



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UNA
 BACTERIA ACETOGÉNICA RUMINAL

JAIME AZAEL RODRÍGUEZ CARRILLO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.

2009

La presente tesis titulada: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UNA BACTERIA ACETOGÉNICA RUMINAL** realizada por el alumno: **JAIME AZAEL RODRÍGUEZ CARRILLO**, 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. David Hernández Sánchez.

ASESOR:

Dr. David Espinosa Victoria.

ASESOR:

Dr. Marcos Pérez Sato.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2009

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UNA BACTERIA ACETOGÉNICA RUMINAL

Jaime Azael Rodríguez Carrillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2009

La producción de metano (CH₄) en rumiantes representa una pérdida de energía metabólica para el animal y contribuye en la generación de gases efecto invernadero. Una alternativa para disminuir la producción de CH₄ en los rumiantes, es desarrollando inoculos de bacterias acetogénicas que compitan con las bacterias metanogénicas por los sustratos utilizados en la producción de metano. En el presente estudio se usó un medio de cultivo selectivo a base de formato y líquido ruminal (F-LR) para el aislamiento de una bacteria ruminal acetogénica. Se determinaron algunas características morfológicas y metabólicas de la bacteria aislada. También, se evaluó su capacidad para producir acetato a partir de formato, y de disminuir la metanogénesis en cocultivo con bacterias ruminales. La bacteria ruminal acetogénica (BRA) aislada resulto un coco Gram+, 0.5 a 1.0 µm de diámetro, anaerobio estricto y catalasa negativo. La bacteria se conservo por liofilización con una viabilidad de 10⁸ células g⁻¹ de liofilizado. La BRA degrada formato y produce acetato. En cocultivo con un cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR), la BRA redujo en 66% la producción de CH₄ después de 72 h de incubación. De acuerdo al análisis de la subunidad 16S del ARN ribosomal, la BRA pertenece a la especie *Pantoea agglomerans*; aunque, también puede pertenecer a una especie ruminal no cultivable. Por lo que se requiere continuar con su identificación molecular. Se concluye que la bacteria ruminal acetogénica aislada, tiene potencial como inóculo para disminuir la producción de metano en rumiantes.

Palabras clave: metano, bacteria ruminal acetogénica, microorganismos ruminales, gases efecto invernadero.

IN VITRO ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ONE ACETOGENIC RUMEN BACTERIA

Jaime Azael Rodríguez Carrillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2009

The methane (CH₄) production in ruminants is considered a metabolic energy lost for the animal and contributes in the greenhouse gases effects. An alternative to reduce the ruminants CH₄ production, is by development of an inoculum of acetogenic bacteria. These bacteria must be able to compete with methanogenic bacteria for substrates used in methane production. In the present study a selective culture medium based on formate-rumen fluid (F-LR) was used for isolation of the acetogenic rumen bacterium (ARB). Some metabolic and morphologic characteristics of the bacterium were determined. Also, its ability to produce acetate from formate, and to reduce methanogenesis in coculture with rumen bacteria were evaluated. The ARB isolated was a Gram+ coccus, 0.5 -1.0 µm in diameter, strict anaerobe and catalase negative. The bacterium was preserved by lyophilization, maintained a viability of 10⁸ cells g⁻¹ of mass lyophilized. The ARB, degrades formate and produces acetate. ARB reduces by 66% CH₄ production after 72 h incubation in coculture with a mixed culture of rumen bacteria (MCRB). According with the 16 RNA ribosomal analysis, ARB belongs to the species *Pantoea agglomerans*; however, it could also belongs to a non-cultivable rumen species. Therefore, it is required to continue with its molecular identification. It is concluded that the acetogenic-rumen bacterium isolated has potential as inoculums to reduce methane production in ruminants.

Key words: methane, acetogenica-rumen bacteria, ruminal microorganims, greenhouse gas effect.

DEDICATORIA

A Dios:

*Porque gracias a él tengo
la vida, la razón y el
entusiasmo de salir
adelante. Todo lo que
hago es ofrecido a Su
infinita Misericordia*

BENDICE MI

VIDA, MI

*TRABAJO, MI
CRUZ Y LA DE
TODOS LOS QUE
ME RODEAN!!!*

*A la Santísima Virgen Por Su protección, y
María: amorosa intercesión ante el
Todopoderoso.*

*ACOMPANÁME
SIEMPRE!!!*

A mis padres:

*Por su apoyo incondicional
Jaime Alfonso e Imelda: para buscar mis metas y
desarrollo personal y
profesional.*

*Con su educación me
inculcaron a ser hombre de
bien, a salir adelante en
base al trabajo y esfuerzo.
Son mi base y mi modelo a
seguir.*

SIMPLEMENTE

GRACIAS!!!

A mis hermanas:

Por su apoyo y cariño de

Caro y Mariana:

toda la vida.

TODAS LAS

GANAS PARA

SALIR

ADELANTE!!!

*A los Angeles que me Sean mis guardianes, mis
acompañan por siempre: ángeles de la guarda.*

Ninã, Claudia, abue

Lupã:

A mis amigos:

*Julio, Migue, Juan
Francisco, Ray, Lalo,
Abel, Sergio, Rodrigo,
Sharon, Karen, Chela,
Iván Navarro, Fer León,*

*Eloy, Beto Zavala, Beto
"cucho", Fer "Gallo",
Horacio "Barza",
"Chuy" Mireles,
Raymond, Rubén
"loquillo" y demás.*

*A todos mis primos, tíos y
amigos que me faltaron por
mencionar.*

*EN EL CAMINO
ANDAMOS γ*

*VAMOS PARA
ADELANTE!!!*

AGRADECIMIENTOS

- Al concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): Por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible obtener el grado de Maestro en Ciencias.
- A la Línea Prioritaria de Investigación No. 8 **“IMPACTO Y MITIGACIÓN DEL CAMBIO CLIMÁTICO”**: Por la oportunidad que me dieron de participar en el proyecto, y por el apoyo económico para la realización de esta investigación.
- Dr. Mario Antonio Cobos Peralta: Por su apoyo, experiencia, dedicación y amistad dedicada a mi formación profesional y personal, además de la realización exitosa de este trabajo.
- Dr. David Hernández Sánchez: Por su apoyo, consejos, amistad y gran disponibilidad, que influenciaron en mi desarrollo profesional y personal.
- Dr. David Espinosa Victoria: Por su apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación.
- Dr. Marcos Pérez Sato: Por su amistad, y gran disponibilidad para resolver dudas y realizar observaciones en este trabajo.

Liliana Salazar Ordaz

Por tu apoyo y cariño que me ayudo a crecer como persona. Mil gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Miguel Mata, Fabiola, Agustín, Anastacio, Pedro Obrador, Angélica, José Luis, Dra. Magda y demás que faltaron por mencionar:

Por el apoyo y la amistad durante mi estancia en la Maestría.

A mis amigos y compañeros: Francisco Jorge, Iván, Néstor, Jorge, Benigno, Iván Reyes, Enrique y Germán Buendía, Jorge A. Villarreal, Carlos Sánchez, Edy Alfonso, Dr. Herrera Haro y todos los del equipo de futbol de ganadería.

Por su amistad y apoyo durante mi estancia en este postgrado.

Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez y Dra. Ninfa Ramírez Durán:

Por su apoyo y gran disponibilidad para desarrollar parte de este trabajo.

Ana I. Ramírez Padilla, Araly A. Salgado Parra y M. Guadalupe Hernández Deheza:

Por dedicar parte de su tiempo en apoyar esta investigación.

A los amigos y amigas de la biblioteca del Colegio de Postgraduados.

Por su servicio y amables atenciones para facilitar mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A Dr. Keir Francisco Byerly Murphy, M.C. Primitivo Díaz Mederos, Dr. Fernando De La Torre Dr. Gerardo Salazar, M.C. Ramón Hernández Virgen, y todos los amigos y compañeros de INIFAP del CIRPAC y CECEAJAL.

Por su paciencia y apoyo moral para la realización de este documento

A todos aquellos que me faltó mencionar y que me apoyaron en mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

¡¡¡ MUCHAS GRACIAS!!!

*"Nunca andes por el camino trazado
Pues él te conduce únicamente hacia
Donde los otros fueron" (GRAHAM BELL)*

*"No se puede enseñar nada a un hombre
Solo se le puede ayudar a encontrar la
Respuesta dentro de sí mismo "
(GALILEO GALILEI)*

"Las grandes almas tienen voluntades,

Las débiles tan solo deseos"

(PROVERBIO CHINO)

"La verdadera sabiduría está en reconocer

La propia ignorancia"

(SÓCRATES)

CONTENIDO

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Metanogénesis y ambiente ruminal.....	3
2.2. Bacterias metanogénicas ruminales.....	4
2.3. Estrategias para la disminución de la metanogénesis ruminal	6
2.4. Generalidades de las bacterias acetogénicas ruminales.....	7
2.5. Metabolismo de las bacterias acetogénicas.....	9
2.6. Componentes del medio de cultivo usados para el aislamiento de bacterias acetogénicas ruminales.....	12
3. OBJETIVOS.....	15

3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos particulares.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. Aislamiento y conservación de la bacteria.....	17
5.1.1. Obtención de la fuente de inóculo.....	17
5.1.2. Aislamiento en medio de cultivo selectivo.....	18
5.1.3. Aislamiento y cultivo en medio sólido.....	20
5.1.4. Conservación del cultivo axénico y viabilidad del producto.....	21
5.2. Pruebas bioquímicas y morfológicas.....	23
5.2.1. Morfología colonial y bacteriana, tinción Gram, y prueba catalasa.....	23
5.2.2. Determinación de la viabilidad bacteriana en medio de cultivo F-LR enriquecido con glucosa.....	23
5.2.3. Análisis de los datos.....	24
5.3. Determinación <i>in vitro</i> de la concentración de formato y ácidos grasos volátiles (AGV) en medio de cultivo selectivo inoculado con la bacteria acetogénica aislada o con bacterias ruminales.....	25
5.3.1. Rehidratación de cultivo liofilizado de la bacteria	

acetogénica aislada.....	25
5.3.2. Inoculación de tubos de cultivo.....	25
5.3.3. Determinación de la concentración bacteriana a 0, 24, 48 y 72h de incubación.....	26
5.3.4. Determinación de la concentración molar de formato...	27
5.3.5. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles.....	27
5.3.6. pH del medio de cultivo a diferentes tiempos de incubación.....	28
5.3.7. Análisis de los datos.....	28
5.4. Producción <i>in vitro</i> de CH ₄ , CO ₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica (BRA) sola o en cocultivo con un cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR).....	29
5.4.1. Rehidratación del inóculo liofilizado de la bacteria acetogénica aislada.....	29
5.4.2. Inoculación y montaje de sistema para producción de gás <i>in vitro</i>	30
5.4.3. Producción de CO ₂ y CH ₄	32
5.4.4. Degradabilidad <i>in vitro</i> de MS.....	34
5.4.5. Concentración de bacterias totales.....	34
5.4.6. Concentración de bacterias celulolíticas.....	35
5.4.7. Concentración de bacterias utilizadoras de formato....	35

5.4.8. Concentración de ácidos grasos volátiles.....	36
5.4.9. pH del medio de cultivo.....	36
5.4.10. Análisis de los datos.....	36
5.5. Identificación molecular mediante el gen ARN ribosomal 16s	37
5.5.1. Extracción de ADN.....	37
5.5.2. Amplificación del gen ribosomal 16S.....	38
5.5.3. Análisis de la secuencia e identificación de la bacteria ruminal acetogénica.....	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1. Obtención del cultivo puro, caracterización morfológica y bioquímica.....	40
6.1.1. Proceso de aislamiento.....	40
6.1.2. Concentración de bacterias viables del cultivo puro.....	41
6.1.3. Caracterización morfológica del cultivo puro....	41
6.1.4. Concentración bacteriana en medio de cultivo enriquecido con glucosa al 2%.....	43
6.2. Determinación <i>in vitro</i> de la degradación de formato y concentración de AGV.....	44
6.2.1. Concentración bacteriana y pH en medio de cultivo F-LR.....	44

6.2.2. Concentración de formato y AGV en medio de cultivo selectivo F-LR.....	46
6.3. Producción <i>in vitro</i> de CH ₄ , CO ₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica sola o en cocultivo con CMBR.....	52
6.3.1. Concentración bacteriana y pH en medio de cultivo para bacterias ruminales.....	52
6.3.2. Concentración de AGV, degradación de materia seca y producción de CH ₄ y CO ₂ en medio de cultivo con una dieta de finalización para ovinos como sustrato.....	54
6.4. Identificación molecular en base al gen ARN ribosomal 16s.....	60
7. CONCLUSIONES.....	62
8. RECOMENDACIONES.....	63
9. LITERATURA CITADA.....	64
10. ANEXOS.....	75
10.1. Método de extracción de ADN descrito por Ahrens y Smeeüller (1992), modificado por Rojas (1989).....	75
10.2. Determinación de formato por método colorimétrico,	

descrito por Sleath y Mah (1984).....	76
10.2.1.Estándar de formato.....	76
10.2.2.Muestras problema.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Bacterias acetogénicas aisladas del rumen.....	8
2.	Energía de activación de la metanogénesis y la acetogénesis con varios sustratos como fuente de energía.....	11
3.	Composición del medio selectivo F-LR usado para el aislamiento de la bacteria acetogénica.....	19
4.	Dieta integral para ovinos en finalización.....	31
5.	Componentes del medio de cultivo para bacterias totales sin fuente de energía.....	33
6.	Características morfológicas de la bacteria aislada.....	42
7.	Concentración bacteriana en medio de cultivo F-LR y F-	

	LR enriquecido con glucosa al 2%.....	44
8.	Concentración bacteriana (Células mL ⁻¹) y pH a diferentes tiempos de incubación en medio de cultivo F-LR.....	46
9.	Concentración de formato (mM) en medio de cultivo F-LR	48
10.	Concentración de acetato (mM) en medio de cultivo F-LR.....	48
11.	Concentración de propionato (mM) en medio de cultivo F-LR.....	50
12.	Concentración de butirato (mM) y pH en medio de cultivo a 72 h de incubación.....	51
13.	Concentración bacteriana (células mL ⁻¹) y pH en medio de cultivo a las 72 h de incubación.....	54
14.	Degradación de MS (%), producción de CO ₂ (mmol) y CH ₄ (μmol) en la fermentación <i>in vitro</i> de una dieta integral para ovinos.....	56
15.	Concentración de AGV (mol L ⁻¹) producido por la fermentación de una dieta de finalización para ovinos a las 72 h de incubación.....	57
16.	Dilución de solución madre para puntos de la curva de calibración para la determinación de formato.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ruta metabólica de la metanogénesis.....	5
2.	Síntesis de acetato por la vía Acetil-CoA.....	10
3.	Estructura química del cloramfenicol.....	14
4.	Obtención del líquido ruminal por medio de una sonda esofágica.....	17
5a y 5b.	Medio de cultivo F-LR sólido en tubo horizontal usado para el aislamiento de la bacteria acetogénica ruminal....	20
6a, 6b y 6c.	Proceso de liofilización la bacteria aislada, en medio de cultivo líquido: a) vial congelado con la bacteria aislada en medio de cultivo F-LR, b) vista lateral de vial y	

	liofilizadora, c) producto almacenado.....	22
7.	Sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	33
8a y 8b.	Morfologías bacterianas encontradas durante el proceso de aislamiento.....	40
9.	Morfología colonial de la bacteria aislada en medio de cultivo anaerobio.....	42
10.	Concentración de formato y acetato en medio de cultivo F-LR a 0, 24, 48 y 72 h de incubación.....	49
11.	Ruta metabólica para la síntesis de butirato a partir de Acetil-CoA (adaptada de Hartmanis y Gatenbeck, 1984).	59
12a y 12b.	Secuencias de nucleótidos obtenidos del análisis del ADN ribosomal 16S obtenido de la bacteria aislada. 12 a <i>Pantoea agglomerans</i> y 12 b bacteria de epitelio ruminal.....	61

La presente tesis titulada: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UNA BACTERIA ACETOGÉNICA RUMINAL realizada por el alumno: JAIME AZAEL RODRÍGUEZ CARRILLO, 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

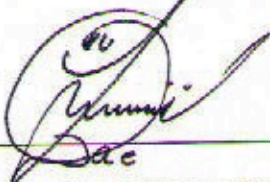
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



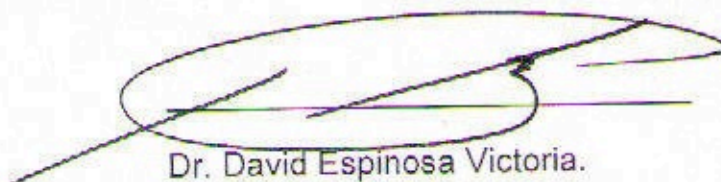
Dr. Mario Antonio Cobos Peralta.

ASESOR:



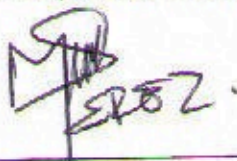
Dr. David Hernández Sánchez.

ASESOR:



Dr. David Espinosa Victoria.

ASESOR:



Dr. Marcos Pérez Sato.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2009

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han aumentado considerablemente la concentración de gases efecto invernadero en la atmósfera, como son dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (NO_2), hidrofluorocarbonados (HFC), perfluorocarbonados (PFC) y hexafluoruro azufrados (SF_6), lo que se ha relacionado con un aumento en calentamiento global del planeta (University of New Hampshire, 2004).

Los gases efecto invernadero (GEI) emitidos por la actividad agrícola son el CO_2 , CH_4 y el NO_2 (Agriculture and Rural Development of Alberta, Canada, 2005). El CH_4 es un GEI que además de contribuir en el efecto invernadero de la superficie terrestre, también, contribuye en la destrucción de la capa de ozono en la estratósfera (Primavesi *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2005). Aunque el CH_4 es el segundo GEI en volumen de producción, después del dióxido de carbono, posee un potencial de calentamiento de 21 a 30 veces mayor que el CO_2 (McCaughey *et al.*, 1997; Carmona *et al.*, 2005). La producción pecuaria contribuye ampliamente con las emisiones antropogénicas de CH_4 a la atmósfera. De acuerdo a McCaughey *et al.* (1997) y Moss *et al.* (2000) los animales domésticos, principalmente el ganado bovino, son responsables aproximadamente del 15% de la producción global de CH_4 . Además del efecto invernadero asociado a la metanogénesis ruminal, el CH_4 representa una pérdida energética considerable para el animal. Esta pérdida normalmente representa 5.5 a 6.5% del total de la energía consumida en la dieta (McCaughey *et al.*, 1999), aunque también se ha reportado una pérdida energética mayor, del 12% al 18 %, en animales en pastoreo de forrajes de baja calidad (Carmona *et al.*, 2005).

Por lo anterior, los estudios dirigidos a reducir las emisiones de gas CH₄ en rumiantes, pueden en un futuro, contribuir a disminuir la generación de gases efecto invernadero generados por agropecuarias; así como, mejorar la eficiencia energética de los animales. La presente investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar una bacteria acetogénica ruminal para su posterior evaluación, como un inóculo ruminal que disminuya la producción de metano en rumiantes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Metanogénesis y ambiente ruminal.

En el rumen los microorganismos mantienen una relación simbiótica con el rumiante. Las bacterias, protozoarios y hongos ruminales son los responsables de la digestión ruminal del alimento y dependen del rumiante para disponer de las condiciones físico-químicas necesarias para su existencia y actividad. Así, esta simbiosis necesita mantener ciertas condiciones para un correcto funcionamiento (Owens y Goetsch, 1988).

La fermentación ruminal en condiciones normales, mantiene una osmolaridad entre 260 y 340 mOsm y un pH que puede variar de 5.5 a 7.2; aunque, valores por debajo de 6.0 disminuyen o inhiben la actividad de bacterias celulolíticas, y valores cercanos a 5.5 por periodos prolongados, ponen en riesgo la vida del animal; el potencial redox suele oscilar entre -250 y -450 reflejando la ausencia de oxígeno y el exceso de poder reductor, lo que permite que se realicen varias reacciones enzimáticas y asegura un ambiente anaerobio requerido por la mayoría de los microorganismos ruminales (Yokoyama y Johnson, 1988).

La reducción del CO_2 a CH_4 en el rumen es realizada exclusivamente por bacterias metanogénicas, que utilizan la ruta metabólica denominada metanogénesis (Figura 1). La cual puede ser dividida en varios pasos. Inicialmente, el CO_2 es activado por la enzima que contiene el metanofurano y reducido al nivel de formilo. El grupo formilo se transfiere del metanofurano a una enzima que contiene metanopterina y posteriormente es deshidratado y reducido en dos pasos distintos a metileno y metilo. Después, el grupo metilo se transfiere de la metanopterina a una enzima que

contiene CoM. Finalmente, el metil-CoM es reducido a metano por el sistema de la metil reductasa, en el cual dos coenzimas la F₄₃₀ y la CoM están implicadas. La coenzima F₄₃₀ elimina el grupo CH₃ del CH₃-CoM, formando un complejo Ni²⁺ - CH₃. Este es reducido por los electrones del CoB y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S – S-CoB), en el proceso se produce, a través de la fuerza motriz de protones, una mol de ATP por mol de metano producido (Mandigan *et al.*, 2002).

En el rumen, la metanogénesis tiene una función primordial, ya que es una ruta metabólica aceptora de electrones, que de forma constante remueve el H⁺ producido durante la fermentación ruminal de carbohidratos y proteínas de la dieta, y por lo tanto, mantiene el ecosistema ruminal en un pH óptimo para que se realicen eficientemente todas la actividades microbianas (Weimer, 1998; McAllister y Newbold, 2008).

2.2. Bacterias metanogénicas ruminales.

Las bacterias metanogénicas son microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* (Woese *et al.*, 1990; Whitford *et al.*, 2001). Se diferencian del dominio *Bacteria*, por características únicas de su pared celular, que las hacen más resistentes en ambientes extremos (Mandigan *et al.*, 2002). Son microorganismos anaerobios estrictos y pueden crecer en diferentes tipos de ambientes anóxicos en interacción con otros microorganismos. La característica particular de estos microorganismos, es que producen metano para la obtención de energía metabólica (Bergey, 1994a; Whitford *et al.*, 2001). Los principales sustratos para la producción CH₄ son el CO₂ y el H₂ como donador de electrones, aunque puede utilizar otros

2.3. Estrategias para la disminución de metanogénesis ruminal

La disminución de metano emitido por los rumiantes es una estrategia fundamental para disminuir las emisiones de GEI generados por actividades agropecuarias (Hegarty, 1999). Se han seguido varias líneas de investigación para disminuir la producción de metano en rumiantes, que se pueden clasificar en tres grandes grupos. La primera línea, se basa en disminuir la producción de CH₄ en rumen indirectamente; por ejemplo, la defaunación (Ushida *et al.*, 1997), o estimulando la fermentación propiónica en el rumen, disminuyendo la cantidad de carbohidratos estructurales y aumentando la de carbohidratos de fácil fermentación en la dieta (McAllister y Newbold, 2008). La segunda línea evalúa productos que inhiben directamente a las bacterias metanogénicas; por ejemplo, la producción de vacunas contra bacterias metanogénicas (Wright *et al.*, 2004), utilizando extractos de plantas (García *et al.*, 2006; Busquet *et al.*, 2005), ionóforos, antibióticos específicos (Dong *et al.*, 1999), bacteriófagos (McAllister *et al.*, 1996) y bacteriocinas (Lee *et al.*, 2002). La tercera línea, evalúa vías alternas para la utilización del H⁺ producido en rumen, con el objetivo de limitar la producción de CH₄. Se han adicionando ácidos orgánicos precursores del propionato (Kolver *et al.*, 2004), y se investigan diferentes bacterias acetogénicas que pueden usar H⁺ y CO₂ en la producción de acetato (Lopez *et al.*, 1999).

La inclusión de bacterias acetogénicas ruminales es una alternativa altamente recomendada para disminuir la emisión del CH₄, ya que, no produce daño fisiológico al animal o a otros microorganismos ruminales; además, el producto principal de la

fermentación es el acetato, un ácido graso volátil, que contribuye en los requerimientos energéticos del animal (Owens y Goetsch, 1988).

2.4. Generalidades de las bacterias acetogénicas ruminales

Las bacterias acetogénicas son microorganismos anaeróbicos estrictos que producen principalmente acetato. En general pueden crecer quimiolitotróficamente usando H_2 y CO_2 como fuente de energía; en el proceso el CO_2 se reduce a acetato y se produce un ATP por mol de acetato. El primer reporte de la formación de acetato, a partir de H_2 y CO_2 , fue publicado por Fischer en 1932 (Diekert y Wohlfarth, 1994). Las bacterias acetogénicas crecen en diferentes ambientes anóxicos incluyendo el rumen de ovinos, venados, bisontes y bovinos. De acuerdo a Joblin (1999), la concentración de estas bacterias en el rumen depende del tipo de alimentación y varía entre $<10^2$ a 10^8 , con un promedio 10^5 células g^{-1} de digesta. El mismo autor, reporta características de 10 bacterias acetogénicas aisladas del rumen de diferentes animales (Cuadro 1). Existen características en común entre las especies, por ejemplo ninguna es hidrogenotrofa obligada y crecen adecuadamente en una amplia variedad de sustratos. Sin embargo, no pertenecen a un mismo grupo taxonómico.

De acuerdo a Kamra (2005) de las bacterias acetogénicas aisladas del rumen, solo dos son las de mayor importancia: *Eubacterium limosum* y *Acetitomaculum ruminis*.

Cuadro 1. Bacterias acetogénicas aisladas del rumen.

Bacteria	Fuente del inóculo	Dieta del animal	Esporas	pH óptimo	Referencia
<i>Eubacterium limosum</i>	Ovino	Rastrojo-melaza	-	7.2	Genthner <i>et al.</i> , (1981)
<i>Acetitomaculum ruminis</i>	Bovino	Heno-concentrado	-	6.8	Greening y Leedle (1989)
No identificada	Bovino	Heno-grano	-	6.8-7.5	Boccazzi (1993)
No identificada	Bovino	Pasto-grano	-	7.0-7.5	Rieu-Lesme <i>et al.</i> (1995)
<i>Peptostreptococcus productos</i>	Cordero	Leche	-	No disponible	Morvan (1995)
No identificada	Cordero	Leche	+	6.3-6.8	Rieu-Lesme <i>et al.</i> (1996a)
<i>Ruminococcus shinkii</i>	Cordero	Leche	-	6.5-7.0	Rieu-Lesme <i>et al.</i> (1996b)
<i>Clostridium difficile</i>	Cordero	Leche	+	6.5-7.0	Rieu-Lesme <i>et al.</i> (1998)
No identificada	Bovino	Forraje fresco	+	6.5-7.2	K. N. Joblin y D. M. Burgess ¹
No identificada	Ovino	Forraje fresco	-	6.5-7.2	K. N. Joblin y D. M. Burgess ¹

(Joblin, 1999). ¹No reportado.

2.5. Metabolismo de las bacterias acetogénicas

Las bacterias acetogénicas, reducen el CO_2 a acetato por medio de la vía acetil-CoA a partir de la ruta metabólica Wood-Ljungdahl (Figura 2). En esta ruta participan dos moléculas de CO_2 ; la primera molécula de CO_2 es reducida al grupo metilo del acetato, mientras que, la otra molécula de CO_2 es incorporada al metabolito intermediario metil-CoA para formar acetil-CoA, acetilfostato y finalmente la formación de acetato y un mol de ATP. La enzima monóxido de carbono deshidrogenasa es clave para la formación del grupo carbonilo (COO^-) del acetato y requiere de Ni, Zn y Fe. El grupo metilo (CH_3^-) se forma debido a una serie de reacciones, en las que intervienen como coenzimas el tetrahidrofolato y la cianocobalamina. El COO^- y CH_3^- se unen para formar el acetil-CoA, finalmente se libera el acetato, en una reacción donde actúan el Fe y el Ni, como cofactores, produciéndose un ATP por medio de la fuerza motriz de Na^+ (Diekert y Wohlfarth, 1994; Mandigan *et al.*, 2002) (Figura 1).

La reducción del CO_2 por el H^+ a acetato es termodinámicamente menos favorable que la reducción de estos sustratos a CH_4 (104.6 vs 135.6 Kj mol^{-1}) (Joblin, 1999; McAllister y Newbold, 2008), lo que hace a las bacterias acetogénicas menos competitivas metabólicamente, en comparación con las bacterias metanogénicas; por tanto, las bacterias acetogénicas pueden usar otros sustratos C_1 como donadores de electrones, entre los cuales se incluyen monóxido de carbono, azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y algunas bases nitrogenadas (Mandigan *et al.*, 2002). Entre los sustratos alternativos utilizados con mayor frecuencia como donadores de electrones

por las bacterias acetogénicas, están, el formato y compuestos metilados, principalmente metanol (Diekert y Wohlfarth, 1994).

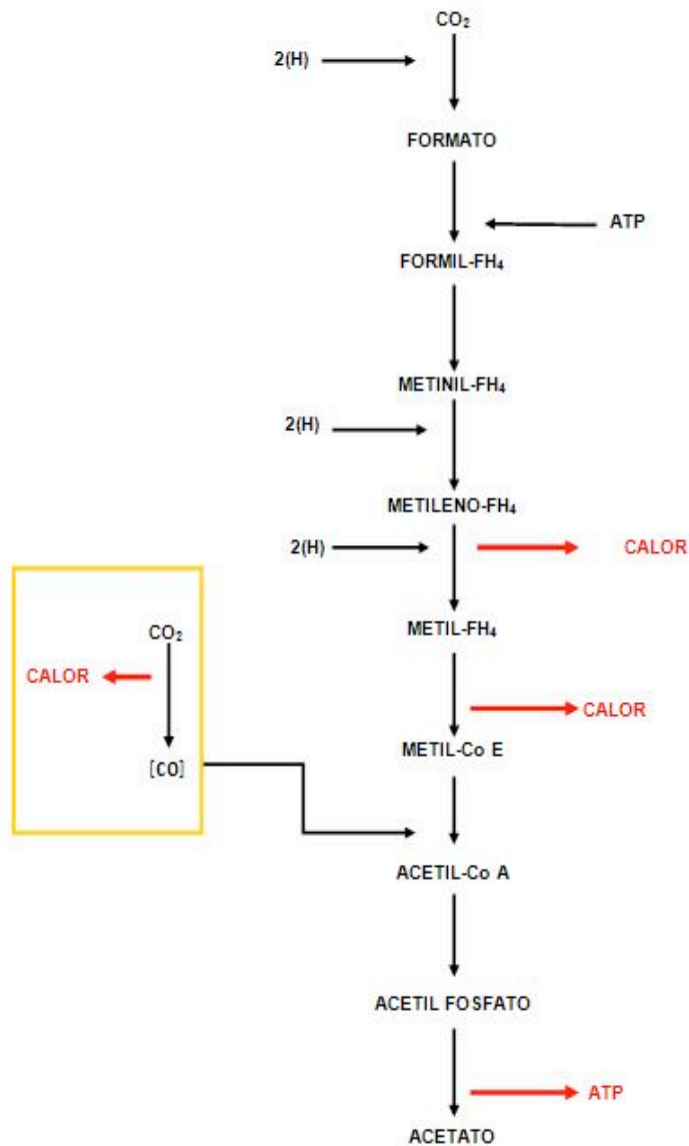


Figura 2. Síntesis de acetato por la vía de Acetil-CoA (adaptada de Diekert y Wohlfarth, 1994).

Genthner *et al.* (1981) aislaron la bacteria ruminal *Eubacterium limosum* utilizando como agente reductor al metanol. También se ha reportado que la bacteria *Acetitomaculum ruminis* puede producir acetato vía crecimiento autotrófico utilizando formato como donador de electrones (Leedle y Greening, 1988; Le Van *et al.*, 1998). En el cuadro 2, se indican algunos sustratos utilizados como intermediarios de la ruta Acetil-CoA (Mandigan *et al.*, 2002; Diekert y Wohlfarth, 1994), para la síntesis de acetato.

Cuadro 2. Energía de activación de la metanogénesis y la acetogénesis con varios sustratos como fuente de energía.

Ruta metabólica	Sustrato	Ecuación estequiométrica	Δg° (kj mol ⁻¹)
Acetogénesis	H y CO ₂	$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	-104.6
Acetogénesis	CO	$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2CO_2$	-165.6
Acetogénesis	CH ₃ OH	$4CH_3OH + 2CO_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 7H^+ + 4H_2O$	-71
Metanogénesis	H ₂ y CO ₂	$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-135.6

Adaptada de Diekert y Wohlfarth, 1994; McAllister y Newbold, 2008.

2.6. Componentes de medio de cultivo usados para el aislamiento de bacterias acetogénicas ruminales.

La ruta metabólica del acetil-CoA necesita coenzimas y cofactores para realizar la síntesis de acetato. Por lo tanto, la adición de vitaminas del complejo B y soluciones de microminerales, fueron constantes en todas las investigaciones reportadas. Así, Genthner *et al.* (1981) utilizó un medio de cultivo modificado, con base en el de McInerney *et al.* (1979), para el aislamiento de *Eubacterium limosum*, una bacteria ruminal acetogénica, adicionando Se, Ni, Zn y Fe en la solución micromineral. Mientras que, la solución de vitaminas hidrosolubles contenía biotina, ácido fólico, hidrocloreuro de piridoxal, ácido lipóico, riboflavina, pantotenato de calcio, cianocobalamina, ácido paraminobenzóico y ácido nicotínico. Otros autores (Greening y Leedle, 1989; Rieu-Lesme *et al.*, 1995; Le Van *et al.*, 1998; y López *et al.*, 1999) han utilizado estas mezclas microminerales y vitamínicas con mínimas modificaciones. Otra característica común es que todos los medios de cultivo usados en estos estudios, contienen líquido ruminal en diferentes dosis (5-30 mL por cada 100 mL de medio); con excepción de las bacterias acetogénicas que fueron aisladas de otros ambientes anaerobios, como *Acetitomaculum woodii* cepa ATCC 29683, aislada de aguas residuales, en donde se usó extracto de levadura en lugar de líquido ruminal clarificado (Lorowitz y Bryant, 1984; Le van *et al.*, 1998).

Considerando que las bacterias metanogénicas usan los mismos sustratos (CH₄ y CO₂) de manera más eficiente para la síntesis de energía que las bacterias acetogénicas, los medios de cultivo para aislar bacterias acetogénicas deben incluir inhibidores de metanogenos. Se ha usado el ácido 2-bromoetanol sulfónico (BESA)

(Rieu-Lesme *et al.*, 1995; Le Van *et al.*, 1998) y la 9, 10-antraquinona (García *et al.*, 1996) como inhibidores de la ruta metanogénica en medios de cultivo axénicos para aislamiento de bacterias acetogénicas. Sin embargo, estos compuestos son altamente tóxicos y su manejo es delicado. Una alternativa es el uso del cloramfenicol, un antibiótico de fácil obtención, el cual fue utilizado por Akin y Benner (1988) para inhibir la metanogénesis en medio de cultivo para bacterias ruminales. El cloramfenicol fue el primer antibiótico de amplio espectro descubierto y utilizado en medicina humana. Este compuesto fue aislado de una cepa de *Streptomyces venezuelae*, encontrada en el suelo de Venezuela en 1947. En la actualidad se obtiene sintéticamente y su estructura es compleja, químicamente es un derivado del ácido dicloroacético, con un grupo proprandiol que le confiere actividad antiinfecciosa, una cadena dicloroacetamida, un grupo benceno y un grupo nitro en posición “*para*” del anillo benzénico (Figura 3). El modo de acción del cloramfenicol hacia los microorganismos es bacteriostático, al inhibir la multiplicación bacteriana. Su mecanismo de acción comienza al entrar al citoplasma bacteriano por difusión facilitada, bloqueando la parte terminal de los substratos aminoacil-ARN-transportadores al sitio aceptor de la peptidil transferasa de la subunidad ribosomal 50S (Escolar-Jurado *et al.*, 1998), con lo cual impide la elongación de la cadena peptídica y por lo tanto se bloquea la síntesis proteínica bacteriana (Wisseman *et al.*, 1954; Escolar *et al.*, 1998). El cloramfenicol es el antibiótico que presenta mayor actividad frente a microorganismos anaerobios (Escolar *et al.*, 1998). Por tanto, se recomienda su uso en medios selectivos para el aislamiento de bacterias acetogénicas.

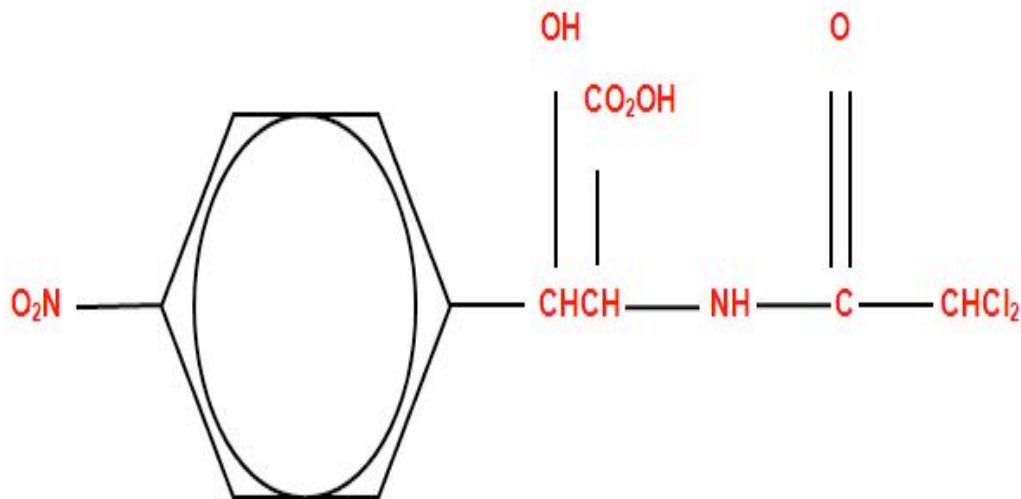


Figura 3. Estructura química del cloramfenicol (Escolar-Jurado *et al.*, 1998).

Además de las bacterias acetogénicas, no se tiene información científica sobre otro tipo de bacteria ruminal o de otro ecosistema anaerobio, con capacidad para usar H⁺ y CO₂. Por tanto, el asilamiento de una bacteria ruminal acetogénica para su posterior inoculación, resulta una alternativa viable para disminuir la emisión de gas CH₄ en los rumiantes, sin que se afecte negativamente la salud del animal o de otros microorganismos ruminales. Además, las bacterias acetogénicas, a diferencia de las bacterias metanogénicas, producen un ácido graso volátil (acetato) que contribuye a cubrir los requerimientos energéticos del rumiante, lo que se reflejaría en un aumento en la eficiencia productiva del animal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar *in vitro* una bacteria ruminal acetogénica y evaluar su capacidad para disminuir la metanogénesis.

3.2. Objetivos específicos

- Formular un medio de cultivo selectivo a base de formato, líquido ruminal y cloramfenicol para el aislamiento de al menos una bacteria ruminal acetogénica.
- Evaluar el método de liofilización para conservar la bacteria aislada.
- Determinar algunas características morfológicas y metabólicas de la bacteria aislada.
- Determinar la capacidad de crecimiento *in vitro* de la bacteria aislada en un medio de cultivo anaeróbico enriquecido con glucosa.
- Evaluar la capacidad de degradar formato *in vitro* por la bacteria aislada, en un medio de cultivo con formato y líquido ruminal (F-LR).
- Determinar *in vitro*, la capacidad de la bacteria aislada para disminuir la producción de metano y aumentar la producción de acetato, en cultivo axénico o en cocultivo con bacterias ruminales.
- Identificar taxonómicamente a la bacteria con base en la secuenciación del gen ARN ribosomal 16S.

4. HIPÓTESIS

- Es posible aislar una bacteria acetogénica del rumen de ovinos en un medio de cultivo anaerobio que contiene formato como fuente de energía y cloramfenicol como inhibidor de bacterias metanogénicas.
- La bacteria aislada tiene la capacidad de producir acetato a partir de formato.
- La bacteria aislada, en cocultivo con bacterias ruminales, disminuye la producción de metano y aumenta la producción de acetato *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa en Ganadería, del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

5.1. Aislamiento y conservación de la bacteria

5.1.1. Obtención de la fuente de inóculo

Para el aislamiento de bacterias acetogénicas, se usó líquido ruminal de un ovino adulto alimentado con paja de avena y concentrado. El líquido ruminal se colectó 3 h después de la alimentación matutina; se extrajo 150 mL de líquido ruminal (pH 6.9) de la parte media ventral del rumen, usando una sonda esofágica (Figura 4). El líquido ruminal se filtró a través de una tela de manta y se almacenó a 38 °C hasta el momento de su uso.



Figura 4. Obtención del líquido ruminal por medio de una sonda esofágica.

5.1.2. Aislamiento en medio de cultivo selectivo

En el Cuadro 3 se da la composición del medio de cultivo anaerobio selectivo que se uso para el aislamiento inicial de bacterias ruminales acetogénicas. Por su composición, el medio fue denominado medio formato-líquido ruminal (F-LR) y se preparo 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 F-LR y se incubaron a 39°C por 48 h para comprobar esterilidad. Posteriormente, se inoculó por quintuplicado, 1 mL del líquido ruminal fresco en los tubos de cultivo con el medio F-LR. La inoculación se realizo en una campana de flujo laminar vertical marca Labconco, en condiciones asépticas y bajo flujo de CO₂, una vez realizada la inoculación, los tubos de cultivo se incubaron durante 72 h a 39 °C.

Los tubos de cultivo que desarrollaron mayor turbidez (3 de 5) fueron seleccionados para trasferir, bajo flujo de CO₂, 1 mL en 9 mL de medio fresco F-LR (por triplicado), y se incubaron a 39 °C durante 72 h. Al final del periodo de incubación, se repitió el proceso de selección con base a la turbidez desarrollada. De los medios de cultivo seleccionados, se transfirió 1 mL en 9 mL de medio F-LR, y se incubaron a 39 °C durante 72 h. Los tubos de cultivo que presentaron mayor turbidez fueron seleccionados para continuar el proceso de aislamiento bacteriano en medio sólido.

Cuadro 3. Composición del medio de cultivo selectivo F-LR usado para el aislamiento de la bacteria 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
Solución vitamínica (mL) ⁴	1.0
Resarzurina 1 % (mL) ⁵	0.1
Extracto de levadura (g)	0.2
Carbonato de sodio 8 % (mL) ⁶	7.0
Solución cisteína – sulfito de sodio (mL) ⁷	2.0
Acetato de sodio (g)	0.1
Formato de sodio (g)	1.0
Cloranfen® (mL) ⁸	0.1

(1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 12,000 rpm 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 (Bryant y Robinson, 1961).

(4) Contiene 2 mg ácido fólico; 0.072 mg cianocobalamina; 5 mg hidroxicobalamina; 0.4 g ascorbato de calcio; 0.194 g mononitrato de tiamina; 20 mg riboflavina; 20 mg rutina en 100 mL de H₂O.

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

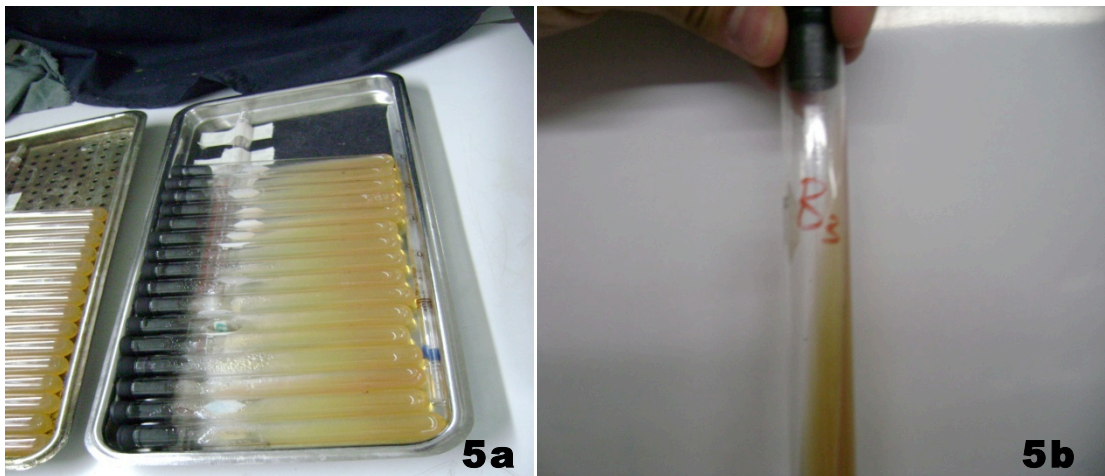
(6) 8 g de carbonato de sodio en 1000 mL de agua destilada.

(7) 2.5g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH); 2.5 g de Na₂S·9H₂O y 0.1 de resarzurina en un vol. final de 100 mL.

(8) 100 mL de Cloranfen® equivalen a 3.165 g de cloramfenicol levógiro.

5.1.3. Aislamiento y cultivo en medio sólido

El medio de cultivo sólido tuvo la misma composición del medio F-LR (cuadro 3), más 2 g de agar bacteriológico por cada 100 mL de medio. En tubos de cultivo de 18 x 150 mm se depositaron 7 mL de medio F-LR sólido y se colocaron en una posición horizontal hasta que se solidificaron (Figura 5a y 5b). Esta forma de preparar medio de cultivo sólido fue una modificación a la técnica del tubo rodado (Hungate, 1969), denominada técnica del tubo horizontal reportada por Guerra (2004) para el aislamiento de microorganismos ruminales. Esta técnica muy similar a la técnica conocida como agar inclinado o “slants”. El medio de cultivo con agar se depositó procurando que el medio de cultivo se solidificara en forma casi horizontal, con un ángulo de 165° aproximadamente para evitar el contacto con el tapón de hule de los tubos de cultivo.



Figuras 5a y 5b. Medio de cultivo F-LR sólido en tubo horizontal usado para el aislamiento de la bacteria acetogénica ruminal.

Los medios de cultivo se incubaron a 39°C durante 48 h para comprobar esterilidad. Posteriormente, fueron sembrados con la última transferencia obtenida del proceso

de aislamiento en medio F-LR líquido, usando un asa bacteriológica estéril, por el método de estriado (Harrigan y McCance, 1979). La inoculación se realizó en una campana de flujo laminar Labconco, modelo Purifier Class II® para evitar la contaminación de los medios de cultivo y bajo flujo de CO₂. Después de 72 h de incubación a 39 °C, se observaron las colonias desarrolladas en un microscopio de contraste Olympus modelo BX51 a una magnificación total de 1000X y se tomaron fotografías de las colonias bacterianas.

Con la finalidad de obtener cultivos axénicos, se seleccionaron las colonias que crecieron aisladamente en el medio sólido F-LR y se inocularon de manera individual en medio líquido F-LR por 72 h a 39 °C. El proceso de reinoculación en medio líquido y resiembra en medio sólido F-LR, se repitió hasta que se logró el crecimiento de un solo tipo de bacteria en los medios líquidos (cultivo axénico). Esto se logró después de cuatro transferencias.

5.1.4. Conservación del cultivo axénico por liofilización y viabilidad del producto

El cultivo axénico de la bacteria aislada fue conservado por liofilización (Barbosa y Vega, 2000) (Figura 6a, 6b y 6c). Se tomó una muestra de la bacteria aislada con un asa bacteriológica a partir de una colonia crecida en el medio sólido F-LR y se inoculó en ocho viales serológicos de 100 mL que contenían 30 mL de medio líquido F-LR estéril. Los viales se incubaron durante 48 h a 39 °C alcanzando una concentración de 10⁸ bacterias mL⁻¹. Los viales se congelaron a -4 °C durante 24 h. 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 -50 °C, y una presión de -0.060 mBar durante 24 h, al término de la liofilización, los viales fueron sellados con tapas de aluminio y almacenados a temperatura ambiente. La cantidad de liofilizado obtenido fue de $20.21 \pm 3.2 \text{ mg mL}^{-1}$ de medio de cultivo. Para estimar la viabilidad de la masa bacteriana liofilizada, se hidrató 1 g de masa bacteriana liofilizada en 9 mL de medio durante una hora; posteriormente, se determinó la concentración de bacterias por mililitro de medio de cultivo por el método de número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979), para lo cual, se inoculó por triplicado 1 mL de material hidratado en 9 mL de medio de cultivo F-LR fresco, se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} y se incubaron durante 48 h a 39 °C.



Figuras 6a, 6b, y 6c. Proceso de liofilización la bacteria aislada, en medio de cultivo líquido: a) vial congelado con la bacteria aislada en medio de cultivo F-LR, b) vista lateral de vial y liofilizadora, c) producto almacenado.

5.2. Pruebas bioquímicas y morfológicas

5.2.1. Morfología colonial y bacteriana, tinción Gram, y prueba catalasa.

Para determinar características morfológicas de la bacteria aislada, se realizaron siembras en cajas Petri que contenían 15 mL del medio F-LR sólido estéril. Las cajas Petri se colocaron en una jarra de anaerobiosis, se agregó un sobre de GasPack para crear un ambiente anaerobio y se incubaron a 39 °C durante 48 h. Posteriormente se realizaron pruebas de tinción Gram, catalasa, y morfología colonial y bacteriana (Harrigan y McCance, 1979). Para la morfología colonial, se midió el diámetro, aspecto, coloración, elevación y bordes de las colonias usando una lupa del equipo para contar colonias. La tinción Gram se realizó con el kit de la compañía Hycel de México[®] S. A. de C. V. Para caracterizar la morfología bacteriana y tinción Gram, se observaron frotis en un microscopio de contraste Olympus modelo BX51[®] a una magnificación total de 1000X y se tomaron fotos digitales con una cámara Evolution VF[®] adaptada al mismo. La prueba de catalasa se realizó directamente sobre colonias desarrolladas en las cajas de Petri agregando una gota del reactivo Merck[®] para prueba de catalasa.

5.2.2. Determinación de la viabilidad bacteriana aislada en medio de cultivo F-LR enriquecido con glucosa

Se inoculó por quintuplicado 1 mL del cultivo bacteriano aislado en tubos de cultivo de 18 x 150 mm que contenía 9 mL de medio de cultivo F-LR enriquecido al 2 % de glucosa, y se comparó la concentración bacteriana, con un tratamiento testigo que no incluía glucosa en el medio de cultivo F-LR. El conteo de bacterias se realizó a 24, 48 y 72 h de incubación, por método directo usando una cámara Petroff-Hausser y un microscopio de contraste de fases marca Olympus modelo BX51 a una

magnificación total de 1000X. Posteriormente se reinoculó el cultivo resultante en medio F-LR, y se evaluó su capacidad de crecer nuevamente con formato como fuente principal de energía, por medio de la técnica de NMP (Harrigan y McCance, 1979) a 48 y 72 h de incubación a 38 °C.

5.2.3. Análisis de los datos

Se usó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento; las variables analizadas fueron concentración bacteriana por el método directo y concentración bacteriana por el método de NMP. Los tratamientos evaluados fueron: medio de cultivo F-LR enriquecido con glucosa y medio de cultivo F-LR como tratamiento testigo..

Para el análisis del experimento se utilizó el procedimiento de MIXED de SAS® (1998). Las opciones para la estructura de covarianza se determinó individualmente a cada variable: concentración bacteriana por método directo y concentración bacteriana por NMP. Para ambas variables se utilizó la función log(1) de SAS para hacer transformaciones logarítmicas. Presentándose los datos en sus unidades originales.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + d_{ij} + t_k + (\delta t)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = variable respuesta.

μ = media general.

δ_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento.

d_{ij} = efecto aleatorio asociado con la j-ésimo tubo de cultivo en el i-ésimo tratamiento.

t_k = efecto del k-ésimo periodo.

$(\delta t)_{ij}$ = efecto fijo de la interacción del i-ésimo tratamiento con el k-ésimo periodo.

ε_{ijk} = error aleatorio asociado con el j-ésimo tubo de cultivo en el i-ésimo tratamiento al k-ésimo periodo.

5.3. Determinación *in vitro* de la concentración de formato y ácidos grasos volátiles (AGV) en medio de cultivo selectivo inoculado con la bacteria acetogénica aislada o con bacterias ruminales.

5.3.1. Rehidratación del cultivo liofilizado de la bacteria acetogénica aislada.

Antes de iniciar cualquier ensayo microbiológico, se activo la masa bacteriana liofilizada por medio de su hidratación. Para lo cual, se adicionaron 0.5 g de liofilizado de la bacteria aislada en un tubo de cultivo de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo líquido F-LR y se incubo por 2 h a 39 °C.

5.3.2. Inoculación de tubos de cultivo

Se extrajeron 100 mL de fluido ruminal fresco (FRF) de una vaca fistulada alimentada con ensilado de maíz, heno de alfalfa y concentrado para vacas lecheras. El FRF se extrajo 3 h después de la alimentación y se filtró a través de tres capas de una tela de manta. Este líquido ruminal fue usado como inóculo y se denominó cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR).

Se determinó la concentración bacteriana del CMBR (10^9 bacterias mL^{-1}) y del cultivo de la bacteria ruminal acetogénica (BRA) rehidratado (10^8 bacterias mL^{-1}) con una cámara Petroff-Hausser y un microscopio de contraste de fases de la marca Olympus, modelo BX51 a una magnificación total de 1000X. Con el objetivo de iniciar el estudio con una concentración bacteriana similar (10^8 bacterias mL^{-1}) entre los dos inoculos (CMBR y BRA) se diluyó 1 mL del FRF en 9 mL de medio de cultivo F-LR. Posteriormente, se inoculó por quintuplicado para cada tiempo de incubación (0, 24, 48 y 72 h) 1 mL del fluido ruminal fresco que contenía 10^8 bacterias ruminales mL^{-1} denominado cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR); otra serie de tubos se inoculó con 1 mL del inóculo de la bacteria acetogénica (BRA) asilada. Ambas inoculaciones se realizaron en tubos de cultivo de 18 x 150 mm con 9 mL de medio F-LR. Siendo la concentración inicial de ambos tratamientos, 10^7 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo. Finalmente, se colocaron en incubación a 39 °C, junto con un tratamiento blanco sin inocular (BLA).

5.3.3. Determinación de la concentración bacteriana a 0, 24, 48 y 72 h de incubación

La concentración bacteriana se midió por método directo en una cámara Petroff-Hausser y un microscopio de contraste de fases marca Olympus, modelo BX51 a una magnificación total de 1000X. Las bacterias se fijaron con formaldehído al 18.5 % (2 mL de medio de cultivo en 2 mL de formaldehído). Se contaron 10 cuadros de 0.05 x 0.05 x 0.02 mm de la cámara Petroff-Hausser, para determinar la media (\bar{X}). La concentración de bacterias por mL del medio de cultivo se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias mL}^{-1} = X * \text{FD} * 2 \times 10^7$$

Donde:

X = Promedio de células por tratamiento por tiempo.

FD = Factor de dilución.

5.3.4. Determinación de concentración molar de formato

Al terminar cada periodo de incubación (0, 24, 48 y 72 h) se agitaron los tubos de cultivo de cada tratamiento (CMBR, BRA y BLA), para homogenizar su contenido, se extrajeron 1.5 mL, se depositaron en viales de 2.0 mL y se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su análisis. Para el análisis, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm, durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se diluyo 1/100 en agua destilada. La concentración de formato se determino en un espectrofotómetro UV-Visible con lámpara de tungsteno marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 40, a 510 nm (Anexo 2) siguiendo la metodología descrita por Sleat y Mah (1984).

5.3.5. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles

Después de 0, 24,48 y 72 h de incubación, se transfirieron 1.5 mL de cada una de las muestras en viales de 2.0 mL que contenían 0.375 mL de ácido metafosfórico al 25 %, se mezclaron con ayuda de un vortex y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se colocó en viales para cromatografía. La concentración AGV se determinó en un cromatógrafo de Gases Perkin Elmer modelo Clarus 500[®] con automuestreador y una columna capilar Elite FFAP. Las condiciones usadas fueron: velocidad del gas acarreador

nitrógeno, 15 mL min^{-1} ; volumen de inyección, $1 \mu\text{L}$ de muestra; temperaturas de inyector, detector y horno, 200, 250 y $140 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente y un tiempo total de corrida de 5 min (Pérez, 2006).

5.3.6. pH del medio de cultivo a diferentes tiempos de incubación

Se midió el pH en los tubos de cultivo de cada tratamiento y repetición a los cuatro tiempos de incubación (0, 24, 48 y 72 h), se uso un potenciómetro marca Orion, modelo 250A calibrado a dos puntos (4.0 y 7.0).

5.3.7. Análisis de los datos

Se uso un diseño experimental completamente al azar para tres tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento; las variables analizadas fueron la concentración de formato, acetato, propionato, butirato y pH, y la concentración de bacterias por mL de medio de cultivo. Los tratamientos evaluados fueron: inculo de bacteria ruminal acetogénicas (BRA), inculo de un cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR), y un tratamiento blanco, con medio de cultivo sin inocular (BLA).

Para el análisis del experimento se utilizó el procedimiento de MIXED de SAS[®] (1998). La estructura de covarianza se determinó individualmente a cada variable: concentración de formato = UN; concentración de acetato = CS; concentración de propionato = VC; concentración de butirato = VC; concentración bacteriana = UN; pH = AR(1).

Además para la variable concentración bacteriana se utilizó la función $\log(1)$ de SAS para hacer transformaciones logarítmicas de los datos, presentándose en sus unidades originales.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + d_{ij} + t_k + (\delta t)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = variable respuesta.

μ = media general.

δ_i = efecto fijo del i-ésimo tratamiento.

d_{ij} = efecto aleatorio asociado con la j-ésimo tubo de cultivo en el i-ésimo tratamiento.

t_k = efecto del k-ésimo periodo.

$(\delta t)_{ij}$ = efecto fijo de la interacción del i-ésimo tratamiento con el k-ésimo periodo.

ε_{ijk} = error aleatorio asociado con el j-ésimo tubo de cultivo en el i-ésimo tratamiento al k-ésimo periodo.

5.4. Producción *in vitro* de CH₄, CO₂ y AGV de la bacteria ruminal acetogénica (BRA) sola o en cocultivo con un cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR)

5.4.1. Rehidratación del inóculo liofilizado de la bacteria acetogénica asilada

Para reactivar la bacteria ruminal acetogénica (BRA) conservada por liofilización, se inoculó 1 g del liofilizado en 9 mL de medio de cultivo F-LR y se incubó por 2 h a 39 °C. Posteriormente, se inoculó 1 mL de rehidratado bacteriano en ocho tubos de cultivo de 18 x 150 mm que contienen 9 mL de medio de cultivo F-LR

y se incubaron durante 48 h a 39 °C, ó hasta obtener una concentración de 10^8 bacterias mL^{-1} .

5.4.2. Inoculación y montaje del sistema de producción de gas *in vitro*.

Para estimar la producción de gas *in vitro* del la BRA sola o en cocultivo con CMBR, se uso una dieta integral para ovinos que contenía sorgo, maíz amarillo, pasta de soya, heno de avena y alfalfa deshidratada (Cuadro 4). La dieta se formuló para cubrir los requerimientos de ovinos en finalización (NRC, 1985).

Se usaron 20 viales serológicos de 100 mL, a los cuales se les adicionaron 0.5 g (aproximadamente) de la dieta integral para ovinos. Se registró el peso exacto y se esterilizaron los viales con el sustrato a 125 °C y 15 psi, durante 15 min.

Después de esterilizar los viales, se les adicionó, 45 mL de medio de cultivo para bacterias totales, en el Cuadro 5 se da la composición de este medio de cultivo. El medio se agregó bajo flujo de CO_2 para mantener la anaerobiosis de los medios y en una campana de flujo laminar vertical, marca Labconco. Los viales fueron sellados con tapones de plástico y tapas de aluminio, y fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta su inoculación.

El fluido ruminal (FR) usado como inoculo CMBR, se colecto de una vaca Holstein fistulada en el rumen, alimentada con ensilado de maíz y concentrado para ganado lechero. La concentración de bacterias en el FR fue superior a 10^{11} bacterias por mL y se diluyo en un medio de cultivo para bacterias totales (Cuadro 5), hasta una concentración de 10^7 células mL^{-1} de FR, para igualar la concentración inicial de bacterias entre los inoculos BRA y CMBR.

Cuadro 4. Dieta integral para ovinos en finalización.

Ingrediente ¹	% de inclusión (en base seca)
Sorgo	40
Maíz amarillo	10
Pasta de soya	10
Heno de avena	30
Alfalfa deshidratada	10

¹ Los ingredientes fueron molidos hasta un tamaño de partícula ≤ 1.0 mm.

La inoculación se realizó por quintuplicado con jeringas estériles desechables en viales que contenían 45 mL del medio. Se inocularon 5 mL del inóculo de la BRA, del CMBR, o de una mezcla formada por 2.5 mL de CMBR más 2.5 mL de BRA (CMBR+BRA). Además, se colocó un tratamiento testigo sin inocular (BLA). En todos los tratamientos, con excepción del tratamiento BLA, la concentración inicial bacteriana fue de 10^6 bacterias mL^{-1} de medio de cultivo.

Cada vial de cultivo fue conectado mediante una manguera de tygon, de 40 cm de largo y 5 mm de diámetro, a un vial serológico de 100 mL, que se uso como trampa salina y estaba lleno en su totalidad (sin espacio de cabeza), con una solución de NaCl al 40 % (peso/vol) y 0.5 % de anaranjado de metilo (vol/vol) acidificada ($\text{pH} \leq 2$) con HCL 2N. Las trampas de solución salina contaban con una válvula de alivio para igualar la presión atmosférica. La manguera de tygon fue asegurada con una pinza para evitar pérdidas de gas antes del montaje del sistema de producción de gas *in vitro* (Figura 7).

Los viales de cultivo de BRA, CMBR, CMBR+BRA y BLA, se colocaron en un baño María y se incubaron a 39 °C, mientras que, su respectiva trampa salina se colocó fuera de incubación, invertida sobre una probeta de 50 mL. El sistema de producción de gas *in vitro* fue cubierto con un plástico negro para evitar la entrada de luz.

5.4.3. Producción de CO₂ y CH₄

Se registró el volumen de solución salina desplazada después de 0 a 72 h de incubación. Posteriormente, se almacenaron las trampas salinas en refrigeración a 4 °C hasta su análisis. Cubriendo con papel parafilm la septa, evitando así la pérdida de biogás. La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en base al área de pico obtenida en el cromatógrafo de gases PerkinElmer, modelo Clarus 500, con detector de conductividad térmica (TCD) y columna empacada Porapak. Se usaron las siguientes condiciones: volumen de inyección, 0.1 mL de muestra; gas acarreador, helio a una velocidad de 25 mL min⁻¹; temperatura de horno, 28 °C por 1 min, con una rampa de 2.5 °C min⁻¹ hasta 35 °C; temperatura del TCD, 130 °C, con 5.62 mV de amperaje, y temperatura del inyector, 170 °C.

La producción de CO₂ y CH₄ *in vitro*, fue calculada con base a la ley de los gases ideales de Boyle (Buchner y Doyle, 1976), a partir de los datos obtenidos por el desplazamiento del líquido contenido en las trampa de biogas y la proporción de metano y bióxido de carbono obtenida por cromatografía de gases.

Cuadro 5. Componentes del medio de cultivo para bacterias totales sin fuente de energía.

Componente	Cantidad por 100 mL de medio
------------	------------------------------

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

¹ Líquido ruminal fresco previamente filtrado en manta cielo, centrifugado a 23,000 x g durante 15 min, esterilizado a 15 psi y 121 °C.

² Contiene (por cada 1000 mL) K₂HPO₄, 6.0 g.

³ Contiene (por cada 1000 mL) KH₂PO₄, 6.0 g; (NH₄)₂SO₄, 6.0 g; NaCl, 12.0 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl · 2H₂O, 1.6 g.

⁴ 2.5 g de L-cisteína (disuelto en 15 mL de NaOH 2N) más 2.5 g de Na₂S · 9H₂O. La mezcla es aforada en 100 mL de agua destilada y esterilizada a 121 °C por 20 min.



Figura 7. Sistema de producción de gas *in vitro*.

5.4.4. Degradabilidad *in vitro* de MS

Después de las 72 h de incubación se filtró la materia seca (MS) no degradada o residual en papel Whatman 514 de 12 cm de diámetro; para la filtración, se usó un

equipo de filtración con bomba de vacío, el residuo recuperado en los filtros de papel, se secaron a 70 °C durante 24 h en una estufa Riostar, México y finalmente, se pesaron en una balanza analítica para estimar por diferencia entre el peso de la MS inicial y final, el porcentaje de la MS degradada.

5.4.5. Concentración de bacterias totales

Para determinar la concentración de bacterias totales a 72 h de incubación, se utilizó el método directo en un microscopio de contraste de fases marca Zeiss y una cámara para conteo de bacterias Petroff-Hausser. Las bacterias se fijaron en una solución de formaldehído al 18.5 % (3 mL en 1 mL de la solución de fijadora), posteriormente, debido a la alta concentración bacteriana en los medios de cultivo (BRA, CMBR y BRA+CMBR), se diluyó 1 mL de la solución anterior en 4 mL de H₂O destilada.

La concentración bacteriana en los diferentes medios de cultivo se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde:

X: Promedio de células por tratamiento por tiempo.

FD1: Primer factor de dilución (4).

FD2: Segundo factor de dilución (5)

5.4.6. Concentración de bacterias celulolíticas

La concentración de bacterias celulolíticas se estimó por método del NMP (Harrigan y McCance, 1979) después de 72 h de incubación en los medios de cultivo

inoculados con BRA, CMBR y BRA+CMBR. La prueba se realizó por duplicado con diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} , en tubos de cultivo de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo para bacterias totales (Cuadro 5) y una tira de papel Whatman 541 de 0.5 x 2.0 cm. Tres series de tubos de cultivo (por duplicado), se inocularon con 0.5 mL de los medios de cultivo para BRA, CMBR y BRA+CMBR que contenían 10^6 bacterias por ml y se incubaron a 39 °C durante 7 d. Se consideró como crecimiento positivo de bacterias celulolíticas a aquellos tubos de cultivo que presentaron degradación de la tira de papel después de los 7d de incubación.

5.4.7. Concentración de bacterias utilizadoras de formato

La concentración de bacterias utilizadoras de formato se realizó por el método de NMP (Harrigan y McCance, 1979). El estudio se realizó por duplicado con diluciones de 10^{-1} a 10^{-12} . Se usaron tubos de cultivo de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo F-LR (Cuadro 3). Tres series de tubos de cultivo (por duplicado) se inocularon con 0.5 mL de los medios de cultivo para BRA, CMBR y BRA+CMBR que contenían 10^6 bacterias por ml y se incubaron a 39 °C durante 72 h. Se consideró como crecimiento positivo a todos los tubos de cultivo que desarrollaron turbidez.

5.4.8. Concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV se determinó después de 72 h de incubación, en los viales inoculados con BRA, CMBR y BRA+CMBR. Para cada vial, 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 %. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min y 4 °C, y se transfirió el sobrenadante en viales para cromatografía de gas.

La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases, marca PerkinElmer, modelo Clarus 500[®] con columna capilar Elite FFAP. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: velocidad de gas acarreador nitrógeno, 15 mL min⁻¹; volumen de inyección, 1 µL de muestra; temperatura de inyector, 200 °C; temperatura de detector, 250 °C; temperatura de horno, 140 °C. Con un tiempo total de corrida de 5 min (Pérez, 2006).

5.4.9. pH del medio de cultivo

El pH se determinó con un potenciómetro Orion modelo 240A calibrado a dos puntos (4.0 y 7.0).

5.4.10. Análisis de los datos

El análisis de los datos se realizó mediante el programa de SAS[®] (1998). Se usó un diseño experimental completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento; las variables analizadas fueron: concentración de CO₂, CH₄, degradación *in vitro*, pH, concentración de bacterias totales, celulolíticas y formatotróficas, y concentración de formato, acetato, propionato y butirato.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: bacteria ruminal acetogénica (BRA), cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR), bacteria ruminal acetogénica + cultivo mixto de bacterias ruminales (BRA+CMBR) y un tratamiento blanco sin inocular (BLA).

Para las variables concentración de bacterias totales, concentración de bacterias formatotróficas se utilizó la función $\log(1)$ de SAS para hacer transformaciones logarítmicas de los datos, presentándose en sus unidades originales.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_i = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_i = variable respuesta.

μ = media general.

τ_j = efecto del J-ésimo tratamiento.

ε_{ij} = error experimental.

5.5. Identificación molecular mediante el gen ARN ribosomal 16S

5.5.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de la bacteria acetogénica aislada se realizó a partir bacterias crecidas durante 24 a 48 h en un medio de cultivo F-LR inoculado, con una concentración de 10^8 bacterias mL^{-1} . Se siguió la metodología propuesta por Ahrens y Seemüller (1992) modificados por Rojas (1998) (Anexo 1).

5.5.2. Amplificación del gen ARN ribosomal 16S

Para la amplificación del gen ARN ribosomal 16S se utilizaron los iniciadores, Forward Oligo 27F y Reverse 1492R a una concentración de $10 \mu\text{mol mL}^{-1}$. Las

secuencias de los oligonucleótidos son 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' y 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3', los cuales amplifican aproximadamente 1500 pares de bases (pb).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μL , la mezcla de reacción fue 5 μL de amortiguador 5X, 2 μL de dNTP's, 2 μL de MgCl_2 50 mM, 0.4 μL de Flexi Taq polimerasa (Promega®) y 10 μL de ADN bacteriano. La amplificación del ADD se realizó en un termociclador Biometra; las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de pre-desnaturalización de 5 min a 94 °C; seguido de desnaturalización por 40 seg a 94 °C; acoplamiento por 1 min a 52 °C; elongación por un minuto a 72 °C, los tres pasos anteriores se repitieron por 29 ciclos más; y finalmente un ciclo de post-elongación de 7 min a 72 °C, para terminar a 4 °C.

La confirmación de la amplificación se realizó con 5 μL de producto PCR y 5 μL de ADN escalera de 100 pb que se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 %. Los fragmentos amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con 1.66 μL de bromuro de etidio 100 mL^{-1} y amortiguador TBE al 0.5 % a 75 V por 30 min. La amplificación se confirmó en un fotodocumentador Gene Wizard®.

Los fragmentos amplificados se limpiaron con el kit de limpieza para PCR QIAquick PCR Purification® de Quiagen siguiendo la metodología del proveedor.

5.5.3. Análisis de la secuencia e identificación de la bacteria ruminal acetogénica

Las muestras fueron enviadas al Instituto de Biotecnología y Síntesis de la Universidad Autónoma de México en Cuernavaca, Estado de Morelos, México. De los resultados obtenidos se depositó la secuencia en el Gen-Bank NCBI

(www.ncbi.nlm.nih.gov, 2008) tomándose la bacteria con la secuencia con mayor porcentaje de pariedad.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención del cultivo puro, caracterización morfológica y bioquímica

6.1.1. Proceso de aislamiento

El uso del medio selectivo F-LR y de transferencias entre medios líquidos y sólidos, resulto muy efectivo para el aislamiento de bacterias utilizadoras de formato. Al final del proceso de aislamiento en medios selectivos, se obtuvieron dos bacterias morfológicamente distintas, un bacilo Gram+ y un coco Gram+ (Figura 8a y 8b). Sin embargo, el bacilo presentaba una endoespora, característica del género *Clostridium* spp (Bergey, 1994b). Aunque existen especies acetogénicas de éste género; también las hay patógenas (Mandigan *et al.*, 2002), por tanto, se decidió eliminarla del proceso de aislamiento.

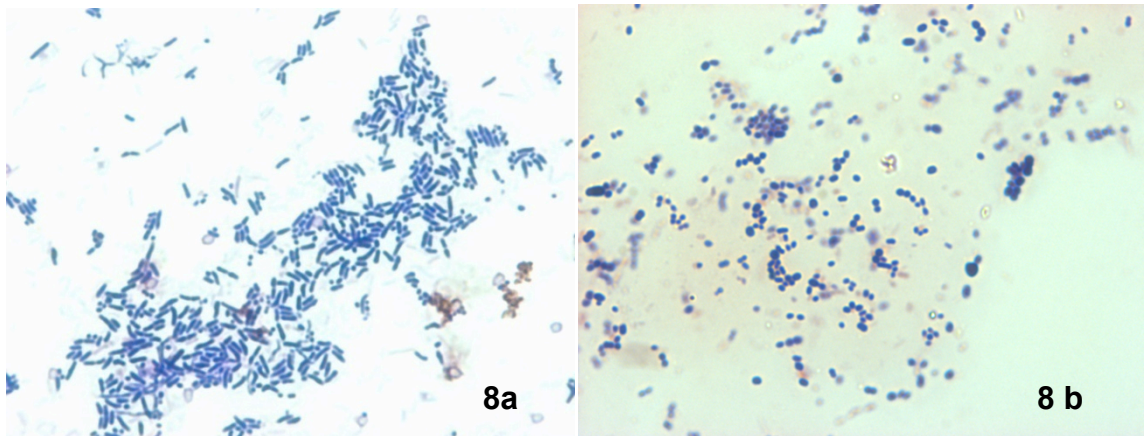


Figura 8a y 8b. Morfologías bacterianas encontradas durante el proceso de aislamiento.

6.1.2. Concentración de bacterias viables del cultivo puro

El éxito en la preservación de cultivos microbianos es esencial en actividades de investigación o industriales. El principal objetivo de un método de conservación

bacteriana, es mantener la integridad y viabilidad microbiana (Stanbury *et al.*, 1995; Zamora, 2003).

Después de la activación cultivo puro liofilizado de la bacteria acetogénica aislada, se determinó una concentración de 1.5×10^8 bacterias viables g^{-1} de liofilizado a 48 h de incubación. De acuerdo con el intervalo de confianza calculado con la técnica del NMP, la concentración mínima y máxima que puede obtenerse es 3.2×10^7 a 7.02×10^8 células g^{-1} de liofilizado. Usando un proceso de liofilización similar para otras bacterias ruminales, Cobos *et al.* (2004) y Piloni (2008) obtuvieron un concentración bacteriana muy superior, de entre 10^{11} y 10^{12} bacterias g^{-1} de liofilizado; por tanto, se debe investigar sobre factores pueden mejorar la producción de masa bacteriana por gramo de liofilizado.

6.1.3. Caracterización morfológica del cultivo puro

Las características morfológicas del cultivo puro se muestran en el Cuadro 6. Un resultado importante, es que, la bacteria aislada resultó negativa a la prueba de catalasa. Lo que indica que el microorganismo es anaerobio estricto, ya que la catalasa es una enzima, que contienen los organismos aerobios y anaerobios facultativos, para reducir los radicales libres del oxígeno (O_2) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producido en el metabolismo del O_2 en ambientes aerobios (Lehninger *et al.*, 1993; Mandigan *et al.*, 2002).



Figura 9. Morfología colonial de la bacteria aislada en medio de cultivo selectivo anaerobio.

Cuadro 6. Características morfológicas de la bacteria aislada.

Morfología colonial	Características
Forma	Circular
Tamaño	Irregular
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslúcida
Color	Crema claro
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Forma del borde	Entero
Aspecto	Húmeda
Consistencia	Suave
Morfología celular	Coco
Catalasa	-
Tinción Gram	+

6.1.4. Concentración bacteriana en medio de cultivo enriquecido con glucosa 2%

En el rumen el crecimiento de los microorganismos es directamente proporcional al contenido de adenosin trifosfato (ATP) generado por el catabolismo de los compuestos energéticos consumidos por el rumiante (Isaacson *et al.*, 1974). Los azúcares simples como la glucosa son la principal fuente de energía utilizada por los microorganismos ruminales; sin embargo, en el ecosistema ruminal existen interacciones metabólicas entre microorganismos, en la cuales, el desecho metabólico de unos, es utilizado como sustrato o nutriente por otros (Baldwin y Allison, 1983). Así, algunas bacterias utilizan selectivamente compuestos intermediarios de la fermentación de carbohidratos, generados por otras bacterias. La concentración bacteriana del cultivo aislado en medios F-LR enriquecidos con glucosa fue estadísticamente igual ($p>0.05$) en los cuatro tiempos de incubación (Cuadro 7) a la concentración observada en el tratamiento testigo donde sólo se utilizó formato como fuente de energía. Sin embargo, en el tratamiento testigo la concentración bacteriana llegó a 10^8 bacterias mL^{-1} a las 48 h de incubación, mientras que en el medio enriquecido con glucosa, se logró una concentración similar hasta las 72 h de incubación. Por lo que se determina que la bacteria aislada, a diferencia de la mayoría de las bacterias ruminales, usa con mayor eficiencia el formato en lugar de la glucosa como principal fuente de energía.

Al transferir la bacteria crecida en un medio de cultivo enriquecido con glucosa, a un medio de cultivo con formato (F-LR) se presentó un crecimiento $\geq 10^8$ células mL^{-1} de medio de cultivo. Lo que indica que la bacteria mantiene su capacidad para usar formato como fuente de energía para su crecimiento. Aunque se debe mencionar,

que solamente se realizó una transferencia. Una prueba más rigurosa debe incluir al menos cinco transferencias en medio F-LR enriquecido con glucosa, antes de transferir a un medio F-LR.

Cuadro 7. Concentración bacteriana en medio de cultivo F-LR y F-LR enriquecido con glucosa al 2 %

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
GLU 2%	3.45×10^7 ^{a, y**}	8.55×10^7 ^{a, x}	9.60×10^7 ^{a, x}	1.17×10^8 ^{a, x}
F-LR	2.60×10^7 ^{a, z**}	7.80×10^7 ^{a, y}	1.17×10^8 ^{a, x}	1.59×10^8 ^{a, x}
EEM	0.018	0.026	0.021	0.021

GLU 2% = Medio de cultivo F-LR enriquecido con 2% (peso/vol) de glucosa. F-LR = Medio de cultivo a base de formato y líquido ruminal. ^{a, b} Muestra diferencias estadísticamente significativas en columna. ^{x, y, z} Muestra diferencias estadísticas significativas en hilera ($p \geq 0.05$). ** Altamente significativo ($p \geq 0.01$).

6.2. Determinación *in vitro* de la degradación de formato y concentración de AGV

6.2.1. Concentración bacteriana y pH del medio de cultivo F-LR

La concentración bacteriana en el rumen oscila entre 10^{10} y 10^{11} células g^{-1} de contenido ruminal (Yokoyama y Johnson, 1988); mientras que, en los cultivos *in vitro* la concentración es menor. En esta prueba la concentración inicial de todos los tratamientos fue de 10^7 células mL^{-1} de medio de cultivo. En el tratamiento inoculado con el cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR), la concentración bacteriana

aumentó a 1.11×10^8 células mL^{-1} a las 48 h de incubación, y a las 72 h de incubación, disminuyó hasta una concentración de 6.90×10^7 , que es similar a la concentración inicial (3.90×10^7 bacterias mL^{-1}). En contraste del tratamiento inoculado con la bacteria ruminal acetogénica (BRA), se observó un crecimiento bacteriano constante a través del tiempo, alcanzando una concentración de 1.41×10^8 células mL^{-1} de medio de cultivo a las 72 h de incubación (Cuadro 8).

La capacidad amortiguadora de los bicarbonatos y fosfatos presentes en la saliva del rumiante, mantienen el pH entre 6 y 7 en condiciones normales de fermentación (Yokoyama y Johnson, 1988). Sin embargo, en sistemas cerrados de fermentación, el pH desciende debido a la acumulación de ácidos orgánicos en el medio y la saturación de los sistemas amortiguadores que componen los medios de cultivo. En este estudio, el pH en el medio de cultivo de todos los tratamientos inició con 6.58 a las 0 h de incubación, mientras que el valor más alto y más bajo se observó a las 72 h de incubación, en el tratamiento BRA 6.92 y en el tratamiento CMBR 6.46, respectivamente. Tanto el valor inicial del pH del medio, como el determinado a las 72 h de incubación en ambos inoculos, están dentro del rango normal de pH para la actividad y crecimiento de microorganismos ruminales (Yokohama y Johnson, 1998). Por tanto, se puede decir que, los cambios tanto en la concentración de bacterias por mililitro de medio de cultivo y en el pH, no fueron afectados negativamente por la presencia de formato en los medios de cultivo.

Cuadro 8. Concentración bacteriana y pH a diferentes tiempos de incubación en medio de cultivo F-LR

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Concentración de bacterias mL ⁻¹ del medio de cultivo F-LR.				
BRA	2.70 x 10 ^{7 b, z}	8.25 x 10 ^{7 a, y}	1.34 x 10 ^{8 a, x}	1.41 x 10 ^{8 a, x}
CMBR	3.90 x 10 ^{7 a, z}	9.90 x 10 ^{7 a, xy}	1.11 x 10 ^{8 a, x}	6.90 x 10 ^{7 b, y}
EEM	0.0240	0.0332	0.0243	0.0275
pH de medio de cultivo F-LR.				
BA	6.58 ^{a, x}	6.72 ^{a, x}	6.72 ^{a, x}	6.92 ^{a, x**}
CMBR	6.58 ^{a, x}	6.49 ^{a, x}	6.47 ^{a, x}	6.46 ^{b, y}
EEM	0.063	0.063	0.063	0.063

BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR = cultivo mixto de bacterias ruminales. ^{a,b,c} Muestran diferencias estadísticas significativas en columna. ^{x,y,z} Muestran diferencias estadísticas significativas en fila ($p \geq 0.05$). ^{**} Altamente significativo ($p \geq 0.01$).

6.2.2. Concentración de formato y AGV en medio de cultivo selectivo F-LR

Únicamente, la bacteria ruminal acetogénica (BRA) disminuyó ($p \leq 0.05$) la concentración inicial de de formato (187 mM), a partir de las 24 h de incubación (163 mM), disminuyendo hasta 107 mM a las 72 h de incubación. Tanto en el inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales (CMBR), como en el blanco (BLA) la concentración de formato se mantuvo igual en los cuatro periodos de incubación

(Cuadro 9). Lo que indica que el cultivo puro de la BRA aislada, utilizo parte del formato presente en el medio de cultivo, como fuente de energía para su mantenimiento y crecimiento. El formato es un compuesto orgánico intermediario en la ruta acetil-CoA (Mandigan *et al.*, 2002), y es un sustrato que puede ser utilizado tanto para metanogénesis (Zeikus, 1977; Shauer *et al.*, 1982) como para acetogénesis (Le Van *et al.*, 1998). Diferentes bacterias utilizadoras de formato han sido encontradas en ambientes anaerobios, incluyendo rumen e intestino de humanos. Greening y Leedle (1989) aislaron y caracterizaron una bacteria del rumen de bovinos alimentados con una dieta alta en forrajes, utilizando un medio de cultivo gasificado con H^+ y CO_2 , los autores lograron cultivar la bacteria aislada en medios de cultivo con formato como única fuente de energía y observaron una producción de acetato. También Wolin *et al.* (2003), aisló una bacteria del contenido intestinal humano, que depende de formato para lograr un buen crecimiento *in vitro*, y cuyo principal producto de fermentación es el acetato. Los mismos autores determinaron un aumento proporcional en la concentración de acetato (10, 23.1 y 70.3 mmol) en relación con la disponibilidad de formato en el medio de cultivo (0, 4.8 y 27.8 mmol). Con relación a la producción de AGV, la concentración de acetato presenta un claro aumento ($p \leq 0.05$) con el inóculo de BRA principalmente a 72 h (Figura 10; Cuadro 10) de incubación, a diferencia de los tratamientos CMBR y BLA (42.45 vs 38.03 y 39.03 mmol L^{-1}), donde se mantuvo la concentración de acetato sin cambios ($p > 0.05$) en los cuatro periodos de incubación. Considerando la degradación de formato y la síntesis de acetato (Cuadro 9 y 10) se estima que la bacteria aislada produce acetato a partir de formato, ya que la disminución de la concentración de formato coincide con la máxima producción de acetato, lo que se ve más evidente a las 72 h de

incubación. También se determinó que la producción de acetato es nula en el CMBR cuando se incuba en un medio de cultivo F-LR. Por lo anterior, se deduce que en el líquido ruminal deben existir bacterias ruminales acetogénicas, pero que su concentración debe de ser mínima, así como la transformación de formato a acetato.

Cuadro 9. Concentración de formato (mM) en medio de cultivo F-LR.

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
BRA	187 ^{a,x}	163 ^{a,xy}	157 ^{b,y}	107 ^{b**,z**}
CMBR	187 ^{a,x}	193 ^{a,x}	190 ^{a,x}	210 ^{a,x}
BLA	190 ^{a,x}	190 ^{a,x}	208 ^{a,x}	187 ^{a,x}
EEM	0.003	0.005	0.006	0.005

BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR = cultivo mixto de bacterias ruminales; BLA = medio de cultivo F-LR sin inocular. ^{a,b} Muestran diferencias estadísticas significativas en columna. ^{x,y,z} Muestran diferencias estadísticas significativas en fila ($p \geq 0.05$). ^{**} Altamente significativo ($p \geq 0.01$).

Cuadro 10. Concentración de acetato (mM L⁻¹) en medio de cultivo F-LR

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
BRA	37.38 ^{b,y}	39.52 ^{b,y}	38.27 ^{b,y}	42.45 ^{a**,x**}
CMBR	37.84 ^{a,x}	37.70 ^{a,x}	39.08 ^{a,x}	38.03 ^{b,x}
BLA	37.74 ^{a,x}	37.21 ^{a,x}	37.84 ^{a,x}	39.03 ^{b,x}
EEM	0.734	0.734	0.734	0.734

BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica aislada; CMBR = cultivo mixto de bacterias ruminales; BLA = medio de cultivo F-LR sin inocular. ^{a,b} Muestran diferencias estadísticas significativas en columna. ^{x,y} Muestran diferencias estadísticas significativas en fila ($p \geq 0.05$). ^{**} Altamente significativo ($p \geq 0.01$).

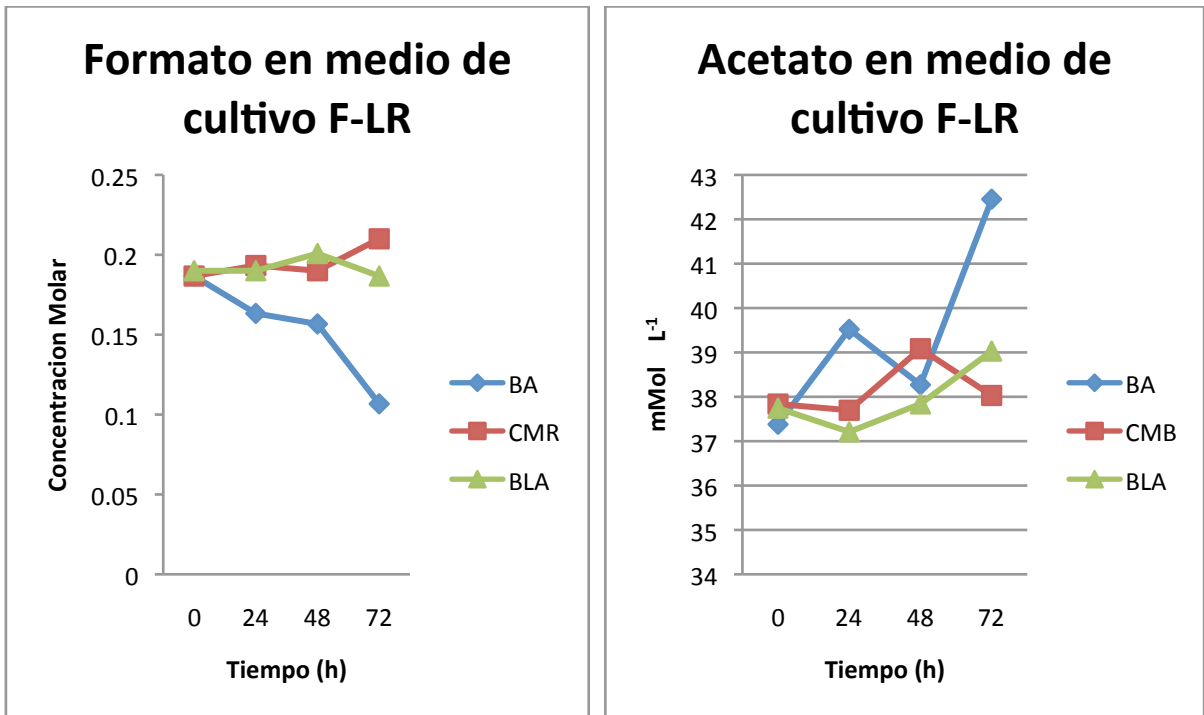


Figura 10. Concentración de formato y acetato en medio de cultivo F-LR a 0, 24, 48 y 72 h de incubación. BRA = inóculo de bacteria pura aislada; CMBR = cultivo mixto de bacterias ruminales; BLA = medio de cultivo sin inocular.

La producción de propionato fue mayor ($p \leq 0.05$) en el tratamiento BRA, en comparación con los tratamientos CMR y BLA (20.98 vs 15.84 y 15.15 mmol L⁻¹) a las 72 h de incubación (Cuadro 11). Greening y Leedle (1989) aislaron y caracterizaron cinco cepas de *Acetitomaculum ruminis*, y reportan que las bacterias aisladas aumenta ligeramente la cantidad de propionato en medio de cultivo sin fuentes de energía, con un 5 % de líquido ruminal clarificado y presurizado con una fase gaseosa de H₂ y CO₂. Sin embargo, el propionato es un AGV que generalmente no ha sido reportado como producto final de la fermentación en bacterias acetogénicas, más bien, se ha reportado la producción de succinato (Genther *et al.*, 1981; Bergey, 1994c; Begey, 1994d; Rieu-Lesme *et al.*, 1995; Wolin *et al.*, 2003). De acuerdo a Stainer *et al.* (1996), es posible la producción metabólica de propionato a

partir de succinato en ambientes anaerobios, mediante en una ruta metabólica denominada aleatoria. En este estudio no se determinó la concentración de succinato en los medios de cultivo, pero el aumento en la concentración de propionato observada en el medio de cultivo con BRA puede ser explicado con base en esta ruta metabólica.

Desde el punto de vista de eficiencia productiva del rumiante, este aumento en la producción de propionato mostrado por la BRA, es benéfico para el metabolismo energético del rumiante, ya que el propionato producido en el rumen puede ser absorbido y en el hígado se sintetiza glucosa partir de este, lo cual se refleja directamente en mayor producción de leche y carne (Church, 1988). El resultado obtenido, cubre una de las principales expectativas sobre el uso de un inóculo de bacterias acetogénicas. Esto es, además de disminuir la producción de metano, aumenta la eficiencia energética de la ración, en benéfico para el animal hospedante.

Cuadro 11. Concentración de propionato (mM L^{-1}) en medio de cultivo F-LR.

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
BRA	14.54 ^{a,z}	16.01 ^{a,z}	18.77 ^{a,y}	20.98 ^{a,x}
CMBR	14.59 ^{a,x}	14.87 ^{a,x}	15.61 ^{b,x}	15.84 ^{b,x}
BLA	14.41 ^{a,x}	14.41 ^{a,x}	15.58 ^{b,x}	15.15 ^{b,x}
EEM	0.33	0.33	0.33	0.33

BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR = cultivo mixto de bacterias ruminales; BLA = medio de cultivo F-LR sin inocular. ^{a,b} Muestran diferencias estadísticas significativas en columna. ^{x,y,z} Muestran diferencias estadísticas significativas en fila ($p \leq 0.05$).

La producción de butirato (Cuadro 12) fue mayor ($p \leq 0.05$) en el tratamiento BRA que con CMBR y BLA a 48 h de incubación (7.41 vs 5.78 y 5.71 mmol L⁻¹). Mientras que a las 72 h de incubación fue ligeramente mayor en el tratamiento CMBR en comparación con BRA (9.94 Vs 8.19 mmol L⁻¹).

El butirato es un AGV que normalmente aumenta su concentración *in vitro* al inocular bacterias acetogénicas. Greening y Leedle (1989) demostraron que cinco cepas asiladas de *Acetitomaculum ruminis* aumentan ligeramente la concentración de butirato en medios de cultivo gasificadas con H₂ y CO₂ (fuentes de energía) más 5 % de líquido ruminal clarificado.

En general el tratamiento testigo BLA no tuvo diferencias significativas a través del tiempo, en la concentración de formato, acetato, propionato y butirato; esto debido a que no fue inoculado y por lo tanto no hubo fermentación.

Cuadro 12. Concentración de butirato (mM L⁻¹) en medio de cultivo F-LR.

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
BRA	5.35 ^{a,z}	6.65 ^{a,y}	7.41 ^{a,x}	8.19 ^{b,w}
CMBR	5.18 ^{a,x}	5.51 ^{b,x}	5.78 ^{b,x}	9.94 ^{a,w}
BLA	5.21 ^{a,w}	5.33 ^{b,w}	5.71 ^{b,w}	5.72 ^{c,w}
EEM	0.12	0.12	0.12	0.12

BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR = cultivo mixto de bacterias ruminales; BLA = medio de cultivo F-LR sin inocular. ^{a,b,c} Muestran diferencias estadísticas significativas en columna. ^{w,x,y,z} Muestran diferencias estadísticas significativas en fila ($p \geq 0.05$).

6.3. Producción *in vitro* de CH₄, CO₂, y AGV de la bacteria ruminal acetogénica sola o en cocultivo con CMBR

6.3.1. Concentración bacteriana y pH en medio de cultivo para bacterias ruminales.

En esta prueba se utilizó un medio para bacterias totales (Cuadro 5) donde la fuente de energía fue proporcionada por una dieta integral (Cuadro 4) en la cual no se incluía formato como parte de sus componentes. Por tanto, el crecimiento de bacterias utilizadoras de formato a 72 h de incubación fue mínimo en los inoculos CMBR y BRA (2.14×10^2 y 8.98×10^2 células mL⁻¹). Sin embargo, en cocultivo, BRA+CMBR, aumentó la concentración de bacterias utilizadoras de formato (1.95×10^5 células mL⁻¹). Lo que sugiere que la bacteria ruminal acetogénica aislada, interacciona positivamente con bacterias ruminales. El presente estudio, no se identificó ninguna bacteria ruminal que pudiera estar interactuando con la BRA. Pero, hay reportes que indican, que la mayoría de las bacterias ruminales que fermentan los carbohidratos de la ración, producen como desecho formato, H₂ y CO₂, los cuales pueden ser usados por bacterias metanogénicas o acetogénicas para su crecimiento (Cobos, 2007). Este tipo de interacción explicaría el aumento en la concentración de bacterias utilizadoras de formato que se observó en el tratamiento BRA-CMBR).

Las bacterias celulolíticas también se encontraron en mayor concentración ($p \leq 0.05$) a 72 h de incubación en el cultivo mixto (BRA+CMBR) en comparación con el CMBR (2.42×10^6 vs 8.86×10^4 células mL⁻¹). El inóculo de BRA no presentó crecimiento en el medio usado para conteo de bacterias celulolíticas, lo que indica que esta bacteria no tiene actividad celulolítica.

La mayor concentración de bacterias celulolíticas en el tratamiento BRA+CMBR, se atribuye a que en cocultivo, la BRA usó el formato, H⁺ y el CO₂ producido en la

fermentación anaerobia de compuestos orgánicos (Muller, 2003), evitando así una caída del pH, lo que no sucedió o fue menos eficiente en el tratamiento CMBR. La suposición anterior se sustenta por el hecho de que, el pH después de 72 h de incubación fue de 6.73 y 6.41 en el cultivo BRA+CMBR y CMBR. Las bacterias celulolíticas son sensibles a un pH ácido y su actividad disminuye cuando el pH ruminal es menor a 6.2; por tanto, su interacción con bacterias que eviten la acidificación del pH ruminal es benéfica para su crecimiento y actividad (Yokoyama y Johnson, 1988).

La concentración de bacterias totales fue similar ($p>0.05$) entre los tratamientos CMBR y CMBR+BRA: En el tratamiento BRA no se detectó ningún crecimiento bacteriano (bacterias totales); cabe aclarar, que la técnica usada para medir la concentración de bacterias totales, fue por conteo directo en la cámara Petroff-Hausser, y que esta técnica solo permite la contabilización de microorganismos, cuando su concentración es de al menos 10^6 bacterias por ml de muestra. Los resultados obtenidos, indican que la interacción entre bacterias ruminales (CMBR) y la bacteria aislada (BRA), no afecta negativamente la concentración total de bacterias, pero cambia el tipo de poblaciones microbianas, favoreciendo el crecimiento de bacterias ruminales acetogénicas, utilizadoras de formato y de bacterias celulolíticas.

Cuadro 13. Concentración bacteriana (células mL⁻¹) y pH en los medios de cultivo a las 72 h de incubación.

Tratamiento	Utilizadoras de formato	Celulolíticas	Totales	pH ²
CMBR	2.14 x 10 ^{2 b}	8.86 x 10 ^{4 b}	3.10 x 10 ^{9 a}	6.21 ^c
BRA	8.98 x 10 ^{2 b}	0.00 ^c	0.00 ^{b 1}	6.73 ^a
CMBR+BRA	1.95 x 10 ^{5 a}	2.42 x 10 ^{6 a}	3.26 x 10 ^{9 a}	6.41 ^b
EEM	0.133	0.082	0.002	0.007

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

¹La técnica utilizada, está limitada a concentraciones mínimas de 10⁶ bacterias mL⁻¹.

² pH inicial del medio de cultivo = 6.92. CMBR = inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales; BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR+BRA = inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales + bacteria ruminal acetogénica.

6.3.2. Concentración de AGV, degradación de materia seca y producción de CH₄ y CO₂ en medio de cultivo con una dieta de finalización para ovinos como sustrato.

La degradación de MS a las 72 h de incubación fue similar ($p > 0.05$) entre los tratamientos CMBR y CMBR+BRA (60.84 vs 60.51 %). Mientras que, el inóculo de la BRA, presentó la más baja degradación de materia seca ($p \leq 0.05$), presentando solo un 25.39 % de degradación de la MS. Lo que indica que la bacteria acetogénica aislada (BRA), actúa de manera secundaria en la degradación de la MS. Lo que confirma que la BRA aislada interactúa con otras bacterias ruminales usando

metabolitos finales de la fermentación de los carbohidratos como son formiato, CO₂ e H⁺.

Los resultados obtenidos indican una actividad de degradación de regular a buena considerando que la dieta contenía 40 % de forraje. Ya que, en estudios realizados con una dietas altas en grano (sorgo) y concentrado se han obtenido valores de DIVMS de entre 48.8 y 70.6% (Durán *et al.*, 2004) y 76.87-80.92% (Montañez *et al.*, 2006). La baja DIVMS observada en el tratamiento inoculado con BRA indica que esta bacteria tiene una baja capacidad para degradar y fermentar los carbohidratos estructurales, de reserva y proteínas contenidas en la dieta usada como sustrato en el medio de cultivo (Cuadro 4).

Al calcular la producción de biogás a 72 h de incubación se determinó lo siguiente: La producción de CO₂ es estadísticamente similar ($p>0.05$) para los tratamientos CMBR y CMBR+BRA (3.97 vs 3.63 mmol). Mientras que en el tratamiento BRA no se registró producción del biogás (Cuadro 14), esto es un reflejo de la baja DIVMS que se observo con la BRA.

Con relación a la producción de CH₄ en el tratamiento CMBR se observó una mayor producción en comparación con CMBR+BRA (4.23 vs 1.41 μ mol). Lo anterior indica que la adición de la bacteria acetogénica (BRA) en un cultivo con bacterias ruminales (BRA+CMBR) disminuye la síntesis de metano un 66%. Cifra mucho mayor a la reportada por Lopez *et al.* (1999) en un estudio *in vitro*, en donde observó una disminución de tan solo 5 % en la producción de CH₄, con la adición de dos especies bacterianas acetogénicas: *Eubacterium limosum* ATCC 8486 y bacteria no identificada Ser 5, aislada de un cordero. Los mismos autores reportan que se puede lograr un mayor disminución en la producción de metano (51 %), cuando se adiciona

ácido bromoetanol sulfónico (BESA) al cultivo de *E. limosum* ATCC 8486, un inhibidor específico de bacterias metanogénicas. Cabe recalcar que el medio de cultivo utilizado (Cuadro 5) no contenía ningún inhibidor de bacterias metanogénicas, por lo que, se estima que la bacteria acetogénica asilada tiene una alta capacidad para competir con bacterias metanogénicas por el CO₂ y el H⁺.

La nula producción de biogás (CO₂ y CH₄) en los medios de cultivo inoculados con BRA, a pesar de que hubo un mínimo porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca (25.39 %), puede indicar que el método usado para medir producción de biogás, quizás, la cantidad de biogás producido, no fue suficiente para desplazar la solución salina de la trampa (ver materiales y métodos, sección 5.4.3).

Cuadro 14. Degradación de MS (%), producción de CO₂ (mmol) y CH₄ (μmol) en la fermentación *in vitro* de una dieta integral para ovinos.

Tratamiento	DIVMS	CO ₂	CH ₄
CMBR	60.84 ^a	3.97 ^a	4.23 ^a
BRA	25.39 ^b	0.0 ^b	0.0 ^c
CMBR+BRA	60.51 ^a	3.63 ^a	1.41 ^b
EEM	0.778	0.156	0.279

^{a, b, c} Literales diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$). DIVMS= degradabilidad *in vitro* de la materia seca; CO₂ = producción total de bióxido de carbono; CH₄ = producción total de metano. CMBR = inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales; BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR+BRA = inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales + bacteria ruminal acetogénica.

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre la concentración de AGV a las 72 h de incubación (Cuadro 15), no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en la producción de acetato en los tratamientos BRA+CMBR y CMBR (25.82 vs 27.43 mol L⁻¹), mientras que para BRA la producción fue mínima (3.94 mol L⁻¹). En lo que respecta a propionato tampoco hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre BRA+CMBR y CMBR (45.28 vs 44.19); en tanto BRA sólo produjo 0.82 mol L⁻¹. Sin embargo, la concentración de butirato en el cocultivo de la bacteria aislada con bacterias ruminales (BRA+CMBR) fue estadísticamente mayor ($p\leq 0.05$) que las bacterias ruminales (CMBR) y la bacteria ruminal acetogénica sola (BRA) (6.61 vs 4.79 y 0.38 mol L⁻¹).

Cuadro 15. Concentración de AGV (mol L⁻¹) producido por la fermentación de una dieta de finalización para ovinos a las 72 h de incubación.

Tratamiento	Acetato	Propionato	Butirato
CMR	27.43 ^a	44.19 ^a	4.70 ^b
BA	3.94 ^b	0.82 ^b	0.38 ^c
CMR+BA	25.82 ^a	45.28 ^a	6.61 ^a
EEM	0.844	0.123	0.019

^{a, b, c} Literales diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ($p \leq 0.05$). CMBR = inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales; BRA = inóculo de bacteria ruminal acetogénica; CMBR+BRA = inóculo de cultivo mixto de bacterias ruminales + bacteria ruminal acetogénica.

En el tratamiento BRA+CMBR se produjo la misma cantidad de acetato y propionato que CMR ($p>0.05$). Sin embargo, BRA+CMBR supero al CMBR en la síntesis de butirato. Un resultado similar se ha reportado en otras bacterias acetogénicas, como, *E. limosum* (Bergey's, 1994c) y *Peptostreptococcus productus* (Bergey's, 1994d), las cuales producen butirato, utilizando como sustrato al mismo acetato. Así, la bacteria aislada tienen la capacidad de reducir una mayor cantidad de electrones, ya que el butirato también requiere H_2 para su síntesis (Moss *et al.*, 2000; Carmona *et al.*, 2005), esto puede explicar el mayor pH determinado en los medios de cultivo inoculados con bacterias ruminales y la bacteria ruminal acetogénica (BRA+CMBR; Cuadro 13). Una ruta metabólica que explica esta suposición fue reportada por Hartmanis y Gatenbeck (1984), en la Figura 11, se puede observar la producción de butirato a partir de acetyl-CoA.

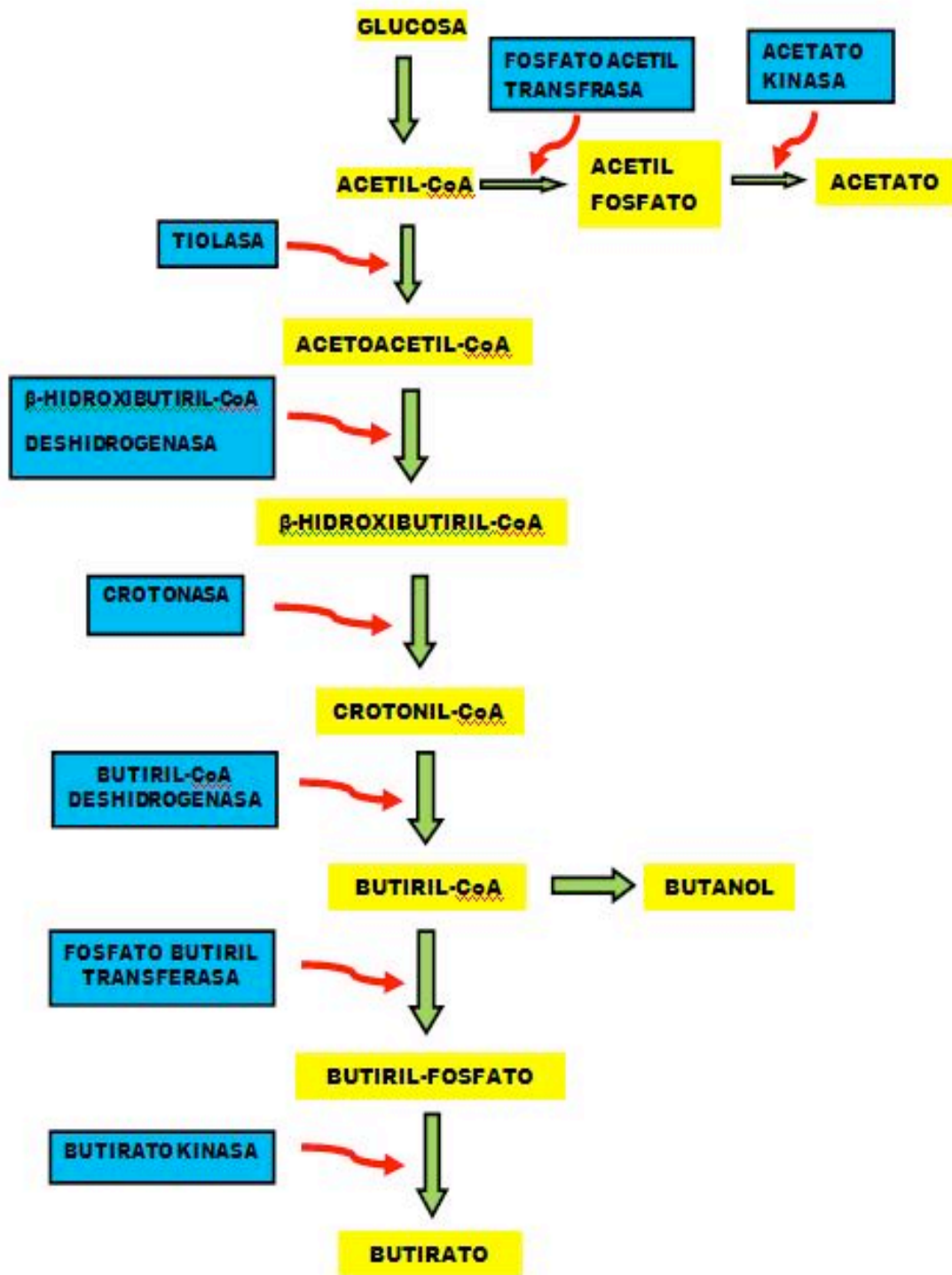


Figura 11. Ruta metabólica para la síntesis de butirato a partir de Acetil-CoA (Adaptada de Hartmanis y Gatenbeck, 1984).

6.4. Identificación molecular en base al gen ARN ribosomal 16S

El ARN ribosomal es el fragmento del genoma de las bacterias que cuenta con aproximadamente de 1500 pb (Miyajima *et al.*, 2002; Janda y Abbot, 2007; Piloni, 2008). Se ha usado para identificar cepas bacterianas aisladas de diferentes ambientes, debido a que la subunidad 16S del gen ARN ribosomal, contiene regiones altamente variables entre especies bacterianas (Murray *et al.*, 1999), pero a su vez, es una región que se conserva a través del tiempo en las siguientes generaciones de una misma especie bacteriana (Mandigan *et al.*, 2002). En este estudio, se determinaron dos secuencias de la bacteria aislada. (Figura 11a y 11b). Al realizarse la primera extracción y secuenciación de la bacteria aislada se obtuvieron 1,176 pb que se introdujeron en la base de datos del GenBank registrándose un 96 % de pariedad con la bacteria *Pantoea agglomerans* (FJ357811). Sin embargo las características morfológicas y de tinción Gram no coincidieron con la bacteria ruminal acetogénica aislada, ya que, *Pantoea agglomerans* es un bacilo Gram- y fitopatogena (Bergey, 1994e), mientras que la bacteria aislada es un coco Gram+. Por lo tanto, se realizó un segundo procedimiento de identificación molecular, en el cual se obtuvo una secuencia de 1125 pb que registraba 90% de pariedad con una bacteria del epitelio ruminal no cultivable (AM884100.1), reportada por Sadet *et al.* (2007). Sin embargo, los autores no indican las características morfológicas o metabólicas de la bacteria; solamente ingresaron la secuencia obtenida. Por tanto, no se sabe por el momento, si la bacteria acetogénica aislada comparte otras características con la cepa AM884100.1, además de la secuencia genética.

CGAGGTGAGGGTGACCTGGTATAAATTTACCGAGGGTTAAGCTTCCTACT
TCTTTTGAACCCACTCCCATGGGGTGACGGGGGGTGTACAAAGGCCCG
GGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGAC
TTCATGGAGTCCAGTTGCAAGCTCCGATCCGGACTACGACGCACCTTATG
AGGTCGGCTTGGCTCCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCTGGTCTGAAGGCCATGATGACTTGACGTCACTCCCC
ACCTTCTCCGGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAAT
CGCTGGCAACAAAGGATAAGGTTGCGCTC GTTGGCGGAC TTAACCAAC
ATTTACAACACGAGCTGAC GAC AGCCATGCAAGCCTGTCTC ACAGTTC
CCGAAGGCACCAAGCATCTCTGCCAAATTC GTGGATGCAAGACTAGG
TAAGTTCCTTCCGCTGACATCGAAT TAAACCAC ATGC TCCACCGCTTGTG
CGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTGGCGCCGTACTCCCA
GGCGGTGACTTAAACGCTTACGCTCCGAAAGCCACTCTC AAGGGAACAA
CCTCCAAGTGCACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGTCTCCCAACGCTTTCGACCTGAGCGTCACTGTTTGTCCAGGGGGC
CGCTTCCGACCGGATTCCTCCAGATCTC TACGC ATTTACCGCTTACA
TATTACCGCGCTGCTGGCAGGAGTTAGCCGGGTGCTTCTTGGCGGT
AACGTCAAATCGATGTGGCTTATTAACCTGCAATCGACTTTCCTCACCGC
CTGGAAGGACTGTTACTACCTC GAAAC GACGTTCCCTCAGTACACCGG
GCATTGACCTTGAAGTCAAGGCTTTGTCTGCCCCATTTTGGTGC
(FORWARD)
GGAATGCGTCCGGCCCTGACCTTAAATTTACCAAGGC TAAATCCTACTT
CTTTTGAACCCACTCCATGGGGTGACGGGGGGTGTACAAAGGCCCG
GAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCAGGATTACTAGCGATTCCGACT
TCACGGAGTCCAGTTGCAAGCTCCGATCCGACTACGACGCACCTTATGA
GGTCCGCTTGGCTCCGCGAGATCGCTTCTTTGTATGCGCCATTGTAGC
ACGTGTGAGCCCTGGCTGTAAGGGCCATGATGACTTACGCTATCCCA
CCTTCTCCGGTTTATCACCGGAGTCTCCTTTGAGTCCCGGCCAACC
GCTGGCAACAAAGGATAAGGTTGCGCTC GTTGGCGGACTTAAACCAAC
TTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC ACCTGTCTCACAGTTC
CGAAGGCACCAATGCATCTCTGCCAAATTC GTGGATGTC AAGAAGCAGGT
AAGGTTCTTCCGCTGCAATC GAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGC
GGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTGGCGCCGTACTCCCAAG
CGGCTGACTTAAACGCTTAACTCC GGAAGCC ACTCCTCAAGGCAACAAC
CTCCAAGTGCACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTG
TTTGTCTCCCAACGCTTTCGACCTGAGCGTCACTTGTGTCAGGGGGC
GCCTTCCGACCGGATTCCTCCAGATCTC TACGC ATTTACCGCTTACAC
CTGGAATTCACCCCTCTACGAGACTCAAGCCTGCCAGTTTCAAATGC
AGTTCCCAAGTAAAGACCCGGGGGATAATTCACATCCGACTTTAACAAGA
AACGCCCTGCGTGGCGCTTTTACACCCAGTAAATCTGAAATATAAAGC
TTGGACCCCTCCCGTATTACCCGCGCTGCTGTGCACGGAAATGATA
CCGGTGGCGTTCTTTCTGGCGGAGGTAAAGCAATCAACAGACGCTGGTG
TATTTAAGCGAGCAATAC AACCGTATTCCTCCCCCGGAAATGAAGGT
AACGTTTACTAAGCACCCGAAAGGAGAGTTACTTGTCAAGTGTGACCA
CCTCGAACCGAGTCCAAAGTGGGACAACTATGCGCGCGCGCCAGGTTT
CATGC (REVERSE)

12a

AAGAAAAAATACGTTCCAGTCTACGGATCCTTGTTCGACTTGAAATCTATGAAACCTTAAT
ATATATAAAAAATGTACAACTCTAAAAACAAGGCCCGGGACCGTATCCAGCTGGCATTCTG
ATCCACGATTACTAGCGATTCCGATTCATGGAGTCGAGTTGCGAGACTCCAATCCGGACTACG
ACGCATTTATGAGGTCGCTTGTCTCCGAGGTCGCTCTCTTTGTATGCCCATTTGATG
ACGTGTGATGCCCTGGTCTGAAGGCCATGATGACTTGCATCCCACTTCTCCAGTT
TATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTCCCGCCGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGC
GCTCGTTGGGGACTTAAACCAACATTTCAACAACGAGCTGACGATTTTCATTTCCGACCTGT
CTCACGGTCCCGAAGGGGGGGGCTCATCTCCCCACCTTCCGTGATGTCAAGG
CCAGGTAAGGTTCTCGCGTTCATCAAAATAAACACCTGCTCCACCGCTGGGGGGGGCC
CGTCAATTTATTTGAGTTTAACTTGGCGCGTACTCCCAAGCGGGGACTTAACTCGTTAG
CTCCGGAAGCCACGCTCAGGGCAACCTCAAGTGCATCTTACCGCTGACTACCAGGGA
TCTAATCTGTTGCTCCACGCTTTCGACCTGACGTATCTTAGTCAAGGGGGCGCTCCG
ACGGATTCTCAATCCAGCTTTAAGCCTCACTGATGATCACCCTCAGGAAATCAGTTGCA
AGATCAAGGAGTTCCAGGTGAGCCGGATTCATTGACTAACACGCTGCTGTGTTACGAGAG
ATCGTACGTTGACCTGATACACGCGCTGAAAAATAGCCGCTCTCGGAGTAAAGCAGACAG
AATAATAATTCATCCCGATAGAAAATAACGGAGCTCTAGAGGATGCTGAAAGTGGC
CATGCCAGATCCATTGATCAGAAAGCAGCCGATCGGACATGCTGATCATAGCAGCTAT
AGATACTGATAGAACTGTTATCATTAGTCAATGATCATTAGTGTAGGGGAGGGGGCGGAT
CGAATCGTCTCG (FORWARD)

12b

CCGAATAGGTGCTGTAAGACTGCCAAAAGTCAAGGTATCCGTAATGATCCGAAACGGGGCC
CCCAAAAACCCGGTCTCAAAATCGTAAAAGTGCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATACCGCATAACGTCACAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGCCCTTCCGAT
CGGATGTGCCAATAGGATTAAGTTGAGTGGTAAAGGCTCCGCTAGCGGACGATCCG
TAGCTGTCTAAGAGGATGACCCAGCCACTGGAAGTACAGACAGATCCAGACTCCTACGGG
AGGGGGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGCTGTATG
AAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAGGGAGTAAAGTAACTTTG
CTCATTGACGAACCCGGGAGGAGCACCCTGACCGTCCGCGAGCCGGTAAATACCG
AGGTTGCAAGCGTAAATCGGAATTAAGGCGTAAAGCGCACCGAGGTTTGTAAATGAG
ATGTGAAATCCCGGGCCCAACCGGGAACTGCATATGATGACTGGAAGCTTGTGCTCGGAG
AGGGGAGTAGAATTCAGGTGATGCGGTAAGTCTTAAAGTCTGGAAAAACCGTGGGAA
GGCGGGCCCTAGACAAAACGCTCAGGGCGAAGGGTGGGAAGCAAAAGGATAAATACC
CTGTAGCCGCCCTAGCAAGTCAACTTGAATTTGGGCTGAGGGTGGCTCGAAGCAAGCG
TAATGACGGTGGGAGGAGGGGAGGTAAGTAAATGAAATGAAAGGGGGGGCCGAAAGGGG
GAGGCTTGGGTTTATCACGCAACAAAAATTTACCTGTTTGAATCAGCATTTTAAAAA
AGAAAGTGTCTTATGAAACATAGACGGGCTGCTGTTGTCATCGCTGGTGGGAGGTTG
GTAAGTCCGCAACAAAGCCACTTTTTTTTTGATTCAGGATCCGGCGAAATAAAGAGACGTC
ATAAACACGCGAAGAGCGGGGAGTAACTGATGATGGCCATTAGA (REVERSE)

Figuras 12a y 12b. Secuencias de nucleótidos obtenidos del análisis del ADN ribosomal 16S obtenido de la bacteria acetogénica aislada (BRA). 12a *Pantoea agglomerans* y 12b a bacteria de epitelio ruminal.

7. CONCLUSIONES

- Con el uso de un medio de cultivo anaerobio y selectivo a base de formato, líquido ruminal y cloramfenicol, se logró aislar una bacteria ruminal acetogénica.
- El proceso de liofilización permite conservar la bacteria aislada y su viabilidad. Sin embargo, se requiere de pruebas que permitan aumentar la concentración de bacterias por gramo de liofilizado.
- Un medio de cultivo F-LR enriquecido con glucosa (2%), no estimula un mayor crecimiento de la bacteria aislada.
- La bacteria aislada es un coco Gram+ y anaerobio estricto.
- La bacteria aislada utiliza el formato como fuente de energía y produce AGV, principalmente acetato.
- La adición de la bacteria ruminal acetogénica en un medio de cocultivo con bacterias ruminales, disminuye la producción de metano en un 66%.
- Con base a la secuencia de la subunidad 16 de su gen ARN ribosomal, la bacteria acetogénica pertenece a la especie *Pantoea agglomerans*. Aunque, también es posible que pertenezca a una bacteria ruminal no cultivable, por lo que se requiere de más estudios para aclarar su género y especie.
- Con base a su perfil metabólico y a su capacidad para interactuar con bacterias ruminales, se estima que la bacteria acetogénica aislada, tiene potencial como inóculo para disminuir la producción de metano en rumiantes.

8. RECOMENDACIONES

- La bacteria acetogénica aislada, tiene potencial como inóculo ruminal para disminuir la producción de metano. Por lo que se sugiere evaluar con estudios *in vivo* su posible utilidad e impacto en el control de la emisión e GEI de los rumiantes.
- La identificación genética de la bacteria debe repetirse, hasta tener la seguridad de su clasificación taxonómica.

9. LITERATURA CITADA

Agriculture and Rural Development of Alberta Canada. 2005. Climate Change and Agriculture. 55 p

In:www1.agric.gov.ab.ca/\$department/deptdocs.nsf/all/c19706. 55p. (10 Enero 2009).

Ahrens, U. and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*. 82: 828-832.

Akin, D.E. and R. Benner. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5): 1117-1125.

Baldwin, R.L. and M.J. Allison. 1983. Rumen metabolism. *Journal of Animal Science* 57(2):461-477.

Barbosa C., G.V. y H. Vega M. 2000. Deshidratación de alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 297 p.

Bergey, D.H. 1994a. The methanogens. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. J.G.Holt (ed.). 9th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. pp. 719-725.

Bergey, D.H. 1994b. Endospore-forming Gram positive rods and cocci. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. J.G.Holt (ed.). 9th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. 559 p.

Bergey, D.H. 1994c. Irregular nonsporing Gram-positive rods. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. J.G.Holt (ed.). 9th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. pp.1365-1366.

- Bergey, D.H. 1994d. Gram-positive cocci. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. J.G.Holt (ed.). 9th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A, pp.1092-1093.
- Bergey, D.H. 1994e. Order XIII Enterobacteriales. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. J.G.Holt (ed.). 9th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. pp. 587-850.
- Boccazzi, P. 1993. Isolation and characterization of acetogenic bacteria. Master in Science, Tesis. Purdue University. USA.
- Bryant, M.P. and I.M. Robinson. 1961. An Improved non-selective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen.
- Buchner, R.K. and R.A. Doyle. 1976. Apparatus to demonstrate Boyle's law. *American Journal of Physics*. 44(5): 493-494.
- Busket, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M.D. Carro, and C. Kamel. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 8: 4393-4404.
- Carmona, J.C., D.M. Bolívar, y L.A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18(1): 49-63.
- Church, C.D. 1988. *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia, S.A. 641 p.
- Cobos P., M.A. and M.T. Yokohama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: Colonitacion and degradation of Shrimp carapaces *in vitro*

- observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Reserch Planning*. R.J. Wallace y A. Lahlou-Kassi (eds.). International Livestok Research Institute (ILRI). pp. 151-161.
- Cobos P., M.A., C. Gutierrez, D. Hernández S., S.S. González-Muñoz y G.D. Mendoza M. 2004. Aislamiento y caracterización de dos bacterias cecales con potencial de uso en la alimentación del conejo. *Veterinaria México*. 35(2): 109-120.
- Cobos P., M.A. 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales. *In: Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta microorganismo*. R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (Eds.). Editorial Trillas México, D.F. ISBN 978-968-24-78109. pp. 498-516.
- Diekert G. and G. Wohlfarth. 1994. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leewenhoek Journal of Microbiology Serology*. 66: 209-221.
- Dong, Y., H.D. Bae, T.A. McAllister, G.W. Mathison and K.J. Cheng. 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes, 2-bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in a rumen simulation (RUSITEC) system. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 491-498.
- Duran A., J., S. Castro N., G.D. Mendoza M., M.A. Cobos P., R. Ricalde V. y F.X. Plata P. 2004. Degradabilidad ruminal *in vitro* de almidon de 21 variedades de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) con diferente genotipo de resistencia a sequía. *Interciencia* 29(6): 329-333.
- Escolar J., M., J.R. Aranza P., B. Sádaba D. de R. y J. Honorato P. 1998. Tetraciclina, cloramfenicol y fosfomicina. *Medicine* 7(76): 3524-3532.

- Garcia G., R., S. López, M. Fernández and J.S. González. 2006. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). International Congress Series 1293: 172-175. doi: 10.1016/j.ics.2006.01.044
- Garcia L., P.M., L. Jr. Kung, and M. Odom. 1996. In vitro inhibition of microbial methane production by 9, 10-Antraquinona. Journal of Animal Science. 74: 2276-2284.
- Genther, B.R.S., C.L. Davis and M.P. Bryant. 1981. Features of rumen and sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol and H₂-CO₂-utilizing species. Applied and Environmental Microbiology 42: 12-19.
- Greening, R.C. and J.A. Z. Leedle. 1989. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. Nov., acetogénica bacteria from the bovine rumen. Archives for Microbiology 152: 399-406.
- Guerra M., C.E. 2004. Uso de aserrín de pino (*Pinus patula*) en la engorda de ovinos y aislamiento de un cultivo bacteriano. Tesis de Doctorado. Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. p. 106
- Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1979. Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos. Editorial Academia. León, España. 419 p.
- Hartmanis, M.G.N. and S. Gatenbeck. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. Journal of Applied and Environmental Microbiology 47(6): 1277-1283.
- Hegarty, R.S. 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research. 50: 1299-1305.

- 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.
- Isaacson, H.R., F.C. Hinds, M.P. Bryant, and F.N. Owens. 1974. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *Journal of Animal Science* 58(11): 1645-1659.
- Janda, J.M., and S.L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2761-2764.
- Joblin, K.N. 1999. Ruminal acetógenos and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 1307-1313.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Currente Science*. 89(1): 124-135.
- Kolver, E.S., P.W. Aspin, G.N. Jarvis, K.M. Elborough, and J.R. Roche. 2004. Fumarate reduces methane production from pasture fermented in continuous culture. *Proceedings of the New Zeland Society of Animal Production* 64: 155-159.
- 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*. *Applied and Enviromental Microbiology*. 64(9): 3429-3436.
- Lee, S.S., J.T. Hsu, H.C. Mantovani and J.B. Rusell. 2002. The effect of bovicin HC5, on ruminal methane production *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* 217: 51-55.

- Leedle, J.A. and R.C. Greening. 1988. Postprandial changes in methanogenic and bacteria acidogenic bacteria in rumen s of steers fed high – or – low – forages diet once daily. *Applied an Environmental Microbiology*. 54: 502-506.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson y M.M. Cox. 1993. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. Segunda edición. Editorial Worth Plublishers. New York, U.S.A. pp. 497.
- Lopez, S., F.M. McIntosh, R.J. Wallace and C.J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*. 78: 1-9.
- Lorowitz, H.W. and M. Bryant. 1984. *Peptostreptococcus productus* Strain that grows rapidly cith CO as the energy source. *Applied and Enviromental Microbiology*. 961-964.
- Mandigan, M.T., J.M. Martiniko y J. Parker. 2002. *Biología de los microorganismos*. Editorial Pearson-Prentice Hall. 8ª edición Madrid, España. 986 p.
- McAllister, T.A., E.K. Okine, G.W. Mathison and K.J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production on ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 231-243.
- McAllister, T.A. and C.J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48(2): 7-13.
- McCaughey, W., K. Wittenberg, and D. Corrigan. 1997. Methane production by steers on pasture. *Canadian Journal of Animal Science*. 76(3): 519-524.
- McCaughey, W., K. Wittenberg, and D. Corrigan. 1999. Impact of pasture type on methane production by lacting beef cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 79(2): 221-226.

- McInerney, M.J., M.P. Bryant and N. Pfennig. 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Archives of Microbiology* 122: 129-135.
- Miyama, M., M. Matsuda, S. Haga, S. Kagawa, B.C. Millar and J.E. Moore. 2002. Cloning and Sequencing of 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) from urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC). *Letters in Applied Microbiology*. 34: 287-289.
- Montañez V., O.D., E.O. García F., J.G. Peralta O., J.E. García M., R. Rojo R. y J.H. Avellaneda C. 2006. Efecto de la adición de vitaminas B en la digestibilidad *in vitro* de dietas con diferente fuente de carbohidratos. *Revista Científica Maracaibo* 16(5): 531-537.
- Morvan, B. 1995. Ecology et physiologie des microorganismes hydrogénotrophes des ecosystems digestifs-étude particulière de l'écosystème ruminal. Thèse de doctorat en science, Université de Lyon, France.
- Moss, A.R., J.P. Jouany and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA EDP Sciences. *Annales de Zootechnie* 49: 231-253.
- Müller, V. 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(11): 6345-6353.
- Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1774 p.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2007. National Library of Medicine National Institutes of Health Building 38A, 8600 Rockville Pike,

- Bethesda, MD 20894, USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov. (12 Dic 2008).
- NRC (Nacional Research Council). 1985. Nutrient Requierments of sheeps. 6° edición. National Academy Press. Washington D.C., E.U.A. pp. 45-46.
- Owens, F.N. y A.L. Goetsch. 1988. Fermentación Ruminal. C.D. *In: El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. C.D. Church (Ed.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 159-189 pp.
- Pérez S., M. 2006. Comportamiento productivo y microbiológico de borregos alimentados con polietilentereftalato como fuente de fibra. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. pp. 35-36.
- Piloni M., J. 2008. Aislamiento y caracterización de bacterias quitinolíticas ruminales. Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 96 p.
- Primavesi, O.F., R.T. Shiraishi., M. Dos Santos L., M. Aparecida de B., T.T. Barbosa, y P. Franklin. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 39(3): 277-283.
- Rieu-Lesme, F., G. Fonty and J. Doré. 1995. Isolation and characterization of a new hydrogen-utilizing bacterium from the rumen. *FEMS Microbiology Letters*. 125: 77-82.
- Rieu-Lesme, F., C. Dauga. B. Morvan, O.M.M. Bouvet, P.A.D. Grimond and J. Doré. 1996a. Acetogenic coccoid spore-forming bacteria isolated from the rumen. *Research in Microbiology*. 147: 753-764.

- Rieu-Lesme, F., B. Morvan, M.D. Collins, G. Fonty, and A. Willems. 1996b. A new H₂/CO₂-using bacterium from the rumen: description of *Ruminococcus shinkii* sp. Nov. FEMS Microbiology Letters. 140, 281-286.
- Rieu-Lesme, F., C. Dauga, G. Fonty, and J. Doré. 1998. Isolation from the rumen of a new acetogenic bacterium phylogenetically closely related to *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 4:89-94.
- Rojas M., R.I. 1998. Identificación del fitoplasma de la filodia del Cempazúchil (*Tagetes erecta* L.) mediante PCR y RFLP's y alteraciones fisiológicas en plantas sintomáticas. Tesis de Doctorado. Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 97 p.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier and D.P Morgavi. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1(7): 939-944.
- SAS Institute. 1998. User's guide: statistics. version 6. Editions SAS Institute, Inc., Cary, N. C.
- Shauer, N.L., D.P. Brown and J.G. Ferry. 1982. Kinetics of formate metabolism in *Methanobacterium formicum* and *Methanospirillum hungatei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(3): 549-554.
- Sleat, R. and R. Mah. 1984. Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. *Applied and environmental microbiology*. 884-885.
- Stanbury, P.F., A. Whitker and S.J. Hall. 1995. Principles of Fermentation Technology. Elsevier/Pergamon publications. BPC Wheatons Ltd, Exeter, UK. 357 p.

- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis y M.L. Painter, P.R. 1996. Microbiología. Editorial Reverté S.A. 2da edición. pp. 486-488.
- University of New Hampshire. 2004. Greenhouse Gas Emissions Inventory 1990-2003. *In:* www.sustainableunh.unh.edu/climate_ed/greenhouse-gas-invnt/1990-2003_UNH_GHG_Report.pdf. (13 Enero 2009) 32 p.
- Ushida, K., M. Tokura, A. Takenaka and H. Itabashi. 1997. Ciliate Protozoa and ruminal methanogenesis. *In:* Rumen microbes and digestive physiology in ruminants. R. Onodera , H. Itabashi, K. Ushida, H. Yano and Y. Sasaki (Eds). Japan Scientific Society Press: Tokyo. pp. 608-220.
- Weimer P.J. 1998 Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science*. 76: 3114-3122.
- Whitford, M.F., R.M. Teather and R.J. Foster. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from de bovine rumen. *Biomedicalcentral microbiology* 1-5.
- Wissesman Jr. C.L., J.E.J. Smadel, F.E. Hahn, and H.E. Hopps. 1954. Mode of action of cholramphenicol. I. Action of cholramphenicol on assimilation of ammonia and synthesis of proteins and nucleic acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 67: 662-673.
- Woese, C.R., O. Kandler and M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea Bacteria, and Eucarya. *The Proceedings of the National Academy of Science Online USA*. 87: 4576-4579.
- Wolin, M.J., T.L. Miller, M.D. Collins and P.A. Lawson. 2003. Formate-depending growth and homoacetogenic fermentation by a bacterium from human feces: Descripcion of *Bryllantella formatexigens* gen. nov., sp. Nov. *Applied and Enviromental Microbiology*. 69(10): 6321-6326.

- Wright, A.D.G., P. Kennedy, C.J. O'Neil, A.F. Toovey, S. Popovski, S.M. Rea, C.L. Pimm and L. Klein. 2004. Reducing methane emission in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* 22: 3976-3985 pp. doi: 10.1016/j.Vaccine.2004.03.053.
- Yokoyama, M.T. y K.A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. *In: El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. C.D. Church (Ed.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 137-157.
- Zamora R., L.M. 2003. Conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis Doctoral. Universidad de Girona. Girona, España. *In: http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0711105-114345//TlZr.pdf*. (18 Enero 2009) 259 p.
- Zeikus, J.G. 1977. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*. 41(2): 514-541 pp.

10 . ANEXOS

10.1 Método de extracción de ADN descrito por Ahrens y Seemüller (1992), modificado por Rojas (1989)

- Centrifugar medio selectivo con el cultivo puro a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Desechar sobrenadante y obtener 0.3 g de pelet.
- Macerar con N líquido hasta obtener un polvo fino.
- Adicionar 800 µL de amortiguador CTAB y mezclar perfectamente.
- Incubar a baño María a 60°C durante dos horas.
- Adicionar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) por tubo y mezclar suavemente hasta lograr una apariencia lechosa.
- Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril con cuidado de no tomar partículas sólidas.
- Agregar un volumen de Isopropanol frío, mezclar suavemente e incubar a -20°C por 1 hora.
- Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.
- Secar la pastilla en estufa a 37°C por 30 min.
- Agregar 40 µL de agua y resuspender el ADN a 37°C por 5 min.
- Centrifugar por 3 segundos y vaciar los mismos ADN a un solo tubo.
- Agregar 60 µL de Acetato de Sodio 3M y 600 µL de Isopropanol frío.
- Mezclar suavemente e incubar a -20°C durante 1 hora.
- Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.

- Secar la pastilla de ADN en estufa a 37°C por 30 min y resuspender en 100 μ L de agua a temperatura ambiente.
- Almacenar a -20°C.

10.2 Determinación de formato por método colorimétrico, descrito por Sleat y Mah (1984).

10.2.1 Estándar de formato

- En un matraz Erlenmeyer de 150 mL disolver por cada 10 mL de H₂O destilada, 0.05 g de ácido cítrico y 1 g de acetamida en 10 mL de 2 propanol (solución 1).
- Agitar hasta disolver los reactivos.
- Cubrir con papel parafilm, y almacenar a temperatura ambiente.
- En un matraz Erlenmeyer de 150 mL disolver por cada 10 mL de H₂O, 3 g de acetato de sodio (solución 2).
- Agitar hasta disolver.
- Cubrir con papel parafilm, y almacenar a temperatura ambiente.
- Agregar la cantidad necesaria de anhídrido acético en un matraz Erlenmeyer de 150 mL (solución 3).
- Cubrir con papel parafilm, y almacenar a temperatura ambiente.
- En el matraz Erlenmeyer de 150 mL disolver 3.43 g de formato de sodio al 99% en 100 mL de agua destilada.
- Agitar con plancha y mosca.
- Diluir 1-100 en H₂O destilada (solución madre)

- Realizar los puntos de la curva de calibración en tubos de ensaye de 18 x 150 mm (cuadro 16).

Cuadro 16. Dilución de solución madre para puntos de la curva de calibración para la determinación de formato.

Punto de la curva (concentración molar)	Volumen de solución madre (μL)	Volumen de H_2O destilada (μL)	Volumen final de la dilución (μL)
0.5	500.0	0.0	500
0.25	250.0	250.0	500
0.125	125.0	375.0	500
0.0625	62.5	437.5	500
0.0	0.0	500.0	500

- Agregar 1 mL de solución 1.
- Agregar 50 μL de la solución 2.
- Agregar 3.5 mL de solución 3.
- Tapar y agitar en vortex.
- Incubar a temperatura ambiente por 1.5 h.
- Leer en espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm.
- Aceptar la curva de calibración si esta tiene una $r^2 \geq 0.997$.

10.2.2 Muestras problema.

- Centrifugar a 15,000 rpm y 4°C durante 15 min.
- Diluir sobrenadante 1-100 en H₂O destilada.
- Tomar 0.5 mL de la dilución y colocar en tubo de ensaye.
- Agregar 1 mL de solución 1.
- Agregar 50 µL de solución 2.
- Agregar 3.5 mL de solución 3.
- Tapar y agitar en vortex.
- Incubar durante 1.5 h a temperatura ambiente.
- Leer en espectrofotómetro con la curva de calibración correspondiente.