0.05$) a las 48 y 72 horas de incubación. El porcentaje de CO₂ del gas total (PCO₂GT) fue mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento BRA y no mostró diferencias ($p > 0.05$) entre los

tratamientos IBRT+BRA e IBRT, lo que indica que la BRA no produce metano. En la Figura 5.3 se observa que la mayor producción del PCO₂GT fue a las 24 h y la menor producción se registró a 72 h.

El porcentaje de CH₄ con respecto al gas total (PCH₄GT) fue menor ($p < 0.05$; Cuadro 5.6) en el tratamiento BRA, no se encontró efecto significativo del cultivo puro de la bacteria acetogénica en el tratamiento IBRT+BRA en comparación con el tratamiento IBRT, sobre la producción de metano. Algunos autores (Giraldo *et al.*, 2007) han observado en experimentos *in vitro* con dietas altas en forraje (60 %), que el gas

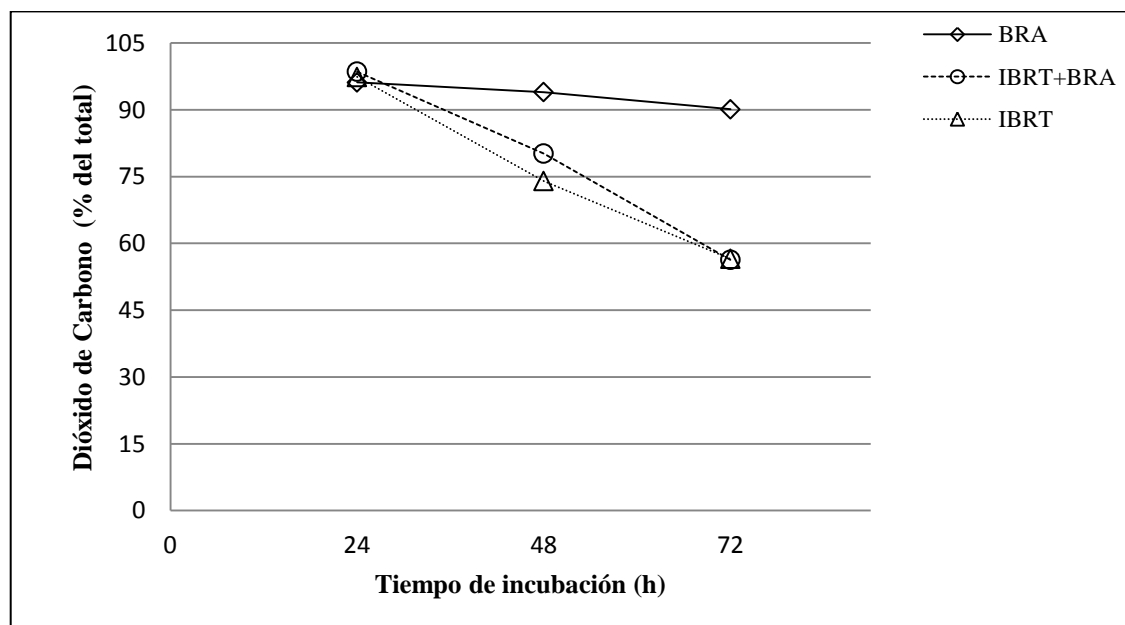


Figura 5.3. Porcentaje de CO₂ con respecto al gas total a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1×10^8 de BRA mL⁻¹).

producido durante 24 h aumenta significativamente con la concentración de bacterias celulolíticas, lo que pudo haber ocurrido en el tratamiento IBRT, debido a que la

concentración de BC ($1.8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) y la producción metano (17.38 %) fueron directamente proporcionales.

El PCH_4GT fue mayor ($p < 0.05$; Cuadro 5.6) a las 72 h de incubación, la Figura 5.4 muestra un aumento de metano constante a través del tiempo en los tratamientos IBRT+BRA y IBRT, Hernández (2010) reportó en pruebas de biogás utilizando fluido ruminal como sustrato, que la mayor producción de CH_4 se produce a las 72 h incubación.

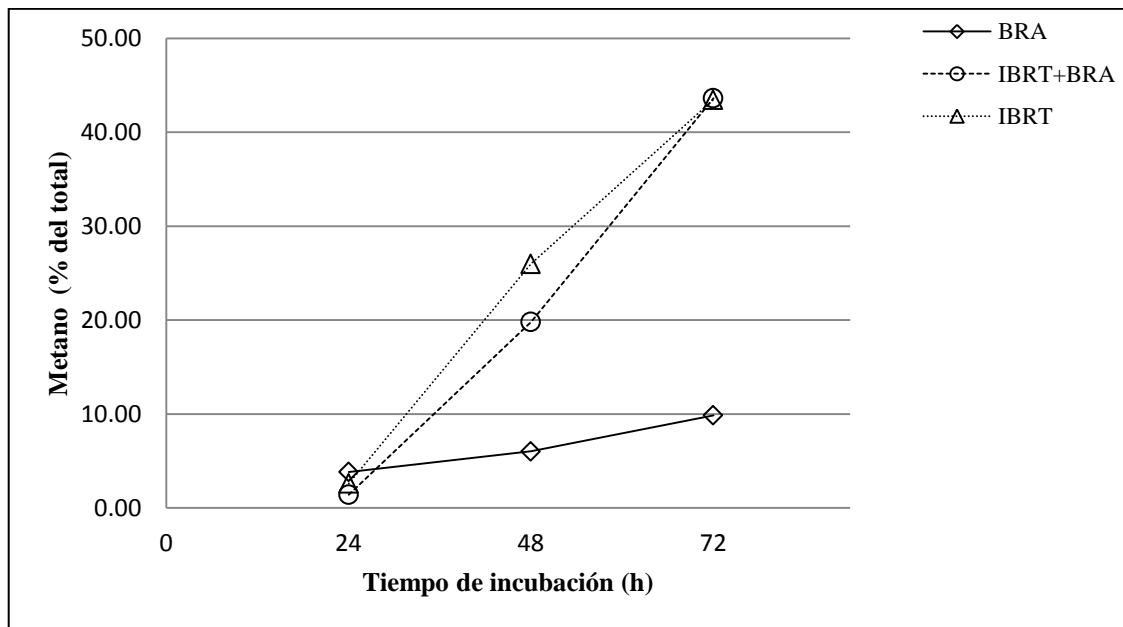


Figura 5.4. Porcentaje de CH_4 con respecto al gas total a 72 h de incubación (alta concentración de inóculo 1×10^8 de la BRA mL^{-1}).

Los sistemas de cultivo cerrado de crecimiento exponencial microbiano se caracteriza por: a) un nutriente esencial del medio se agota, b) se acumulan en el medio

Cuadro 5.6. Producción *in vitro* de gas total, porcentajes de CO₂ y CH₄ (alta concentración de inóculo 1 x 10⁸ bacterias ruminales acetogénicas mL⁻¹).

Variable	Tratamiento			EEM	Tiempo (h) ³			EEM	Significancia		
	BRA	IBRT+ BRA	IBRT		24	48	72		TRA ¹	TIE ²	Interacción
Biogás total (mL)	172.42 ^a	76.60 ^b	115.73 ^b	13.78	101.67 ^a	126.60 ^b	136.53 ^b	8.45	0.001	0.001	0.001
CO ₂ ,%	93.42 ^a	82.52 ^b	82.62 ^b	1.03	97.38 ^a	87.85 ^b	72.88 ^c	1.23	0.001	0.001	0.001
CH ₄ ,%	6.58 ^a	17.48 ^b	17.38 ^b	1.03	2.62 ^a	12.15 ^b	27.12 ^c	1.23	0.001	0.001	0.001

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma hilera difieren estadísticamente ($p < 0.05$) ¹ Tratamiento, ² Tiempo.

³ Efectos principales del tiempo. IBRT = inóculo de bacterias ruminales totales; BRA = inóculo de la bacteria ruminal acetogénica; IBRT+BRA = inóculo de bacterias ruminales totales + bacteria ruminal acetogénica.

algunos productos de desecho, hasta niveles inhibitorios, c) la actividad y crecimiento disminuye (Madigan *et al.*, 2009). Sin embargo, en este estudio se determinó que la actividad de bacterias metanogénicas es mayor a las 72 h de incubación, esto se pudo deber a una acumulación en el medio de cultivo de hidrógeno y CO₂ requerido para su actividad (Figura 5.4).

5.5. Identificación molecular de la bacteria ruminal acetogénica

El ADN ribosomal de la sub unidad 16S (ADNr 16S) es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, se han usado ampliamente para el análisis evolutivo basado en secuencias porque se trata de una molécula muy antigua, presente en todo tipo de bacterias, su estructura y función han permanecido constante, están lo suficientemente conservadas, el tamaño relativamente largo 1,500 pares de bases (bp) de los ribosomas ADNr 16S minimiza fluctuaciones estadísticas (Rodicio y Mendoza, 2004; Madigan *et al.*, 2009).

Como resultado de la amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr, se obtuvieron fragmentos de 1,358 bp y 1,347 bp. Las secuencias obtenida se compararon con secuencias depositadas en el GenBank; la bacteria ruminal aislada se identificó como *Clostridium paraputrificum*. En otros estudios se determinó que esta bacteria es degradadora de quitina (Cobos y Yokoyama, 1995; Evvyernie *et al.*, 2001) y se ha aislado en diferentes ambientes anaerobios. Henderson *et al.* (2010), amplificaron los genes de la enzima (firmiltetrahidrofolato sintetasa) de las bacterias acetogénicas; *Acetobacterium woodii* DSM 1030, *Acetitomaculum ruminis* DSM 5522, *Clostridium magnum* DSM 2767 y *Clostridium* sp CA6. Sin embargo, *Clostridium* sp CA6 no

produjo acetato de H₂ y CO₂ como el resto, por lo que utilizaron glucosa como sustrato. Lo que indica que el género *Clostridium* cuenta con la enzima clave (firmiltetrahidrofolato sintetasa) de la ruta Wood-Ljungdahl que utilizan los acetógenos para producir acetato.

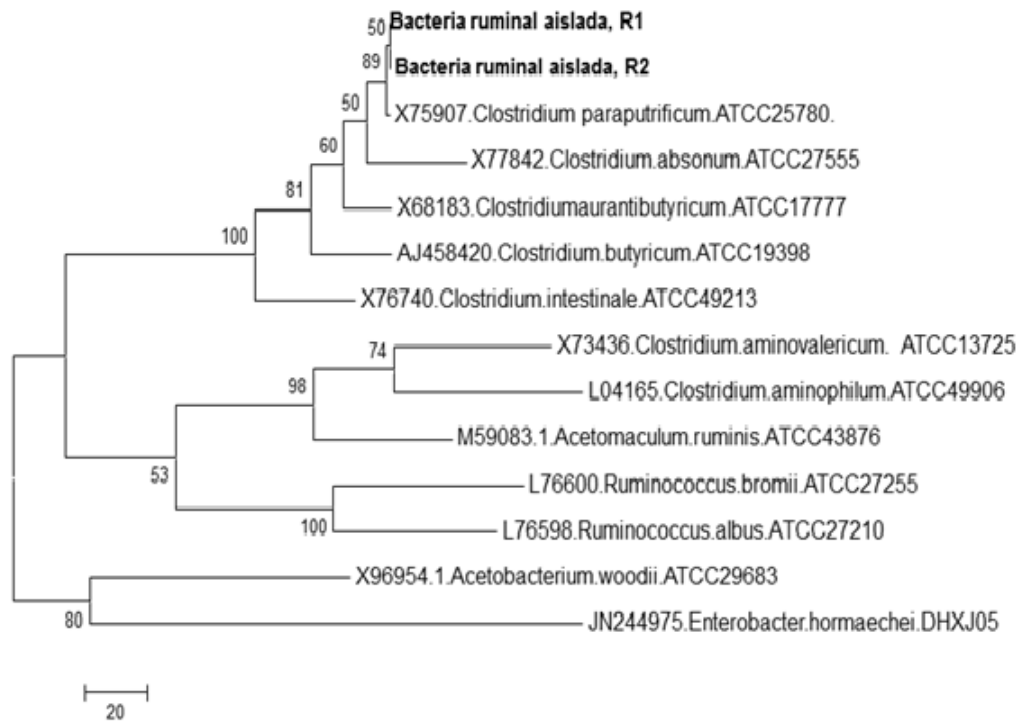


Figura 5.5. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia.

5.6. Conclusiones

La bacteria ruminal acetogénica aislada resultó un coco Gram+, la secuenciación del gen ADNr 16S permitió identificar a la bacteria aislada como *Clostridium paraputrificum*.

El perfil de AGV de la BRA en cultivo axénico indica que su fermentación es acético: butírica y en cocultivo con bacterias ruminales (IBRT+BRA) tiene una fermentación de tipo acético: propiónico.

El inóculo de la BRA disminuye la producción total de gas en cocultivo con bacterias ruminales (IBRT+BRA) comparado con el tratamiento IBRT. La BRA produjo una cantidad menor de metano, sin embargo, no hubo diferencias en la proporción de CH₄ del gas total entre los tratamientos IBRT+BRA e IBRT.

La DIVMS no fue afectada por el inóculo de la BRA en cocultivo con bacterias ruminales en relación a un inóculo de bacterias ruminales totales. Respecto a la digestibilidad de la BRA en cultivo axénico se observó menor capacidad en comparación con los tratamientos IBRT+BRA e IBRT.

No hubo diferencias en la concentración de bacterias totales, celulolíticas y formatotróficas entre los tratamientos BRA vs IBRT+BRA, las concentraciones microbianas más altas se observaron en el tratamiento IBRT.

VI. EFECTO DE UNA BACTERIA RUMINAL ACETOGÉNICA A BAJA CONCENTRACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO*

6.1. Introducción

El cambio climático supone un incremento de la temperatura media y está asociado con un aumento de la frecuencia de fenómenos climáticos extremos. Entre los principales gases de efecto invernadero (GEI) que guardan relación con este proceso destacan el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄), el óxido nitroso (N₂O) y los clorofluorocarbonos (FAO, 2006).

La ecología microbiana del rumen es sumamente compleja y la capacidad de este sistema para convertir eficientemente los carbohidratos complejos en azúcares fermentables se debe en parte a la eliminación efectiva de hidrógeno a través de la reducción de CO₂ a metano por metanogénos (McAllistery y Newbold, 2008). Numerosos factores ligados a la especie animal y a su alimentación, modifican las emisiones de metano en rumiantes. Investigaciones recientes muestran que dietas altas en concentrado (almidón y grasa), disminuyen la producción de CH₄ (De Blass *et al.*, 2008); no obstante, esta práctica limitaría el uso de alimentos con alto contenido de fibra y aumentaría el costo alimenticio de producción de las explotaciones pecuarias.

El uso de bacterias acetogénicas tiene un enfoque potencial como alternativa para reducir las emisiones de CH₄ en rumiantes; sin embargo, los resultados aún son insatisfactorios, no concluyentes, debido a que no han sido confirmados *in vivo*, esta opción debe ser cuidadosamente evaluada en términos de rendimiento del ganado (Martin *et al.*, 2008). Por tal motivo, la concentración de inóculo de la bacteria ruminal

acetogénica debe quedar evaluada antes de experimentar con animales ya que permitiría estimar con mayor certeza la cantidad de liofilizado necesario para futuras investigaciones. Recientemente Cobos *et al.* (2011) demostraron el efecto del tiempo de rehidratación sobre la viabilidad bacteriana liofilizada, también otros factores como el medio de liofilización y el tiempo de almacenado han sido estudiados (Borrego *et al.*, 2001), pero no existe información que permita comparar los resultados entre diferentes concentraciones bacterianas de un mismo inóculo, en las variables de interés para el investigador.

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar la actividad *in vitro* de una bacteria ruminal acetogénica a una concentración de 10^6 bacterias mL^{-1} , en la producción de CH_4 .

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Producción *in vitro* de CH₄, CO₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica

6.2.2. Dieta experimental

Se balanceó una dieta integral para ovinos en crecimiento con una relación forraje: concentrado de 50:50 (Cuadro 5.2) según los requerimientos nutricionales del NRC (1985). Los ingredientes fueron molidos hasta un tamaño de partícula ≤ 2.0 mm.

6.2.3. Montaje del sistema de producción de gas *in vitro*

Para elaborar los digestores se usaron 15 viales serológicos de 100 mL, a cada uno se le adicionaron 2 g de una dieta para ovinos (Cuadro 5.2), más 43 mL del medio de cultivo para bacterias ruminales totales, sin glucosa, celobiosa y almidón (Cuadro 5.3) bajo flujo de CO₂. Los viales fueron sellados con tapones de plástico y casquillos de aluminio. Se esterilizaron a 125 °C y 15 psi, durante 15 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 6 h y se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

La trampa de solución salina se preparó con 400 g de NaCl en 1 L de agua destilada, el pH se ajustó a 2 y se agregó 5 mL de indicador anaranjado de metilo al 20 %. Se depositó en viales serológicos de 100 mL sin dejar espacio de cabeza y fueron sellados con tapones de hule y casquillos de aluminio.

6.2.4. Rehidratación del inóculo liofilizado de la bacteria ruminal acetogénica (BRA) e inoculación del sistema de producción de gas *in vitro*

Se rehidrató 1 g de la BRA en 100 mL de medio selectivo (Cuadro 5.1) bajo flujo de CO₂, en una campana de flujo laminar vertical y se dejó incubar a 39 °C por 24 h, posteriormente se determinó la concentración bacteriana con un microscopio Carl Zeiss a una magnificación de 100x y una cámara Petroff-Hausser.

Para preparar el inóculo de bacterias ruminales totales (IBRT) se utilizó fluido ruminal de una vaca Holstein (450 kg de peso vivo) fistulada en el rumen, alimentada con ensilado de maíz forrajero, concentrado y pastoreo en una pradera de alfalfa, el fluido ruminal se filtró con manta "velo de novia" y fue centrifugado a 3000 rpm (4240 Xg) por 3 min, la concentración del IBRT fue aproximadamente de 8.45×10^{10} bacterias mL⁻¹ por lo que se diluyeron 10 mL del IBRT en 90 mL del medio para BRT (Cuadro 5.3) sin nutrientes energéticos, hasta tener una concentración de 10^8 células mL⁻¹. La concentración de la BRA fue de 7.6×10^6 bacterias mL⁻¹.

La inoculación se realizó por quintuplicado con jeringas estériles desechables de 10 mL en los digestores antes descritos; 5 mL del inóculo de la BRA, 5 mL del inóculo de bacterias ruminales totales IBRT y una mezcla de 2.5 mL de IBRT más 2.5 mL de BRA, IBRT+BRA. Cada digestor se conectó a una trampa de solución salina con mangueras de tygon de 40 cm de largo y 5 mm de diámetro, a una trampa de solución salina. Las trampas contaron con una válvula de alivio para igualar la presión atmosférica y se colocaron invertidas sobre probetas de 50 mL. Sólo los digestores se colocaron en un baño María a 39 °C. El registro de solución salina desplazada se midió

en las probetas a las 24, 48 y 72 h. Por lo que en cada tiempo de incubación se cambiaron todas las trampas de solución salina.

6.2.5. Medición de CH₄ y CO₂ por cromatografía de gases

El gas total se registró con el desplazamiento de las trampas de solución salina y fue medido en probetas de 50 mL, el gas capturado en las trampas de solución salina fue sometido a conductividad térmica (TCD) por cromatografía de gases para determinar el porcentaje de CH₄ y CO₂. Se utilizó un cromatógrafo de gases Claurus 500, Perkin Elmer y una columna PE 6'x1/8 ODSS: Porapak 080/100. Se inyectó 0.1 mL de muestra, de forma manual. Las características y condiciones del método fueron: a) temperatura de la rampa en el horno de inicio 28°C 1 min.⁻¹, rampa 2.5°C min.⁻¹, final 35°C 0.5 min.⁻¹; b) temperatura del inyector TCD 130°C; c) volumen de inyección 0.1 mL., d) flujo del gas acarreador (helio) 23.5 mL⁻¹min, y e) tiempo de detección de CH₄ 1 min ± 0.05 y de CO₂ 2 min ± 0.05.

6.2.6. pH del medio de cultivo a 72 h de incubación

El pH se determinó después de 72 h de incubación en cada digester con un potenciómetro marca Orion modelo 240A calibrado a dos puntos (4.0 y 7.0).

6.2.7. Concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV se determinó después de 72 h de incubación. De cada digester se transfirió 1.5 mL del medio de cultivo a un vial de 2 mL que contenía 0.375 mL de ácido metafosfórico al 25 %. En una centrifuga Eppendorf 5810R, se centrifugaron a 14,000 rpm (20,000 Xg) por 15 min a 4 °C. El sobrenadante recuperado

fue usado para determinar AGV en un cromatógrafo de gases Claurus 500, Perkin Elmer con auto muestreador y columna capilar Elite FFAP. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador. La calibración del estándar se realizó por triplicado. Las características y condiciones fueron: a) temperatura de horno: inicio 95° C 0.5 min.⁻¹, rampa 15°C min⁻¹, final 160° 1.5 min⁻¹; b) temperatura FID 250° C; c) temperatura del inyector 196° C; d) volumen de inyección 1.0 µL; e) flujo de inyección 15 µL/min; f) tiempo de retención del acetato 3.244 min, propionato 3.869 min, y butirato 4.549 min g) tiempo de la corrida total 4.80 min por muestra.

6.2.8. Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales se determinó a las 72 h de incubación en los digestores, usando una cámara para Petroff-Hausser y un microscopio de contraste de fases marca Carl Zeiss a una magnificación de 100x. Las bacterias se fijaron en una solución de formaldehído al 18.5 % (3 mL en 1 mL de la solución de fijadora). Debido a la alta concentración bacteriana en los tratamientos, se diluyó 0.5 mL de la muestra fijada en 4.5 mL de H₂O destilada. La concentración de bacterias por mililitro se determinó como el promedio de bacterias observado en cada cuadrícula, multiplicado por el factor de dilución y el factor de la cámara (2 x 10⁷), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias mL}^{-1} = \bar{X} \times \text{FD1} \times \text{FD2} \times 2 \times 10^7$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de bacterias en cada cuadrícula.

FD1= Primer factor de dilución (3).

FD2= Segundo factor de dilución (9)

6.2.9. Concentración de bacterias celulolíticas

La concentración de bacterias celulolíticas se estimó por método del número más probable NMP (Harrigan y McCance, 1979) después de 72 h de incubación en los digestores. La prueba se realizó por triplicado con diluciones de 0.5 mL en tubos de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo para BRT (Cuadro 5.3) más una tira de papel Whatman 541. Las diluciones fueron de 10^{-1} a 10^{-12} . Se consideró como crecimiento positivo de bacterias celulolíticas a aquellos tubos de cultivo que presentaron degradación de la tira de papel después de 7 días de incubación a 39°C.

6.2.10. Concentración de bacterias utilizadoras de formato

La concentración de bacterias formatotróficas se estimó por método del NMP (Harrigan y McCance, 1979) después de 72 h de incubación en los digestores. La prueba se realizó por triplicado con diluciones de 0.5 mL en tubos de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL del medio de aislamiento a base de formato (Cuadro 5.1). Las diluciones fueron de 10^{-1} a 10^{-12} . Se consideró como crecimiento positivo a todos los tubos de cultivo que desarrollaron turbidez después de 72 h de incubación.

6.2.11. Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Después de las 72 h de incubación, se filtró la materia seca (MS) no degradada en papel Whatman 514 de 12 cm de diámetro; en un equipo de filtración con bomba de

vacío, el residuo se secó a 70°C durante 24 h, para obtener el peso constante y se pesó en una balanza analítica.

Se determinó la degradación de la MS por la diferencia entre el peso de la MS inicial y final, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{DIVMS} = \frac{(\text{Peso del papel} + \text{muestra}) - \text{Peso del papel}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

6.3. Diseño experimental

La producción total de gas y el porcentaje de CH₄ y de CO₂ del gas acumulado se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo, con el procedimiento PROC MIXED (SAS, 1998). Los tratamientos evaluados fueron: a) inóculo de bacteria ruminal acetogénica (BRA), b) bacteria ruminal acetogénica + inóculo de bacterias ruminales totales (BRA+IBRT) y c) inóculo de bacterias ruminales totales (IBRT), con cinco repeticiones por tratamiento. La estructura de covarianza se determinó individualmente a cada variable: gas total = covarianza no estructurada (UN); porcentaje de CH₄ = simetría compuesta (CS); porcentaje de CO₂ = simetría compuesta (CS). Para las variables expresadas en porcentaje (Y_i) primero se efectuó una transformación angular [$\arccos(Y_i)^{1/2}$]. La comparación de medias se efectuó con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$). Finalmente los resultados se presentan en unidades originales.

Las variables AGV (acetato, propionato y butirato), pH, degradación *in vitro* de materia seca, concentración de bacterias totales, celulolíticas y formatotróficas, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones. La comparación de medias se realizó con la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) con el procedimiento PROC GLM (SAS, 1998). Para las variables concentración de bacterias totales, celulolíticas y formatotróficas, se realizaron repeticiones por triplicado y se realizó una transformación logarítmica, con la función $\log(1)$ de (SAS, 1998), presentándose los datos en unidades originales.

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. pH y concentración de AGV

El pH de los medios inoculados con la bacteria ruminal acetogénica (BRA) y en cultivo con bacterias ruminales (BRA+IBRT) disminuyó ($p < 0.05$; Cuadro 6.1) respecto al IBRT. La técnica de producción de gas *in vitro* es un sistema cerrado, no permite simular la absorción a través de las paredes del rumen y la eliminación selectiva de los productos de fermentación (Martínez, 2009), lo que podría explicar los valores ácidos del pH principalmente en los tratamientos (BRA e IBRT+BRA).

El total de los AGV fue mayor ($p < 0.05$; Cuadro 6.1) en el tratamiento IBRT+BRA y no hubo diferencias significativas entre el cultivo de la BRA y el IBRT. Calsamiglia *et al.* (2008) mediante modelos mixtos de regresión lineal, encontraron que el efecto del pH y el tipo de dieta, explica 81 % de la variación observada en la concentración total de AGV. Sin embargo, el efecto del inoculo BRA sobre el IBRT

(tratamiento IBRT+BRA) fue significativo en la producción total de AGV, esta interacción incrementó 34 % el total de AGV comparado con el IBRT.

Cuadro 6.1. pH y concentración de AGV producidos por la fermentación *in vitro* de una dieta para ovinos a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 de BRA mL^{-1}).

Variable	Tratamiento			EEM
	BRA	IBRT + BRA	IBRT	
pH ¹	5.67 ^b	5.66 ^b	6.41 ^a	0.16
Total AGV mol L ⁻¹	94.40 ^b	129.73 ^a	83.73 ^b	18.44
Acetato, %	61.00 ^a	43.12 ^b	63.52 ^a	6.09
Propionato, %	7.16 ^b	41.72 ^a	27.77 ^a	5.47
Butirato, %	31.83 ^a	15.13 ^b	8.69 ^c	0.78
Acetato: Propionato	8.51 ^a	1.03 ^b	2.37 ^c	0.71

^{a, b, c} Medias con literales diferentes en la misma hilera difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).

¹pH inicial del medio de cultivo = 6.91.

IBRT = inóculo de bacterias ruminales totales; BRA = inóculo de la bacteria ruminal acetogénica; IBRT+BRA = inóculo de bacterias ruminales totales+ bacteria ruminal acetogénica

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de acetato entre el tratamiento BRA e IBRT, pero disminuyó ($p < 0.05$; Cuadro 6.1) en el tratamiento IBRT+BRA. Respecto al porcentaje de propionato hubo una disminución ($p < 0.05$) en el tratamiento BRA y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos IBRT+BRA e IBRT. El porcentaje de butirato fue mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento BRA con respecto a los tratamientos IBRT+BRA e IBRT. La relación de los porcentajes de AGV en el tratamiento IBRT, fue congruente de acuerdo al tipo de dieta

experimental, investigaciones *in vitro* (Martínez *et al.*, 2010) con dietas altas en forraje (70 %), muestran un porcentaje relativo de AGV (acetato 66 %, propionato 19.9%, butirato 11.11%).

La relación acético:propiónico (a:p) fue diferente ($p<0.05$) entre los tres tratamientos, la proporción a:p del IBRT 2.37, resultó similar a los reportes de Doreau *et al.* (2011) quienes en experimentos con ganado bovino con una dieta relación f:c de 49:51, obtuvieron una proporción a:p de 3.4. La relación a:p del tratamiento IBRT+BRA fue de 1, lo que evidencia que la BRA en cocultivo con bacterias ruminales aumentó la concentración de propionato, otro factor que pudo influir en este resultado fue el pH del medio de cultivo, algunas investigaciones (Engelking, 2002; Calsamiglia *et al.*, 2008) observaron que cuando decrece el pH ruminal, altera la relación acetato, propionato, butirato, y aumenta la proporción de propionato: butirato, pero también puede provocar trastornos metabólicos como acidosis ruminal, generalmente ocasionado con dietas altas en granos.

La composición de AGV es un parámetro que ha sido sugerido para estimar la producción de gas en ambientes anóxicos, existe una relación directa entre la producción de ácido acético y de metano; cuando la cantidad de piruvato que se incorpora a la ruta del ácido acético va en aumento, debe haber un incremento simultaneo en la producción de metano. Asimismo, existe una relación recíproca entre la producción de metano y la de ácido propiónico; cuando el piruvato se desvía hacia la producción el ácido propiónico, hay menor síntesis de metano (Cunningham y Bradley, 2009). Este factor

quizá pueda explicar el efecto de la bacteria aislada en cocultivo con bacterias ruminales (tratamiento IBRT+BRA) sobre la disminución de metano (Cuadro 6.3).

6.4.2. Degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS) y concentración bacteriana

La DIVMS de la BRA fue menor ($p < 0.05$; Cuadro 6.2) en contraste con los tratamientos IBRT+BRA e IBRT; mientras que la digestibilidad en cocultivo (IBRT+BRA) fue similar ($p > 0.05$) al tratamiento IBRT. El contenido de forraje en la dieta experimental y la disminución del pH a las 72 h de incubación, podría asociarse con baja digestibilidad, según Russell *et al.* (2009) el efecto del pH sobre la digestión ruminal de la fibra, se explica porque ninguna de las bacterias celulolíticas del rumen han evolucionado para crecer a valores de $\text{pH} < 6$.

Cuadro 6.2. Degradación *in vitro* de materia seca (%) y concentración bacteriana (bacterias mL^{-1}) en los medios de cultivo a las 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 de BRA mL^{-1}).

Variable	Tratamiento			EEM
	BRA ²	IBRT ¹ + BRA	IBRT	
Bacterias totales	2.7×10^5 ^b	1.7×10^6 ^b	2.01×10^9 ^a	1.04
Bacterias celulolíticas	3.5×10^4 ^b	3.03×10^5 ^b	1.1×10^7 ^a	1.46
Bacterias formatotróficas	8.6×10^4 ^a	4.3×10^5 ^a	3.4×10^6 ^a	2.21
DIVMS	56.58 ^b	68.60 ^a	69.40 ^a	1.44

^{a, b}, Medias con literales diferentes en la misma hilera difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$).
¹Concentración inicial de Bacterias Ruminales Totales, 1×10^8 mL^{-1} .
² Concentración inicial de Bacterias Acetogénicas, 1×10^6 mL^{-1} . IBRT = inóculo de bacterias ruminales totales; BRA = inóculo de la bacteria ruminal acetogénica; IBRT+BRA = inóculo de bacterias ruminales totales + bacteria ruminal acetogénica.

No se encontraron diferencias significativas (Cuadro 6.2) en la concentración de bacterias totales (BT) en los tratamientos BRA e IBRT+BRA, mientras que el inóculo IBRT tuvo la mayor concentración ($p<0.05$) debido probablemente a la diversidad de especies microbianas del rumen y que en este tratamiento no se inoculó la BRA.

La concentración de bacterias celulolíticas (BC) disminuyó ($p<0.05$) en los tratamientos BRA e IBRT+BRA respecto al IBRT. Las condiciones de pH neutras del rumen permiten que muchos tipos de microorganismos puedan crecer y algunas especies se desarrollen complementariamente en sintrofismo (Van Soest, 1994). El pH es quizá el parámetro ambiental más importante que afecta la degradación de celulosa por microorganismos, a valores de pH 5.3 o inferiores cesa completamente la digestión ruminal de celulosa (Russell *et al.*, 2009), lo que puede explicar la disminución ($p<0.05$) en la concentración de bacterias totales y celulolíticas, de los tratamientos que involucraron la bacteria acetogénica (BRA e IBRT+BRA), ambos tuvieron un pH ácido a las 72 de incubación.

Morvan *et al.* (1996) evaluaron muestras de fluido ruminal fresco y encontraron concentraciones similares de bacterias acetogénicas en fluido ruminal de ovinos de $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ y bovinos $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, alimentados con una dieta homogénea para ambas especies con una relación f:c de 70:30. La variedad de sustratos que pueden usar las bacterias acetogénicas, además de H_2/CO_2 incluye productos de la degradación de polímeros naturales (Ragsdale, 2008), esto podría explicar que la concentración de bacterias formatotróficas en los tratamientos IBRT+BRA e IBRT sea similar ($p>0.05$) al de BRA al término de las 72 h de incubación. Sin embargo, quizá la concentración de la

bacteria ruminal acetogénica con la que se realizó la prueba, haya sido insuficiente, ya que la evaluación de la BRA (10^8 bacterias mL^{-1}) no mostró diferencias en la concentración de bacterias formatotróficas ($p>0.05$) entre los tratamientos evaluados.

6.4.3. Producción de *in vitro* de gas total, CO_2 y CH_4

El Cuadro 6.3 muestra los efectos principales de tratamiento y del tiempo de incubación. La producción total de gas (GT) fue menor ($p<0.05$; Figura 6.1) en el tratamiento IBRT+BRA que en IBRT (91.86 y 231.60 mL, respectivamente), lo que implica una reducción del 60 %, resultado que puede corroborarse observando la mayor producción ($p<0.05$) de AGV del tratamiento IBRT+BRA respecto del resto de los tratamientos (Cuadro 6.1). En el rumen la mayoría del metano se sintetiza a partir de H y CO_2 , la tasa de absorción de AGV permite que sean metabolizados por el rumiante y no por las bacterias metanogénicas (Morgavi *et al.*, 2010), por lo que existe una relación inversa entre la producción de AGV y metano. Báez (2010) evaluó la fermentación *in vitro* de alfalfa, utilizando un medio anaerobio y la producción total de gas (153 mL) a las 72 h de incubación tuvo una concentración de CO_2 y CH_4 de 78.2 y 21.8 %, respectivamente. Sin embargo, las estimaciones de los gases no solo corresponde a la fermentación de la alfalfa, ya que el medio contenía (0.06 g de glucosa, 0.06 g de celobiosa y 0.06 g de almidón por cada 100 mL de medio). Por tanto, los resultados obtenidos son más exactos, ya que la producción de CO_2 y CH_4 dependió exclusivamente del sustrato presente en el medio de cultivo.

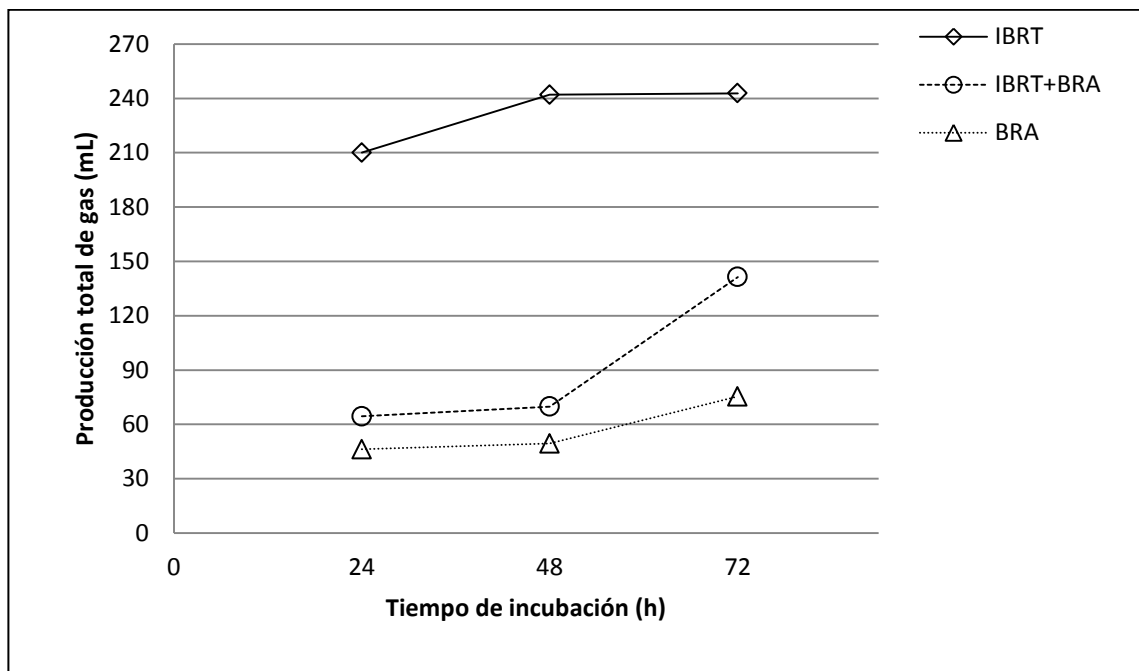


Figura 6.1. Producción total de gas *in vitro* (mL) a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 de BRA mL⁻¹).

El porcentaje de CH₄ del gas total (PCH₄GT) fue similar entre los tratamientos ($p < 0.05$; Figura 6.2). Al respecto López *et al.*, (1999) en dietas con relación f:c de 50:50, evaluaron la bacteria acetogénica *Eubacterium limosum* ATCC 8486 y solo encontraron una disminución de 3.7 % en la producción de metano a 24 h de incubación. Mientras que Báez (2010) con la adición de fumarato de sodio a las 72 h de incubación redujo 85.4 % la producción de metano en la fermentación *in vitro* de alfalfa. El porcentaje de CO₂ del gas total (PCO₂GT) se mantuvo sin cambios ($p > 0.05$; Figura 6.3) entre los tratamientos.

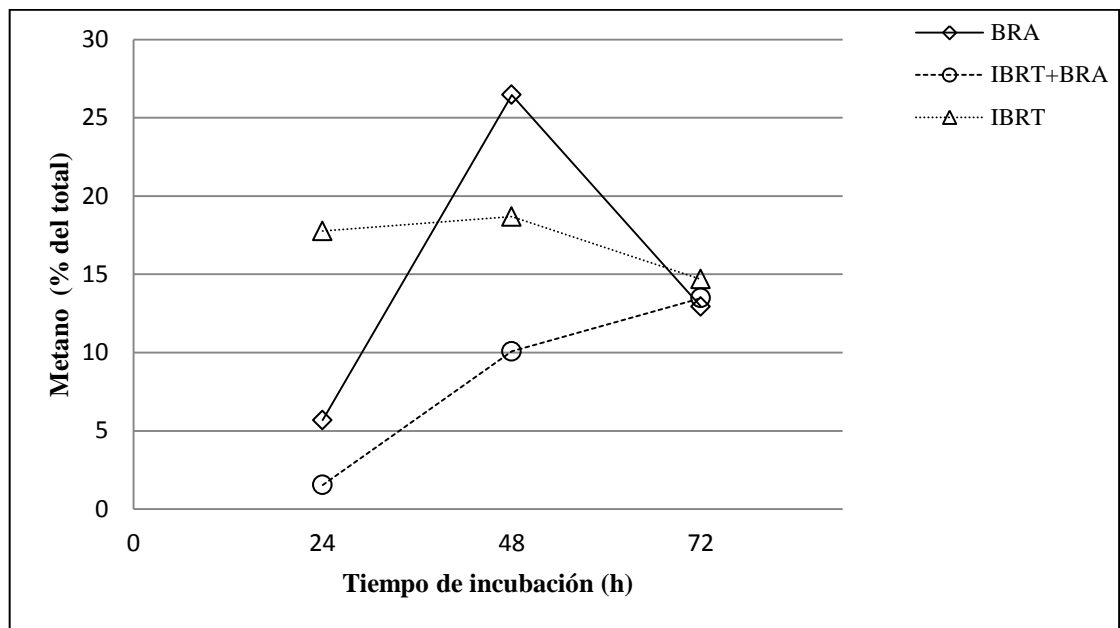


Figura 6.2. Porcentaje de CH₄ con respecto al gas total a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 de BRA mL⁻¹).

Nollet *et al.* (1997) utilizaron ácido 2-bromoetanolsulfónico para inhibir metanogénesis y evaluar el efecto de *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244, solo o en presencia del inhibidor de CH₄ en la producción de acetato. No encontraron efectos de la bacteria *P. productus* sola o en cocultivo con muestras de fluido ruminal a las 24 h de incubación, pero la adición de ácido 2-bromoetanolsulfónico (0.03 mM) + *P. productus* disminuyó la producción de CH₄, sin afectar la producción de AGV.

La producción de GT fue diferente entre los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 h), la mayor acumulación ($p < 0.05$) se presentó a las 72 h de incubación. La colonización de bacterias fibrolíticas y su degradación están asociadas a un incremento en la producción de gas. Observaciones con microscopio electrónico de barrido de electrones permitieron observar adhesión de microorganismos ruminales a las paredes

lignificadas del tejido foliar *Lolium-Festuca*, a 48 h de fermentación *in vitro*. Las paredes celulares no lignificadas fueron rápidamente degradadas por consorcios de microorganismos ruminales (Alamaraz, 2011). Valenciaga *et al.* (2006) demostraron que la producción de gas total aumenta a medida que transcurre el tiempo de incubación del forraje (*Pennisetum purpureum*). En los rumiantes el hidrógeno producido por microorganismos hidrolíticos y fermentadores es utilizado principalmente por bacterias metanogénicas para reducir el CO₂ a metano, en general las poblaciones celulolíticas, los hongos anaerobios y bacterias ruminales del género *Ruminococcus* son los principales productores de hidrógeno como parte de su metabolismo energético (Chaucheyras *et al.*, 2010).

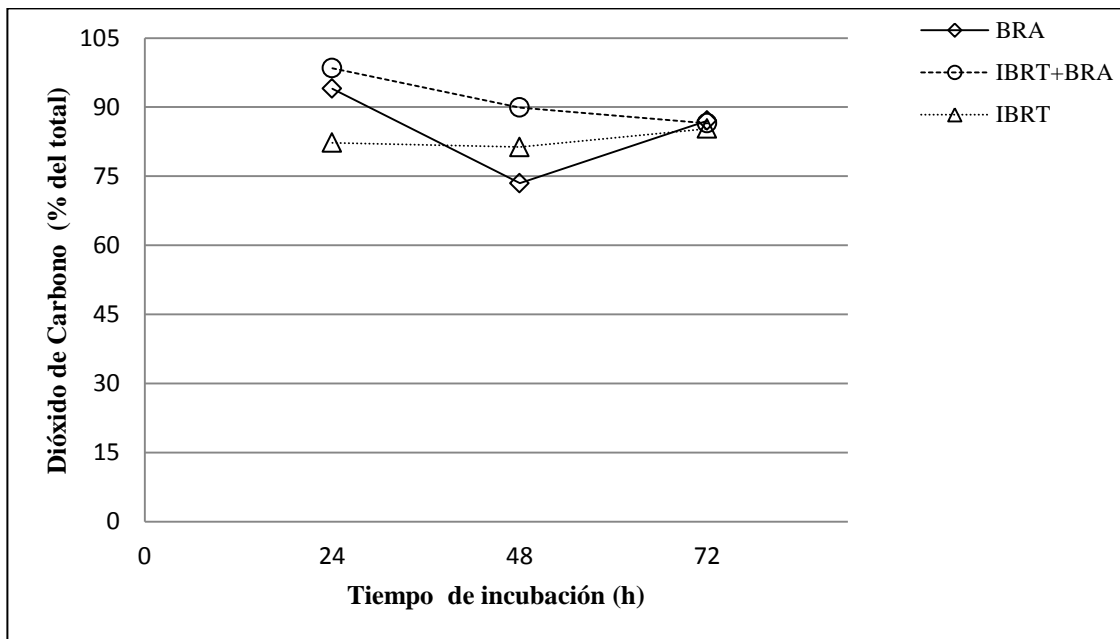


Figura 6.3. Porcentaje de CO₂ con respecto al gas total a 72 h de incubación (baja concentración de inóculo 1×10^6 de BRA mL⁻¹).

Cuadro 6.3. Producción total de gas *in vitro*, porcentajes de CO₂ y CH₄ (baja concentración de inóculo 1 x 10⁶ bacterias ruminales acetogénicas mL⁻¹)

Variable	Tratamiento			EEM	Tiempo (h) ³			EEM	Significancia		
	BRA	IBRT+BRA	IBRT		24	48	72		TRA ¹	TIE ²	Interacción
Biogás total (mL)	57.00 ^a	91.86 ^b	231.60 ^c	8.367	106.87 ^a	120.40 ^b	153.20 ^c	3.72	0.001	0.001	0.001
CO ₂ , %	84.97 ^a	91.63 ^a	82.96 ^a	3.06	91.66 ^a	81.60 ^a	86.30 ^b	2.96	0.110	0.014	0.156
CH ₄ , %	15.03 ^a	8.37 ^a	17.04 ^a	3.06	9.33 ^a	18.40 ^a	13.70 ^b	2.96	0.110	0.014	0.156

^{a,b,c} Muestran diferencias estadísticas significativas entre hileras ($p \geq 0.05$). ¹ Tratamiento, ² Tiempo, ³ Efectos principales del tiempo. IBRT = inóculo de bacterias ruminales totales; BRA = inóculo de la bacteria ruminal acetogénica; IBRT+BRA = inóculo de bacterias ruminales totales + bacteria ruminal acetogénica.

La producción de CO₂ fue ascendente a las 24 h de incubación del sustrato (Figura 6.3) y no se encontraron diferencias significativas en los tiempos 48 y 72 h en la PCO₂BT. Respecto al porcentaje de metano del gas total (PCH₄GT) fue mayor a las 48 h y disminuyó ($p < 0.05$) a las 72 h. Tras la hidrólisis de polímeros, casi todo el hidrógeno se involucra en la producción de CH₄, lo que confirma el dominio de las bacterias metanogénicas en el ecosistema ruminal por la utilización de hidrógeno (Chaucheyras *et al.*, 2010).

Un factor que afecta la producción de gas *in vitro* es la especie donadora del inóculo, la actividad microbiana difiere entre especies, su composición depende del tipo de dieta e intervalos de alimentación (Posada y Noguera, 2005), quizá este factor pueda explicar las variaciones del volumen de gas total, porcentajes de CO₂, CH₄ y parámetros de fermentación *in vitro* entre las dos concentraciones del inóculo de la bacteria ruminal acetogénica, algunas diferencias entre los experimentos realizados se presentan a continuación:

La evaluación a baja concentración de la BRA (10^6 bacterias mL⁻¹) en cocultivo con bacterias ruminales tuvo mayor producción de AGV que a alta concentración (10^8 bacterias mL⁻¹). El tratamiento IBRT+BRA a alta concentración del inóculo tuvo la mayor producción de acetato, la relación a:p fue de 7:1, cuando este tratamiento se estimó a baja concentración de inóculo el tipo de fermentación fue acético: propiónico, la relación a:p fue de 1:1.

El cultivo anéxico de la BRA en las dos concentraciones de inóculo demostró una fermentación tipo acético: butírico. El pH se mantuvo sin cambios en ambas concentraciones del inóculo en los tratamientos BRA e IBRT+BRA.

La DIVMS mostró similitud entre las concentraciones de inóculo BRA; no hubo diferencias entre los tratamientos IBRT+BRA e IBRT y la digestibilidad del inóculo anéxico de la BRA fue menor.

El tratamiento IBRT tuvo mayor producción de gas total cuando se evaluó a baja concentración, el IBRT+BRA demostró que la bacteria ruminal acetogénica disminuye la producción de gas total en las dos concentraciones de inóculo (alta y baja). El cultivo anéxico de la BRA tuvo la menor concentración de CH₄ respecto al resto de los tratamientos en ambas concentraciones de inóculo. La mayor cantidad de gas total se presentó a las 24 h y el mayor porcentaje de gas CH₄ se registró a las 72 h en las dos concentraciones de inóculo de BRA.

6.5. Conclusiones

Los parámetros de fermentación indican que el inóculo de la BRA a 10^6 bacterias mL^{-1} aumenta la concentración total de AGV en cocultivo con bacterias ruminales. El cultivo anéxico BRA incrementa la producción de acetato, mientras que en cocultivo con otras bacterias ruminales (BRA+IBTR) aumenta la producción de propionato y la relación a:p es cercana a 1:1. La BRA sola y en cocultivo con bacterias ruminales tuvo un pH ácido a 72 h de incubación.

La BRA no afecta la DIVMS en cocultivo con bacterias ruminales (BRA+IBTR), pero disminuye la concentración de bacterias totales y formatotróficas. El cultivo anéxico de la BRA presentó la digestibilidad y concentración microbiana más baja.

Los efectos estadísticos principales del tiempo indican que la producción total de gas *in vitro* más alta se cuantificó a las 24 h y la mayor concentración de CH_4 se registra entre las 48 y 72 h de incubación.

El tratamiento IBRT+BRA disminuye significativamente la producción de gas total, sin embargo, no tuvo efectos en la concentración de CH_4 , con respecto al tratamiento IBRT.

VII. LITERATURA CITADA

- Alamaraz B. I. 2011. Degradación *in vitro* de la pared celular, variables ruminales y actividad enzimática de microorganismos adheridos a sólidos del complejo *Lolium-Festuca*. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Programa de Ganadería. Montecillo, Texcoco, Edo. México. 89 p.
- Báez P. J. L. 2010. Uso de lavaduras y fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación de alfalfa. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Programa de Ganadería. Montecillo, Texcoco, Edo. México. 86 p.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette and D. Massé. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84:319-335.
- Boccazzi, P. and J. A. Patterson. 2011. Hydrogen- limited anaerobic continuous culture to isolate hydrogen threshold ruminal acetogenic bacteria. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 1: 33-44.
- Borrego, S., M. E. Espinosa, M. E. Carballo, T. Moreira, E. Martí y A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Biotecnología Aplicada.* 18 (2):85-87.
- Calsamiglia, S. y A. Ferret. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorosis. XVIII Curso de Especialización FEDNA: avances en nutrición y alimentación animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Rebollar, C. de Blas y Mateos G.G. Eds. Barcelona, España. pp 95-115.
- Calsamiglia, S., W. P. Cardozo, A. Ferret and A. Bach. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86:702-711.
- Cerrato, S. M., S. Calsamiglia and A. Ferret. 2008. Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *J. Anim. Sci.* 86:378-383.
- Chaucheyras, D. F., S. Masséglia, G. Fonty and E. Forano. 2010. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 76 (24):7931-7937.

- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin and P. Gouet. 1995. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Environ. Microbiol. 61(9):3466-3467.
- Clemens, J. and H. J. Ahlgrimm. 2001. Greenhouse gases from animal husbandry: Mitigation options. Nutr. Cycl. Agroecosys. 60:287-300.
- Cobos, M.A., A. Ley de Coss, N.D. Ramírez, S. S. González and R. Ferrera Cerrato. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with acidosis, 16S RNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. Res. in Vet. Sci. 1:26-30.
- Cobos, P. M.A. and M.T. Yokohama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: Colonization and degradation of Shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Rumen Ecology Research Planning. R.J. Wallace y A. Lahlou-Kassi (Eds.). International Livestock Research Institute (ILRI). pp. 151-161.
- Cunningham, J. G y G. K. Bradley. 2009. Fisiología veterinaria. Ed. Elsevier. 4^a edición. Barcelona, España. 675 p.
- Czerkawski, J.W., K. L. Blaxter and F. W. Wainman, 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. Br. J. Nutr. 20:349-362.
- De Blass, C., R. P. García., L. M. Cambra y A. G. Torres. 2008. XXIV Curso de Especialización FEDNA: Avances en nutrición y alimentación animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Rebollar, C. de Blas y Mateos G.G. (Eds.) Barcelona, España. pp. 121-150.
- Deppenmeier U. 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.71:223-283.
- Doreau, M., H. M. G. van der Werf., D. Micol, H. Dubroeuq, J. Agabriel, Y. Rochette and C. Martin. 2011. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. J. Anim. Sci.89:2518-2528.
- Drake, L H. and K. Küsel. 2003. How the diverse physiologic potentials of acetogens determine their in situ realities. In: Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria. Ljungdahl G. L., M. Adams W., L. Barton L., J. Ferry G., M. Johnson. K. (Eds). Spriner-Verlag. New York. 261 p.

- Eckard, J. R., C. Grainger and C.A.M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Sci.*130:47–56.
- Engelking L. R. 2002. Review of veterinary physiology. Ed.Teton New Media. Alpine, WY. 645 p.
- Evvyernie, D., K. Morimoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2001 Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 339-343.
- FAO. 2006. Livestocks long shadow. Environmental insusses and options. H. Steinfeld; P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales; C. de Haan. (Eds). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 307 p.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Ferry, J. G and K. A. Kasted. 2007. Methanogenesis. *In: Archaea: molecular and cellular biology.* R. Cavicchioli (Editor). American society for microbiology. Washington, D.C. pp. 288-314.
- Ferry J. G. 1993. Fermentation to acetate. *In: Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics.* Ferry J. G (Editor) Chapman and hall. New York, NY. pp. 304-334.
- Firkins, J.L. and Z. Yu. 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen *In: Ruminant physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress.* Sejrnsen K., Hvelplund T., Nielsen M.O (Eds.) Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp.19-24.
- Fonty, G., K. Joblin, and M. Chavarot R. 2007. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen free lambs. *J. Appl. Environ. Microbiol.* (20): 6391–6403.
- Giraldo, L. A., M. D. Carro, M. J. Ranilla and M. L. Tejido.2007. Influence of fibrolytic enzymes on *in vitro* methane production and rumen fermentation of a substrate containing 60 % de grass hay. *Livestock Research for Rural Development.* 19:(85). Revisado el 11 de Noviembre de 2011, de <http://www.lrrd.org/lrrd19/12/gira19185.htm>.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1979. *Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*. Editorial Academia. León, España. 419 p.
- Hattori S. 2008. Syntrophic acetato-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and environments*. 23(2): 118-127.
- Henderson, G, E., N. Graham, C. L. Sinead and H. P. Janssen. 2010. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(7): 2058-2066.
- Hungate R. E. 1969. A roll tube method for cultivation strict anaerobes. *In: Methods in Microbiology*. Norris, J.R. y D.W. Robins (Eds.), Academic Press Inc. New York, USA. pp. 117-132.
- Itabashi, H., E. Bayaru, S. Kanda, T. Nishida, S. Ando, M. Ishida, T. Itoh, Y. Isobe and K. Nagara. 2000. Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility in cattle. *The 3rd Joint Symposium of Japan and Korea on Rumen Metabolism and Physiology*. 11, 72. Miyazaki, Japan.
- Joblin K.N. 1999. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian J. Agric. Res.*50(8):1307-1314.
- Johnson, K. A. and E. D. Johnson 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.*73:2483-2492.
- Kamra D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89 (1): 124-135.
- Keltjens, T. J. and G. D. Vogels. 1993. Conversion de methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. *In: Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics*. Ferry J. G (Editor) Chapman and hall. New York, NY. pp. 253-303.
- Kumar, V., M. Tandon and M. P. Verma. 2008. Nutritional techniques for mitigating metahane production from rumiants. *Dairy Planner*. 4(11) 12:14.
- Le Van, T. D, J.A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle and D.M. Schaefer. 1998. Assessment of a reductive acetogens whit indigenus ruminal bacterium populations and *Acetitomaculum ruminis*. *J. Appli. and Environ. Microbiol.* 64(9): 3429-3436.

- López, S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace and C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 78: 1-9.
- Lovley D. and M. J. Klug. 1983. Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1310-1315.
- Madigan, M. T., J.M. Martiniko y J. Parker. 2009. *Biología de los microorganismos*. Ed. Perason-Prentice Hall. 12^a edición, Madrid, España. 1259 p.
- Martin C, D. P. Morgavi and M. Doreau. 2008. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4:351-365.
- Martínez M.E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, S. Ramos, M. D. Carro. 2010. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J. Dairy Sci.*;93(8):3684-3698.
- Martínez Peláez M. E. 2009. Estudios de simulación del ecosistema ruminal en sistemas *in vitro*: aspectos metodológicos. Tesis de Doctorado. Universidad de León. Departamento de Producción Animal. León, España. 399 p.
- McAllister, T. A. and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian J. of Exp. Agri.* 48(2):7-13.
- Mirzaei, A, A. and S. N. Maheri. 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: Feeding strategies. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6 (9):888-908.
- Mohammed, N., N. Ajisaka, Z.A. Lila, H. Koji, K. Mikuni, K. Hara, S. Kanda and H. Itabashi. 2004. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *J. Anim. Sci.* 82:1839-1846.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 4:7.1024-1036.
- Morvan, B., F. Bonnemoy, G. Fonty and P. Gouet. 1996. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current Microbiol.* 32: 129-133.
- Moss, A.R., J. P. Jouany and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences. *Ann Zootech.* 49: 231-253.
- Müller V. 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6345-6353.

- Nollet, L., D. Demeyer, and W. Verstraete. 1997. Effect of 2-Bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus Productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1):194-200.
- NRC (Nacional Research Council). 1985. Nutrient Requierments of sheeps. 6° edición. Nacional Academy Press. Washington D.C., E.U.A. pp. 45-46.
- Posada, S. L. y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 17:36. Revisado el 30 de Octubre de 2011, de <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>.
- Ragsdale S W. 2008. Enzymology of the Wood–Ljungdahl Pathway of Acetogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125: 129–136.
- Ragsdale, S. W. and E. Pierce. 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂ Fixation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784(12): 1873–1898.
- Rodicio, M. y M. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(4):238-245.
- Rodríguez C. J. A. 2009. Aislamiento y caracterización *in vitro* de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Programa de Ganadería. Montecillo, Texcoco, Edo. México. pp: 62-63.
- Russell, J. B., R. E. Muck and P. J. Weimer. 2009. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol. Lett.* 67:183–197.
- SAS Inc., 1998. SAS® User's Guide: Statistics, Version 6 Edition. SAS Inc. Cary, NC, USA.
- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 61(2): 262–280.
- Show, K. Y., Z. P. Zhang and D. J. Lee. 2008. Desing of bioreactors for biohydrogen production. *J. Sci. Ind. Res.* 67:941-949.
- Stams, J.M. A. and C. M. Plugge. 2010. The microbiology of methanogenesis. *In: Methane and climate change*. 2. Reay R. D., P. Smith and A. van Amstel (Eds). Earthscan. Washington, D.C 253 p.

- Tahuer K. R., R. Hedderich and R. Fischer. 1993. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂ *In: Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics.* Ferry J. G (Editor) Chapman and hall. New York, NY. pp. 209-252.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. Mega4; Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software ver 4.0. *Mol. Biol. Evo.* 24:1596- 1599.
- Thauer R. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology.*144: 2377-2406.
- Thauer, K. R., A. K. Kaster, H. Seedorf , W. Buckel and R. Hedderich. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.*6:579–591.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionsspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22:4673-4680.
- Ungerfeld, E. M. and R. A. Kohn. 2006. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. *In: Ruminant physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress.* Sejrsen K., Hvelplund T., Nielsen M.O (Eds.) Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 55-81.
- Valenciaga, D. O. O., B. Chongo y A. Oramas. 2006. Efecto del tiempo de reposo en la degradabilidad ruminal *in situ* del complejo lignocelulósico y la producción de gas *in vitro* del clon Cuba CT-115 (*Pennisetum purpureum* sp.). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.*40(1):71-81.
- Van Soest P. J. 1994. Nutrition ecology of the ruminant. Ed. Cornell University. 2^a Edición. Ithaca, New York. 425 p.
- Weimer J. P. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Ani. Sci.*76:3114-3122.
- Welte, C. and U. Deppenmeier . 2011. Proton translocation in methanogens. *Methods Enzymology.*494:257-80.
- Zawadzki, W. 1986. Inhibition of methanogenesis in the rumen of sheep. II. Methanogenesis after administration of inhibitors. *Pol. Arch. Weter.* 25:127-144.