



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

---

## **CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**AISLAMIENTO DE UNA BACTERIA RUMINAL  
CELULOLÍTICA Y SU CAPACIDAD PARA MEJORAR LA  
DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE SUSTRATOS CELULOLÍTICOS**

**PAULINO SÁNCHEZ SANTILLÁN**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLOS, TEXCOCO, EDO DE MÉXICO**

**2014**

La presente tesis titulada: **Aislamiento de una bacteria ruminal celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos** realizada por el estudiante **Paulino Sánchez Santillán**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, fue aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

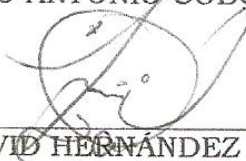
**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO




DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

ASESOR



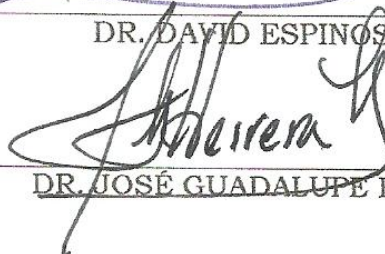
DR. ALBERTO ÁLVARO IGLESIAS

ASESOR



DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR



DR. JOSÉ GUADALUPE HERRERA HARO

Montecillos, Texcoco, Edo. de México; 29 de octubre de 2014

## RESUMEN

### **Aislamiento de una bacteria ruminal celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos.**

Paulino Sánchez Santillán, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

Se aisló una bacteria celulolítica (BCA) y un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) ruminales en un medio selectivo con base en celulosa cristalina, carboximetilcelulosa y fluido ruminal. Se evaluó *in vitro*, la degradación de la materia seca (DEGMS), la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), y relación acetato:propionato de rastrojo de maíz, pasto bermuda y alfalfa inoculados con BCA y CBC solas o en cocultivo con bacterias ruminales totales (BRT). También se evaluó al carbón activado como lioprotector bacteriano durante el proceso de liofilización. La DEGMS fue mayor ( $p < 0.05$ ) en el cocultivo que con BRT (58.08 vs 54.63%); pero después de la liofilización el cocultivo no mostró diferencias ( $p \geq 0.05$ ) con BRT (53.9 vs 55.92%). El cocultivo mejoró ( $p \leq 0.05$ ) la DEGMS en alfalfa con respecto a las BRT (56.23 vs 49.90%). La BCA mostró la menor DEGMS de los sustratos evaluados. La conservación del CBC por liofilización sin adición de lioprotector resultó en una marcada disminución en la DEGMS a 3.20%. Mientras que, el uso de carbón activado mantuvo la DEGMS en 31.82%, después de 72 h de incubación. El inóculo CBC en cocultivo con BRT favoreció la fermentación acética. Se concluye que tanto BCA y CBC propician una fermentación acética de los forrajes evaluados, y que el carbón activado es un buen lioprotector para la conservación por liofilización de bacterias celulolíticas.

**Palabras clave:** Rumen, liofilización, carbón activado, ácidos grasos volátiles

## ABSTRACT

### **Isolation of a cellulolytic rumen bacterium and its ability to enhances the *in vitro* degradation of cellulolytic substrates.**

Paulino Sánchez Santillán, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

One cellulolytic bacterium (CB) and one consortium of cellulolytic bacteria (CCB) were isolated from the rumen on a selective medium containing Whatman paper, crystalline cellulose, carboxymethylcellulose and ruminal fluid. The *in vitro* degradation of corn stover, Bermudagrass, and alfalfa by BCA and CBC alone or in coculture with total-rumen bacteria (BRT) was quantified. Also, the use of activated carbon as bacterial-lyoprotectant in the process of lyophilization was evaluated. Among the variables measured were: *in vitro* dry matter degradation (IVDMD), production of volatile fatty acids (VFA). The IVDMD was better ( $p \leq 0.05$ ) in the coculture than in BRT (58.08 vs. 54.63%). However, the coculture had not differences ( $p \geq 0.05$ ) with BRT (53.95 vs. 55.92%). after lyophilization. The coculture improved ( $p \leq 0.05$ ) the IVDMD of alfalfa (56.23%) compared with BRT (49.90%). The CB showed the lowest IVDMD in all cellulolytic substrates evaluated. The CCB conserved by lyophilization without lyoprotectant decreased remarkably its ability to degrade dry matter to a minimum of 3.20 %. In contrast CCB lyoprotected with activated carbon before lyophilization maintained its IVDMD in 31.82 %, after 72 h incubation. CCB in coculture with BRT encouraged the acetate fermentation. We concluded that both CB and CCB stimulate the acetate fermentation of the forages evaluated, and it is suggested the use of activated carbon as lyoprotectant of cellulolytic bacteria preserved by lyophilization.

**Keywords:** Rumen, lyophilization, activated carbon, volatile fatty acids.

## **AGRADECIMIENTOS**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 211475 otorgada para realizar los estudios de doctorado.

Colegio de Postgraduados por ser la casa de estudios que me permitió estudiar un doctorado con calidad por el personal académico e infraestructura que posee.

Dr. Mario Antonio Cobos Peralta por ser el guía de mi formación académica durante estos cuatro años, otorgándome consejos que me ayudaron a crecer tanto en el ámbito profesional como personal, sin duda me enseñó a ser una mejor persona, un placer y orgullo haberlo tenido como consejero, gracias.

Dr. David Hernández Sánchez por su apoyo en la realización del trabajo de investigación, sus ideas ayudaron a enriquecer el presente trabajo, así como la oportunidad de conocerlo más allá de la relación profesor-alumno, gracias

Dr. Alberto Álvaro Iglesias por su colaboración en la realización del trabajo de tesis, ya que su apoyo permitió enriquecer los resultados.

Dr. David Espinosa Victoria por su tiempo en el enriquecimiento del presente trabajo de graduación, su aporte resultó motivacional para obtener la presente tesis.

Dr. José Guadalupe Herrera Haro por sus conocimientos que ayudaron a mejorar el proceso de investigación, permitiendo obtener resultados de calidad.

## **DEDICATORIA**

Dios, gracias por permitirme cumplir un objetivo más en la vida.

Alyn Mishel y Paulino Yhael, se convirtieron en las personitas más importantes al llegar a mi vida; por ser la razón que me motiva a superarme día con día. Muchas veces me pierdo momentos maravillosos de su vida, pero mi ausencia significa la búsqueda de herramientas que les permita valorar la vida, sin duda alguna son mi mayor felicidad, los AMO con todo mí ser.

Abi, gracias amor, porque realmente has sido el eslabón que me sustento durante estos años, sin ti jamás lo hubiera logrado; tu amor por nuestra familia hizo que mis ausencias se sintieran menos, amor lo logramos, TE AMO.

Cristina, gracias madre por seguir brindándome tu apoyo incondicional, porque gracias a ti soy lo que soy, gracias por todo tu apoyo.

Sayra, en las buenas y en las malas, eres la mejor hermana, gracias por estar ahí cuando te necesito.

A mis familiares, gracias porque de cierta forma siempre estuvieron ahí cuando necesite su apoyo.

A los amigos y compañeros de laboratorio por la convivencia diaria: Iván, Dulce, Carlos, Mayra, Guadalupe, Felipe, Don Agus, Tacho, y aquellos con los que conviví cuando cursamos alguna materia.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	i
ABSTRACT.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS .....	3
3.1. Objetivo General .....	3
3.2. Objetivos específicos .....	3
4. HIPÓTESIS .....	4
5. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
5.1. Metabolismo de la fibra en rumiantes.....	5
5.1.1. Composición de la fibra.....	5
5.1.2. Metabolismo de la fibra por bacterias celulolíticas en rumen ....	7
5.1.3. Factores que regulan la digestión de la fibra en rumiantes .....	10
5.2. Bacterias celulolíticas ruminales en el metabolismo de la fibra .....	11
5.2.1. Descripción de bacterias celulolíticas .....	11
5.2.2. Digestión de la fibra por bacterias celulolíticas .....	14

5.2.3. Factores que afectan la adhesión de las bacterias a la fibra ....	15
5.2.4. Sistemas enzimáticos de celulasas .....	16
5.2.5. Catabolismo fermentativo y productos finales .....	17
5.3. Conservación de bacterias.....	18
5.3.1. Proceso de liofilización .....	19
5.3.2. Lioprotectores .....	21
LITERATURA CITADA .....	23

Capítulo 1 . AISLAMIENTO DE UNA BACTERIA RUMINAL CELULOLÍTICA Y SU CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> EN COCULTIVO CON BACTERIAS RUMINALES TOTALES .....	31
1.1 INTRODUCCIÓN .....	31
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
1.2.1. Aislamiento de la bacteria celulolítica ruminal .....	32
1.2.2. Conservación de la bacteria .....	37
1.2.3. Prueba de degradación <i>in vitro</i> de forrajes .....	37
1.3. RESULTADOS.....	40
1.3.1. Pruebas de degradación <i>in vitro</i> antes de liofilizar la bacteria..	40
1.3.2. Descripción morfológica de la bacteria celulolítica aislada .....	41
1.3.3. Prueba de degradación <i>in vitro</i> de sustratos celulolíticos .....	43
1.4. DISCUSIÓN .....	47
1.5. CONCLUSIONES.....	53
1.6. LITERATURA CITADA .....	54



Capítulo 2 . USO DE CARBÓN ACTIVADO COMO LIOPROTECTOR EN EL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS .....	58
2.1. INTRODUCCIÓN .....	58
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	59
2.2.1. Inóculo .....	59
2.2.2. Obtención del consorcio de bacterias celulolíticas .....	59
2.2.3. Método de conservación .....	60
2.2.4. Reactivación del liofilizado .....	61
2.2.5. Prueba de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca.....	62
2.2.6. Análisis estadístico .....	63
2.3. RESULTADOS.....	64
2.4. DISCUSIÓN .....	67
2.5. CONCLUSIONES.....	72
2.6. LITERATURA CITADA .....	73
Capítulo 3 . DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> DE SUSTRATOS CELULOLÍTICOS POR UN CONSORCIO DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS.....	76
3.1. INTRODUCCIÓN .....	76
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	77
3.2.1. Inóculos y sustratos.....	77
3.2.2. Prueba de degradación <i>in vitro</i> .....	78
3.2.3. Análisis estadístico .....	80
3.3. RESULTADOS.....	81
3.4. DISCUSIÓN .....	86

3.5. CONCLUSIONES.....	90
3.6. LITERATURA CITADA .....	91
CONCLUSIONES GENERALES.....	94

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Composición de medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos celulolíticos. ....	35
Cuadro 1.2. Degradación <i>in vitro</i> de materiales celulolíticos por un consorcio de bacterias celulolíticas.....	40
Cuadro 1.3. Degradación <i>in vitro</i> de pasto bermuda por una bacteria celulolítica aislada en cocultivo con bacterias ruminales totales .....	41
Cuadro 1.4. Degradación <i>in vitro</i> de materiales celulolíticos por una bacteria celulolítica aislada en cocultivo con bacterias ruminales .....	44
Cuadro 1.5. Porcentaje de acetato, propionato y butirato en la concentración final de ácidos grasos volátiles .....	45
Cuadro 1.6. Estimación del porcentaje de eficiencia de fermentación utilizando la producción de ácidos grasos volátiles .....	46
Cuadro 1.7. Coeficientes de correlación entre eficiencia de fermentación, pH, ácidos grasos volátiles y porcentaje de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca.....	50
Cuadro 2.1. Composición del medio de cultivo selectivo para bacterias celulolíticas.....	60
Cuadro 2.2. Porcentaje de repeticiones que degradaron papel Whatman a los 7 y 10 días de incubación .....	65
Cuadro 2.3. Efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar un consorcio de bacterias celulolíticas .....	65
Cuadro 2.4. Efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar un consorcio de bacterias celulolíticas sobre la producción de ácidos grasos volátiles totales y porcentaje de butirato.....	66

Cuadro 2.5. Efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar un consorcio de bacterias celulolíticas sobre el porcentaje de acetato, propionato y potencial óxido-reducción .....	67
Cuadro 3.1. Composición del medio de cultivo celulolítico. ....	78
Cuadro 3.2. Degradación <i>in vitro</i> de sustratos celulolíticos por un consorcio de bacterias celulolíticas en cocultivo con bacterias ruminales .....	82
Cuadro 3.3. Participación del acetato, propionato y butirato en la concentración final de ácidos grasos volátiles (mM) .....	84
Cuadro 3.4. Estimación del porcentaje de la eficiencia de fermentación utilizando la producción de ácidos grasos volátiles (mM) .....	85
Cuadro 3.5. Coeficientes de correlación entre eficiencia de fermentación, pH, ácidos grasos volátiles y porcentaje de degradación <i>in vitro</i> de la materia seca.....	88

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.1. Colonias de la bacteria celulolítica aislada en medio sólido. ....	42
Figura 1.2. La bacteria celulolítica aislada presentó una tinción Gram positiva.....	42
Figura 1.3. Bacteria celulolítica aislada observada a 1000 ampliaciones .....	43

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las actividades agrícolas dan origen a una variedad de esquilmos usados en la alimentación de rumiantes. Los cuales abundan en el país especialmente en las áreas de temporal, ya que son parte de las plantas que permanecen en el terreno después de cosechar el grano o semilla. La cantidad anual de esquilmos oscila en 45 millones de ton de materia seca para los diez principales cultivos (maíz, sorgo, trigo, frijol, arroz, cebada, soya, algodón, cártamo y ajonjolí); el rastrojo y olote de maíz (25.5 millones de ton) y las pajas de sorgo (6.6 millones de ton) representan aproximadamente 81% de los residuos de cultivos (SAGARPA, 2009). Los forrajes en el trópico seco de México constituyen una fuente importante de alimento para el ganado explotado en ranchos de doble propósito; sin embargo, su crecimiento y maduración es rápida provocando que disminuyan su contenido nutricional (Juárez *et al.*, 2009).

La celulosa, hemicelulosa y lignina son los principales constituyentes de materiales celulolíticos de plantas, las cuales incorporan otros polímeros estructurales como ceras y proteínas (Malherbe y Cloete, 2002). La fibra es un componente heterogéneo de las plantas cuya estructura tridimensional es variable y poco conocida, entre 35 y 80% de la materia orgánica de los tejidos vegetales está en la pared celular proporcionando rigidez estructural y protección (Jung y Allen, 1995). Los carbohidratos son fuente primaria de energía para los rumiantes y se dividen en dos fracciones: estructural y no estructural. La parte estructural de la planta es mayoritariamente el material de la pared celular y es analíticamente definido como fibra detergente neutro (FDN), misma que se compone de celulosa, hemicelulosa, lignina y una parte de pectina (PSU, 1996).

La población bacteriana contiene de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  células  $g^{-1}$  de contenido ruminal, la mayoría son anaerobias obligadas ( $10^7$ - $10^8$  células  $g^{-1}$  contenido ruminal), aunque aparecen anaerobias facultativas, estas se agrupan por su

forma (cocos, bacilos y espirilos), tamaño (0.3 a 50  $\mu\text{m}$ ) o estructura (presencia de una envoltura celular, citoplasmáticas y adherencias superficiales). Un método de clasificación de las bacterias ruminales es por el tipo de sustrato que degradan (celulosa, hemicelulosa, almidón, proteínas) y por el producto final de la fermentación (etanol, ácidos grasos volátiles, piruvato y otros). Así mismo, se clasifican en: celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas, ureolíticas, productoras de metano, utilización de ácidos y proteolíticas (Church, 1993; PSU, 1996).

El ambiente anaeróbico del rumen permite tener mayor eficiencia en la degradación de polisacáridos de origen vegetal, atribuyéndolo a los microorganismos que lo habitan de forma abundante, como bacterias del rumen. *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* son consideradas importantes en la degradación de celulosa en rumen, dada la producción de un conjunto de enzimas celulolíticas como las endoglucanasas, exoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas. Las bacterias cultivables del rumen representan sólo el 2% del RNAr 16S de las bacterias ruminales (Cai *et al.*, 2010).

El interés en la genética de microorganismos del rumen inició por el aislamiento de cepas manipuladas para mejorar la función ruminal (Gregg *et al.*, 1995; Flint y Scott, 2000). En años anteriores, la genética molecular tuvo un papel vital en la comprensión del funcionamiento de los sistemas enzimáticos, la dinámica y diversidad de las comunidades microbianas y el rumen; descubrimiento de la evolución de los microorganismos del rumen. Los microorganismos responsables de la degradación de la pared celular son la categoría más estudiada a nivel genético, ya que tienen un potencial en el tratamiento previo de la alimentación animal, tratamiento de pasta de papel, procesamiento de alimentos e industria textil (Flint y Scott, 2000).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En México se cosechan anualmente 6,226,812 ha de maíz y 1,690,518 ha de sorgo, generando alrededor de 70 millones de ton de residuos agrícolas (SIAP, 2011), además de 51 millones de hectáreas sembradas de pastos tropicales (Juárez *et al.*, 2009). Las praderas y residuos agrícolas son usados en la alimentación de rumiantes por la cantidad de materia seca y energía contenida; así como, su disponibilidad y precio. Sin embargo, la reducción de nitrógeno disponible aumenta la pared celular lignificada durante su proceso fisiológico; limitando la eficiencia productiva de las unidades de producción ganadera. Así, el aislamiento de bacterias ruminales celulolíticas podrían emplearse como probiótico o aditivo en la dieta de rumiantes para mejorar la degradación de forrajes y/o subproductos agrícolas mejorando con ello la población bacteriana celulolítica del rumen.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Aislar una bacteria ruminal celulolítica utilizando medios anaerobios selectivos y medir su capacidad de degradación de sustratos celulolíticos en cocultivo con bacterias ruminales totales en pruebas *in vitro*.

### **3.2. Objetivos específicos**

- a. Aislar una bacteria ruminal celulolítica a partir de una vaca Jersey con cánula ruminal usando medios anaerobios selectivos.
- b. Caracterizar morfológicamente las colonias de las bacterias celulolíticas que crecieron en medios anaerobios sólidos selectivos.

- c. Realizar prueba de degradación *in vitro* en rastrojo de maíz, pasto bermuda y alfalfa utilizando la bacteria celulolítica aislada en cocultivo con bacterias ruminales totales (50:50).
- d. Obtener un consorcio de bacterias celulolíticas con capacidad para degradar papel Whatman a partir de fluido ruminal fresco de una vaca Jersey con cánula ruminal.
- e. Utilizar carbón activado como lioprotector en el proceso de conservación de un consorcio de bacterias celulolíticas mediante liofilización.
- f. Analizar el efecto del carbón activado en el consorcio de bacterias celulolíticas mediante una prueba de degradación *in vitro* usando papel Whatman y celulosa cristalina como sustratos.
- g. Realizar una prueba de degradación *in vitro* en rastrojo, alfalfa, pasto bermuda y celulosa cristalina usando el consorcio de bacterias celulolíticas en cocultivo con bacterias ruminales totales (50:50).

#### **4. HIPÓTESIS**

Es posible aislar bacterias ruminales celulolíticas con alta capacidad degradadora a partir de fluido ruminal usando medios de cultivo anaerobios selectivos.

Una bacteria celulolítica aislada se puede utilizar como probiótico para mejorar la degradación de forrajes y/o subproductos agrícolas usados en la alimentación de rumiantes.



## **5. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **5.1. Metabolismo de la fibra en rumiantes**

Los forrajes contienen moderada cantidad de azúcares hidrosolubles, la cual varía según el tipo de forraje, como es el caso de las gramíneas que contienen un menor contenido de azúcares que las leguminosas (Oba, 2011). El contenido de azúcares estructurales en forrajes es inversamente proporcional a los hidrosolubles. Los microorganismos celulolíticos son eficientes en la transformación de celulosa a glucosa por su activo sistema de enzimas hidrolíticas (Varga y Kolver, 1997; Nouaille *et al.*, 2009).

Los principales productos de la fermentación son ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato) y proteína microbiana. La colonización microbiana en fibra es rápida, pero la velocidad de degradación está en función de la accesibilidad microbiana al sustrato, naturaleza física y química del forraje y cinética de la digestión ruminal. Sin embargo, la asociación de lignina con celulosa y hemicelulosa es la limitante de la degradación (Varga y Kolver, 1997). Los microorganismos del rumen digieren hasta 30% de celulosa y 68% de hemicelulosa (Matsui *et al.*, 2010).

#### **5.1.1. Composición de la fibra**

La composición química de las plantas varía y se asocia a los factores genéticos y ambientales. La celulosa, hemicelulosa y lignina son los principales constituyentes de la pared celular, además de otros polímeros estructurales como ceras y proteínas (Calsamiglia, 1997; Özköse *et al.*, 2001; Malherbe y Cloete, 2002; Bach y Calsamiglia, 2006). La fibra es un componente heterogéneo, cuya estructura tridimensional es variable. La pared celular en las células vegetales proporciona rigidez estructural y protección (Jung y Allen, 1995).

La celulosa es el componente más abundante en la biosfera, se encuentra en las paredes celulares de las plantas en combinación con lignina formando una mezcla de polímeros de ácido fenólico no aprovechables biológicamente (Leschine, 1995; Lynd *et al.*, 2002; Church *et al.*, 2004). La celulosa tiene estructura lineal no ramificada constituida de 10,000 a 15,000 unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 (Warren, 1996; Özköse *et al.*, 2001; Malherbe y Cloete, 2002; Nelson y Cox, 2006; Liu *et al.*, 2009). Las moléculas de celulosa se orientan paralelamente formando hasta cuatro formas cristalinas. La celulosa constituye de 20 a 40% del peso seco de la pared celular cuando la planta está en crecimiento y aumenta hasta 60% cuando se constituyen las paredes secundarias (Leschine, 1995).

La hemicelulosa es un polisacárido insoluble en agua compuesto por moléculas D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, L-arabinosa y ácido glucorónico (Breznak y Brune, 1994; Malherbe y Cloete, 2002). La hemicelulosa se une a celulosa mediante puentes de hidrogeno (Bach y Calsamiglia, 2006) y contiene dos tipos diferentes de polisacáridos: *a*) celulosanos de cadena corta que forman parte de la propia estructura de la celulosa y *b*) polisacáridos amorfos incrustados y asociados íntimamente a la lignina de la membrana celular (Church, 1993; Malherbe y Cloete, 2002). La principal clase de hemicelulosa es xilano, el cual se caracteriza por la presencia de L-arabinosa como sustituyente de D-xilosa en gramíneas y cereales (Kuhad *et al.*, 1997).

La lignina no es un carbohidrato y se forma a partir de tres alcoholes derivados de fenilpropano: coniferílico, sinapílico y p-cumaril. Se constituye de numerosas unidades de fenilpropano agrupadas en una compleja estructura entrecruzada. Los aminoácidos fenilalanina y tirosina son considerados los precursores de polímeros fenólicos que dan origen a la lignina en la pared celular (Jung y Allen, 1995; Nelson y Cox, 2006; Wong, 2009). La incrustación física de lignina en fibras vegetales es parte del proceso de maduración de la

célula vegetal. En forrajes, la lignina se considera un factor antinutricional (Moore y Jung, 2001; Bach y Calsamiglia, 2006) porque interfiere en la digestión de los polisacáridos al actuar como barrera física para las enzimas microbianas (Jung y Allen, 1995; Moore y Jung, 2001; Nelson y Cox, 2006).

Una forma de cuantificar los componentes de la fibra es mediante un sistema que elimina secuencialmente los componentes con detergentes calientes a pH 7, pH 2 y un ácido fuerte. En el detergente neutro se disuelven proteínas, lípidos, almidón y azúcares simples contenidos en las células; el residuo se llama fibra detergente neutro (FDN) que se aproxima a la constitución de las paredes celulares. Sin embargo, también se disuelven algunos polisacáridos mixtos como pectina y  $\beta$ -glucano de las paredes celulares. En detergente ácido se eliminan polisacáridos mixtos como la hemicelulosa de las paredes celulares, lo que deja un residuo de celulosa, lignina y minerales denominado fibra detergente ácido (FDA). El ácido sulfúrico disuelve la celulosa de la fracción FDA. La lignina se mide como la pérdida de materia orgánica del residuo de ácido durante la combustión (Van Soest *et al.*, 1991; Barbaza, *et al.*, 2009).

### **5.1.2. Metabolismo de la fibra por bacterias celulolíticas en rumen**

La digestión de la fibra requiere una exposición de las moléculas a tratamientos químicos, mecánicos o enzimáticos (Barboza *et al.*, 2009). Las condiciones del rumen son: pH de 5.5 a 7.2, temperatura entre 39-41 °C, (Zavaleta, 1976; Grudsky y Arias, 1983; Kingston-Smith *et al.*, 2008) y oxidoreducción entre -250 a -450 milivoltios (Yokoyama y Johnson, 1993). La fase gaseosa del contenido ruminal está constituida por 65% de CO<sub>2</sub>, 27% de metano, 7% de nitrógeno, 0.6% de oxígeno, 0.2% de hidrógeno y 0.01% de sulfuro de hidrógeno (Arias, 1982; Grudsky y Arias, 1983; Yokoyama y Johnson, 1993) propiciando un fermentador anaerobio idóneo para la degradación de fibra.

Las características físicas y químicas de los carbohidratos regulan su fermentación y son el primer paso del ciclo de carbono en rumen. (Stern *et al.*, 1994; Qi *et al.*, 2007; Anrique, 2010). La fibra es la fuente más importante de carbono y energía en la dieta de un rumiante. Sin embargo, los rumiantes no producen las enzimas necesarias para digerir fibra, pero albergan bacterias, hongos y protozoarios que hidrolizan celulosa y otros carbohidratos presentes en la fibra. Los productos intermediarios del metabolismo de los microorganismos durante la fermentación son utilizados por los rumiantes como fuente de carbono y nitrógeno (Grudsky y Arias, 1983; Calsamiglia, 1997; Russell y Rychlik, 2001; Galindo y Marrero, 2005; Barboza *et al.*, 2009).

El proceso de la degradación de la fibra se inicia con la adhesión de las bacterias a partículas de fibra para formar un biofilm (Barboza *et al.*, 2009). La velocidad de adhesión es inversamente proporcional al grado de lignificación de la pared celular. La degradación de los componentes de la pared celular progresa por la acción de enzimas hidrolasas, pero varía en función del entramado tridimensional de los componentes y grado de lignificación. Las bacterias fibrolíticas utilizan vías fermentativas para obtener energía y producen glucosa o pentosas como productos intermediarios. La degradación efectiva de las bacterias fibrolíticas depende de la velocidad del tránsito ruminal (Balwin y Allison, 1983; Calsamiglia, 1997; Relling y Mattioli, 2003). El metabolismo de las hexosas hasta piruvato por la microflora ruminal se realiza principalmente por vía glicolítica. Por otro lado, el metabolismo de las pentosas presentes en las hemicelulosas ocurre vía interconversión de monosacáridos a través del ciclo de las pentosas (Nelson y Cox, 2006).

La fermentación de partículas de fibra vía microbiana, suministra energía para el crecimiento microbiano, producción de ácidos grasos volátiles (AGV), metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>; Taricska *et al.*, 2007; Kingston-Smith *et al.*, 2008). La concentración total de AGV y proporciones de cada ácido dependen de la composición de la dieta, vías metabólicas predominantes en la

fermentación microbiana y velocidad de absorción (Barboza *et al.*, 2009). La velocidad de absorción de AGV tiene relación directa con su producción y relación inversa con el pH, evitando la acumulación en rumen (Relling y Mattioli, 2003)

Los AGV son absorbidos por difusión facilitada en las células de la mucosa ruminal y por absorción mediante el paso a circulación sanguínea (Grudsky y Arias, 1983; Barboza *et al.*, 2009). Una vez absorbidos, los AGV pueden entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para oxidarse y proveer a las demandas de energía del animal o se depositan en grasa como reserva de energía (Barboza *et al.*, 2009). Los gases (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) son eliminados por la vía del eructo (Grudsky y Arias, 1983) y representan una pérdida de energía (Anrique, 2010).

De la energía fermentada en rumen alrededor de 80% es convertida en AGV, el resto es perdido como calor y metano (Grudsky y Arias, 1983; Nava y Díaz, 2001). Las vías metabólicas que intervienen en la formación de los productos finales de la fermentación anaerobia microbiana de los carbohidratos son complejas por los distintos mecanismos de reacción. Un ejemplo, es la fermentación de piruvato (producto de la glicólisis) a CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, acetato, propionato y butirato (Grudsky y Arias, 1983; Nava y Díaz, 2001; Madigan *et al.*, 2009).

El acetato predomina en el balance de producción de AGV y su producción se basa en la fermentación por bacterias celulolíticas (Anrique, 2010). La producción de acetato en rumen se produce vía piruvato mediante dos reacciones: 1) la descarboxilación oxidativa produce acetato, CO<sub>2</sub> e hidrógeno (Grudsky y Arias, 1983; Madigan *et al.*, 2009); 2) una reacción que produce acetato y formiato; este último es metabolizado a CO<sub>2</sub> e hidrógeno. El acetato es la mayor fuente de energía para los rumiantes y constituye alrededor de 90% de la concentración de AGV en la sangre periférica (Grudsky y Arias, 1983).

Las bacterias amilolíticas producen propionato durante las fermentaciones anaerobias, aunque hay bacterias celulolíticas con actividad amilolítica (Anrique, 2010). La producción de propionato en rumen ocurre por dos rutas, la descarboxilación de succinato y reducción de lactato (Grudsky y Arias, 1983; Madigan *et al.*, 2009; Anrique, 2010). El 5% de propionato ruminal se metaboliza a lactato por el epitelio ruminal y el resto se transporta a hígado como fuente de glucosa vía gluconeogénesis (Grudsky y Arias, 1983).

La producción de butirato es vía acetyl-CoA a partir de piruvato y acetato extracelular (Grudsky y Arias, 1983; Madigan *et al.*, 2009). El 50% del butirato se metaboliza en el epitelio ruminal y una pequeña cantidad pasa a hígado para metabolizarse en acetyl-CoA (Grudsky y Arias, 1983).

### **5.1.3. Factores que regulan la digestión de la fibra en rumiantes**

La digestibilidad de la materia seca se afecta a medida que maduran las plantas, debido al incremento de carbohidratos estructurales (Buxton y Redfearn, 1997; Barboza *et al.*, 2009). La digestión de la fibra en rumiantes la regulan: 1) el acceso de bacterias a los nutrientes es limitado por la estructura y composición de la pared celular; 2) la densidad de la población de microorganismos celulolíticos predominantes al momento de digerir la fibra; 3) la adhesión genética de las bacterias que controlan la adhesión a partículas de fibra, así como la producción y liberación de enzimas hidrolíticas; y 4) la disponibilidad de nutrientes en animales a través de la masticación, salivación y cinética del tránsito (Varga y Kolver, 1997).

La digestión de la celulosa se limita por la disponibilidad de sitios en el material vegetal y no por una baja actividad celulolítica (Forsberg *et al.*, 2000). La degradación de la celulosa depende del grado de unión a sustancias refractarias a la digestión (lignina, sílice, cutina) y propiedades intrínsecas (grado de cristalinidad, grado de polimerización; Stern *et al.*, 1994).

## **5.2. Bacterias celulolíticas ruminales en el metabolismo de la fibra**

Las actividades metabólicas de las bacterias ruminales son *a)* degradación de polímeros vegetales hasta sus subunidades monoméricas; y *b)* fermentación subsecuente en la producción de energía, esqueletos carbonados y amonio para biosíntesis microbiana (Arias, 1982). Las bacterias tienen acceso a los tejidos internos fácilmente digeribles a través de estomas, lenticelas o áreas dañadas. La digestión de la fibra por bacterias celulolíticas es de adentro hacia afuera (Varga y Kolver, 1997).

### **5.2.1. Descripción de bacterias celulolíticas**

Las bacterias fibrolíticas importantes son *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* (Morales y Dehority, 2009; Wanapat y Cherdthong, 2009; Matsui *et al.*, 2010). Las bacterias fibrolíticas degradan estructuras fácilmente digeribles como las células del mesófilo. Sin embargo, *F. succinogenes* digiere parénquima, paredes de células epidérmicas y esclerénquima de la hoja (Varga y Kolver, 1997; Shinkai y Kobayashi, 2007). Las bacterias fibrolíticas representan de 0.3-4% de la población microbiana del rumen (Forsberg *et al.*, 2000).

#### **5.2.1.1. *Fibrobacter succinogenes***

Por la singularidad de la secuencia de RNA16S de *Bacteroides succinogenes* se renombró como *Fibrobacter succinogenes* y fue clasificado como único género en el *Phylum Fibrobacteres* (Brumm *et al.*, 2011). *F. succinogenes* se clasifica dentro del *Dominio Bacteria*; *Phylum Fibrobacteres*; *Orden Fibrobacterales* y *Familia Fibrobacteraceae* (Spain *et al.*, 2010; ExPasy, 2011). Es una bacteria celulolítica, bacilo Gram negativo, mesófila, no tiene estado de reposo, inmóvil, no forma esporas, estrictamente anaerobia, diámetro de 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  y de 0.8 a 2.0  $\mu\text{m}$  de longitud (Lynd *et al.*, 2002; Krieg *et al.*, 2010; ExPasy, 2011; Ransom-Jones *et al.*, 2012). *F. succinogenes* crece en glucosa, celobiosa, lactosa y celulosa, pero no en xilosa y xilano (Brumm *et al.*, 2011). La bacteria

es considerada el principal biodegradador de polímeros de la pared celular (Qi *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008; Ransom-Jones *et al.*, 2012).

Las bacterias de este género hidrolizan celulosa a glucosa para utilizarla como sustrato de crecimiento y generar energía como ATP (UE, 2011). *F. succinogenes* digiere fibra con mayor velocidad e hidroliza más celulosa cristalina que el género *Ruminococcus*. La bacteria también sintetiza xilanasas, pero no utilizan los productos obtenidos de la hidrólisis del xilano, si no que actuarían para exponer la celulosa unida a hemicelulosa. *F. succinogenes* se considera filogenéticamente diversa (4 grupos) por los análisis genéticos de la secuencia 16S rDNA y la hibridación DNA-DNA (Kobayashi *et al.*, 2008).

Robert Hungate fue el primer investigador en aislar *F. succinogenes* del rumen bovino en 1947. El ácido butírico no es un producto en la fermentación de carbohidratos de *F. succinogenes*. La bacteria se une fuertemente a la superficie de la fibra mediante adhesinas. Se han identificado alrededor de 13 proteínas de unión a celulosa y 31 genes se han correlacionado con la traducción de celulasas. Es una especie difícil de aislar y cultivar en laboratorio (Ransom-Jones *et al.*, 2012).

#### **5.2.1.2. *Ruminococcus flavefaciens***

*Ruminococcus flavefaciens* se clasifica en el Dominio Bacteria; Phylum Firmicutes; Orden Clostridiales y Familia Ruminococcaceae. Son cocos inmóviles, miden de 0.3-1.5X0.7-1.8 µm, estrictamente anaerobio, tinción Gram positiva, no esporulada, hidroliza pectina, negativo a catalasa (Krause *et al.*, 1999; De Vos *et al.*, 2009), cuando son elongadas tienen extremos planos, redondeados o puntiagudos en forma de lanceta. La bacteria presenta arreglos dicocos, poca motilidad con uno o tres flagelos. *R. flavefaciens* se distingue en la familia Ruminococcaceae por la presencia del ácido meso-diaminopimélico en la posición tres del peptidoglicano y un pigmento amarillo (Murray *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1999).



Los nutrientes son obtenidos por rompimiento de celulosa y es capaz de fermentar glucosa y xilosa. *R. flavefaciens* posee celulosomas que son estructuras ancladas a la pared celular bacteriana y conecta varios módulos de enlace que posee carbohidratos y actividades celulasa-hemicelulasa (Miron *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 2008). La bacteria tiene la capacidad de fermentar celobiosa y lactosa. Los principales productos en la fermentación son acetato, formato y succinato. El contenido de citosina-guanina es 16-44% (De Vos *et al.*, 2009).

### **5.2.1.3. *Ruminococcus albus***

*Ruminococcus albus* pertenece al Dominio Bacteria; Phylum Firmicutes; Orden Clostridiales y Familia Ruminococcaceae. Son bacterias estrictamente anaerobias, inmóviles, cocos, no producen esporas, forman cadenas de cocos, tinción Gram positiva, negativo a catalasa. Se encuentra en heces humanas, rumen y otros mamíferos herbívoros (De Vos *et al.*, 2009; Microbewiki, 2011). La celulosa, xilano y celobiosa los utiliza como fuentes de carbono. La bacteria tiene una amplia gama de actividades enzimáticas:  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa, galactosidasa,  $\beta$ -1-arabinosidasa, celulasas, poligalacturonasa y xilanasas. *R. albus* produce concentraciones micromolares de ácidos fenilacético y fenilpropiónico utilizados en la formación del glucocálix (Ezer *et al.*, 2008; Hwan *et al.*, 2011).

Su actividad celulolítica en fibra se demostró en rumen mediante la adhesión a celulosa y excreción de enzimas celulolíticas en la superficie celular. El metabolismo de la glucosa por *R. albus* produce metabolitos primarios como etanol, acetato y succinato, además de H<sub>2</sub> como metabolito secundario (Asanuma *et al.*, 2009). La bacteria tiene la capacidad de fermentar celobiosa, glucosa, manosa, sacarosa y lactosa. Los mayores productos de desecho en la fermentación son acetato y formato. El contenido de citosina-guanina es 43-46% (De Vos *et al.*, 2009).

### **5.2.2. Digestión de la fibra por bacterias celulolíticas**

La adhesión de las bacterias es un mecanismo importante para la degradación de la pared celular, ya que es una estrategia microbiana donde se adhieren a la fibra para su digestión y reproducción. El proceso en rumen se divide en cuatro fases: 1) transporte de las bacterias al sustrato fibroso; 2) adhesión inicial no específica de las bacterias a sitios apropiados del sustrato; 3) adhesión específica entre las bacterias adheridas y el tejido digerible a través de vínculos amplios y adhesinas; y 4) proliferación en colonias de las bacterias adheridas en sitios específicos de la fibra (Blanco, 1999; Forsberg *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001).

El primer contacto entre bacterias y fibra depende del tamaño de la población celulolítica así como del tamaño y cantidad del sustrato, porque las bacterias celulolíticas son inmóviles al carecer de flagelos o cilios. La adhesión se presenta por dos medios de transporte. *a)* El transporte no específico comienza por la atracción entre partículas de la fibra y bacterias celulolíticas por iones o asociación hidrofóbica por las fuerzas de Van Der Waals. *b)* El transporte específico de las bacterias al sustrato es a través de complejos de proteínas llamadas adhesinas y la formación del glucocálix (glucoproteína delgada que se adhiere fuertemente a la celulosa). Cuando el glucocálix se forma, inicia la proliferación y colonización de las bacterias celulolíticas en fibra y se inicia el proceso digestivo (Blanco, 1999; Forsberg *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001).

Una especie microbiana por si sola es incapaz de producir las enzimas necesarias para digerir la pared celular, por tanto las bacterias se asocian fisiológicamente para combinar la producción de enzimas hidrolíticas (Blanco, 1999; Forsberg *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001). Por ejemplo, *R. flavefaciens* predomina en la superficie de la fibra sin actuar en epidermis, floema y esclerénquima; mientras *F. succinogenes* coloniza los bordes de la célula, floema y xilema (Miron *et al.*, 2001).

Es importante señalar lo siguiente:

- a) Las bacterias se adhieren a la fibra en los primeros 5 min después de su ingestión mediante transporte específico y no específico.
- b) El glucocálix sirve como protector y estabilizador de las enzimas digestivas sintetizadas por las bacterias, así como para protegerlas de los fagos.
- c) Las bacterias se dividen para producir células hermanas y pozos digestivos que se hacen visibles en la superficie de la partícula de fibra.
- d) Las bacterias primero colonizan estomas, lenticelas y área dañadas para penetrar y hacer una digestión de adentro hacia afuera.
- e) Algunas partes del glucocálix se separa de la partícula de fibra y otra permanece unido a la partícula de fibra y pasa al retículo (McAllister *et al.*, 1994).

### **5.2.3. Factores que afectan la adhesión de las bacterias a la fibra**

En rumen existen factores que influyen sobre la adhesión de las bacterias celulolíticas a partículas de la fibra:

- a) *Competencia microbiana*. Los hongos del rumen pueden inhibir la actividad enzimática de bacterias fibrolíticas.
- b) *O<sub>2</sub>*. *F. succinogenes* disminuye 80% su capacidad de adhesión después de 5 min de exposición al O<sub>2</sub>, pero en *R. albus* y *R. flavefaciens* no se afecta la capacidad de adhesión.
- c) *Temperatura*. Disminuye la adhesión en su totalidad en las tres bacterias a 4 ó 50 °C; pero no afecta si se mantiene a 38°C.
- d) *pH*. El efecto del pH en la adherencia de las bacterias celulolíticas a la celulosa varía de acuerdo a la especie. El pH óptimo de *R. albus* para una eficiente adhesión es 5.5 a 8, cuando desciende el pH a 5 se pierde eficiencia de adhesión. *F. succinogenes* mantiene su adhesividad entre 5.3 a 6.8. *R. flavefaciens* presenta descenso de 55% de su adhesión con pH 4 y no presenta cambios a pH 6.

- e) *Cationes*. Los cationes bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  aumentan la adhesión de *R. flavefaciens*, sin alterar a *R. albus* y *F. succinogenes*.
- f) *Otros*. El aumento de fuerzas iónicas producen incremento en la adhesión de *R. albus* y *F. succinogenes*. En contraste, el formaldehído disminuye la adhesión de *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* (Blanco, 1999; Forsberg *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001).

#### **5.2.4. Sistemas enzimáticos de celulasas**

Las bacterias fibrolíticas producen múltiples enzimas para degradar los materiales de las células vegetales. Los tres principales sistemas de actividad enzimática son: *a)* endoglucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4); *b)* exogluconasa, incluye glucanohidrolasas 1,4- $\beta$ -D-glucano (celodextrinasas; EC 3.2.1.74) y celobiohidrolasas 1,4- $\beta$ -D-glucano (celobiohidrolasas; EC 3.2.1.91); y *c)*  $\beta$ -glucosidasas o glucohidrolasas  $\beta$ -glucósido (CE 3.2.1.21 ) (Malherbe y Cloete, 2002; Lynd *et al.*, 2002; Ponce y Pérez, 2002; Aro *et al.*, 2005; Valáskova y Baldrian, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

Los sistemas de celulasas son más que una aglomeración de enzimas, ya que actúan de manera coordinada para hidrolizar la celulosa de manera eficiente. Primero, las endoglucanasas rompen al azar los enlaces internos de la molécula en regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Segundo, las exoglucanasas remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir de extremos libres de celulosa. Finalmente,  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa que sirve como fuente de carbono (Malherbe y Cloete, 2002; Lynd *et al.*, 2002; Valáskova y Baldrian, 2006; Kumar *et al.*, 2008; la Grange *et al.*, 2010).

Las bacterias anaerobias carecen de capacidad para penetrar con eficacia el material celulolítico. Las bacterias activan mecanismos alternativos para

hidrolizar celulosa en presencia de otros microorganismos y/o limitada cantidad de energía (ATP) para producir enzimas (Forsberg *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001; Lynd *et al.*, 2002).

Los sistemas de celulosomas se encuentran en ambientes anaerobios. Estos sistemas sirven para reducir la distancia entre los productos de la hidrólisis y la bacteria; porque la actividad enzimática se produce en las proximidades de la célula bacteriana. Las celulosomas son protuberancias estables de complejos enzimáticos que están firmemente unidas a la pared celular bacteriana (*Ruminococcus*), pero lo suficientemente flexibles para unirse a la celulosa microcristalina (Forsberg *et al.*, 2000; Miron *et al.*, 2001; Lynd *et al.*, 2002).

#### **5.2.5. Catabolismo fermentativo y productos finales**

Las bacterias celulolíticas metabolizan la glucosa a glucosa-6-fosfato para usarla en la ruta Embden-Meyerhoff del catabolismo del azúcar. Todas las especies producen ácido acético y CO<sub>2</sub>. La bacteria *F. succinogenes* produce acetato y succinato como productos finales de sus vías fermentativas. El succinato se libera en el medio y es utilizado por otras bacterias (*Selenomonas* y *Veillonella*) para generar propionato. Los rumiantes absorben y utilizan el acetato como fuente de energía (Lynd *et al.*, 2002; UE, 2011).

Los productos finales de *R. flavefaciens* son acetato, succinato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. *R. albus* produce acetato, etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>; sin embargo, en presencia de microorganismos metanógenos incrementa la producción de acetato y disminuye etanol (Lynd *et al.*, 2002; UE, 2011). Acetil-CoA es un punto de ramificación clave que se asocia al flujo de carbono para la producción de etanol, acetato y succinato. El succinato se convierte a propionato (sustrato de la gluconeogénesis en el rumiante) por otras bacterias. La producción de

succinato es a través de la fijación neta de CO<sub>2</sub> por PEP-carboxiquinasa, con conversión posterior a oxaloacetato, malato y succinato (Lynd *et al.*, 2002).

### **5.3. Conservación de bacterias**

Los microorganismos son fundamentales en los ciclos biogeoquímicos y su conservación y preservación son prioridad en los laboratorios de microbiología por el potencial biotecnológico que representan. Los recursos microbianos deben conservarse en buen estado fisiológico y genéticamente estables (García-Uruburu, 2000; Morales-García *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013). Los principales métodos de conservación son crecimiento continuo, secado y congelación. En el crecimiento continuo, los microorganismos se cultivan en agar y se almacenan a temperaturas de 5 a 20 °C, cuyo periodo de almacenamiento máximo es de 30 días, posteriormente se transfieren en nuevos medios con agar (Kumar *et al.*, 2013).

El método de secado se usa en microorganismos que producen esporas u otras estructuras de reposo. El gel de sílice, perlas de vidrio y suelo son sustratos utilizados en esta metodología (Kumar *et al.*, 2013). La literatura sobre el método de secado y la preservación de microorganismos es muy amplia, pero a menudo es específico de una cepa en particular (Morgan *et al.*, 2006).

Los métodos por congelación son liofilización, crioconservación, vapor de nitrógeno líquido o congelador a baja temperatura. En la liofilización el microorganismo se congela y posteriormente se seca al vacío. Es un método de conservación permanente para bacterias, actinomicetos, levaduras y hongos (Kumar *et al.*, 2013). La comprensión del proceso de liofilización y los factores que afectan la capacidad de los microorganismos para sobrevivir al proceso han mejorado en años recientes (Morgan y Vesey, 2009).

Los factores que influyen en los resultados de la conservación de bacterias por liofilización son: tipo de microorganismo, concentración celular, temperatura durante la sublimación, grado de deshidratación logrado, atmósfera del vial donde se conservará el microorganismo y las condiciones de almacenamiento (García y Urubu, 2000). Sin embargo, el tipo de microorganismo y la infraestructura del laboratorio determinan el método de conservación a utilizar (Morales-García *et al.*, 2010).

### **5.3.1. Proceso de liofilización**

El secado por congelación también se conoce como liofilización. Es un proceso donde las células se congelan en un medio con lioprotector y posteriormente se elimina el agua mediante sublimación (Perry, 1995; Mellor y Bell, 2003; Morgan y Vesey, 2009; Kumar *et al.*, 2013). La sublimación es un fenómeno físico donde un sólido se convierte en vapor sin pasar por el estado líquido (Mellor y Bell, 2003; Morgan y Vesey, 2009). El secado por congelación involucra el cultivo de microorganismos en condiciones que mejoren la tolerancia al proceso, la optimización de un lioprotector y las condiciones de secado. Los microorganismos varían su tolerancia a la liofilización. En general, las bacterias Gram positivas muestran mejor tolerancia que las Gram negativas. Además, diferentes cepas de la misma especie pueden comportarse de manera distinta durante el proceso (Perry, 1995; Morgan y Vesey, 2009).

Una desventaja es que no todos los microorganismos reaccionan de la misma manera por lo se requiere de pruebas para optimizar el proceso de cada cepa (Leslie *et al.*, 1995; Perry, 1998; Kumar *et al.*, 2013). La baja concentración de bacterias después de un proceso de liofilización se puede asumir al lioprotector utilizado, la concentración inicial de bacterias o el estado fisiológico de las células (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006). El cambio de pH produce diferencias morfológicas visibles en las células y el estrés ocasionado

desencadena regularmente una tolerancia mejor al proceso de liofilización (Morgan *et al.*, 2006).

Las cuatro consideraciones para la conservación de bacterias por liofilización son: *a)* medio de cultivo y preparación de células; *b)* suspensión de las bacterias en un medio adecuado para liofilización; *c)* el proceso es dependiente del equipo para liofilizar y la cantidad de muestras a conservar; y *d)* almacenamiento después de liofilizar (Kumar *et al.*, 2013).

#### **5.3.1.1. Selección del medio de liofilización**

Las bacterias deben suspenderse en medios que proporcionen viabilidad a través de la congelación, eliminación de agua y almacenamiento (Kumar *et al.*, 2013). En bacterias, la fructosa y el sorbitol proporcionan mejores estándares de crecimiento que la glucosa (Morgan *et al.*, 2006). Los investigadores no consideran que el medio de crecimiento tenga efecto sobre la supervivencia de los microorganismos. Los estudios se orientan en el uso de lioprotectores y los efectos de la fase de crecimiento (Morgan *et al.*, 2006).

#### **5.3.1.2. Cultivo de las bacterias**

El proceso de liofilización presenta mejores resultados cuando se usan células en crecimiento activo. Algunos investigadores cultivan en un medio líquido, posteriormente concentran las bacterias mediante centrifugación y suspenden en medios para liofilizar. Esta técnica asegura altas concentraciones de bacterias y retiene células viables después de un prolongado almacenamiento. Las concentraciones son menores cuando se inocula en medios de liofilización. Los volúmenes pequeños son permisibles y aceleran el proceso de secado, de modo que el volumen máximo debe ser 1/3 de la capacidad del vial (Kumar *et al.*, 2013).



### **5.3.1.3. Congelación**

La velocidad de congelación afecta la viabilidad y supervivencia de las bacterias. La congelación lenta forma cristales de hielo que genera canales para un mejor secado y evita daños en membranas. La congelación rápida minimiza daños por formación de cristales (Morgan y Vesey, 2009), genera preservación de viabilidad celular, pero dificulta la eliminación del agua. La congelación rápida crea un bloque sólido disminuyendo la formación de canales por lo que el tiempo de secado es mayor (Kumar *et al.*, 2013).

### **5.3.1.4. Secado**

Es la etapa donde se elimina el agua congelada por sublimación (Morgan y Vesey, 2009). El uso de volúmenes pequeños beneficia el proceso de secado porque el agua se elimina rápidamente dada la superficie de contacto. El secado secundario ayuda a forzar la salida de agua residual mediante el aumento de temperatura en la muestra. Un ejemplo, es el uso de secadores de estante donde las muestras se colocan a una temperatura de 20 °C por varias horas. La aplicación de temperaturas más altas afecta fisiológicamente las bacterias liofilizadas (Kumar *et al.*, 2013). Si el producto se descongela o se derrite durante el proceso de secado, la ebullición del agua produce colapsos en los productos (Morgan y Vesey, 2009). La temperatura de almacenamiento ideal es a 4 °C y en sitios que no formen humedad (Kumar *et al.*, 2013).

### **5.3.2. Lioprotectores**

La viabilidad de bacterias liofilizadas se mejora con sustancias que actúan como lioprotectores. Sin embargo, el tipo de lioprotector debe adecuarse a los requerimientos de la bacteria a resguardar. El punto limitante del método de liofilización es el escaso conocimiento sobre la conservación de bacterias (Morgan y Vesey, 2009; Morales-García *et al.*, 2010).

Los lioprotectores se añaden durante el crecimiento del microorganismo, antes de la congelación o en el secado. Algunos lioprotectores funcionan en varias especies. Los lioprotectores usados en bacterias incluyen sólidos no grasos de la leche, suero, adonitol, etc. Los lioprotectores se clasifican en dos categorías: formadores de vidrio amorfo y sales cristalinas eutécticas (Morgan *et al.*, 2006; Morgan y Vesey, 2009).

Los formadores de vidrio amorfo muestran mejor protección durante la liofilización porque inducen viscosidad dentro y fuera de la célula que produce movilidad mínima molecular. Este tipo de lioprotectores retienen productos liberados por las células dentro de la estructura de cristal antes de la congelación. Las sales eutécticas generan estructuras cristalinas del medio de crecimiento y los solutos contenidos se cristalizan a diferentes temperaturas. Sin embargo, la formación de estos cristales daña la membrana de la célula y/o genera daños irreversibles (Morgan *et al.*, 2006; Morgan y Vesey, 2009).

Existen estudios donde el uso de lioprotectores en la conservación de bacterias son disacáridos como la trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006) y la hidroxietilcelulosa (Manzera *et al.*, 2004). El fundamento del uso de disacáridos es porque sustituyen las moléculas de agua de la célula durante el proceso de congelación (Morales-García *et al.*, 2010). Cuando se adiciona trehalosa como lioprotector, la célula la transporta dentro del citoplasma y estabiliza la membrana citoplasmática durante la desecación. Cabe señalar, la acumulación de trehalosa intracelular sólo es posible cuando el microorganismo no tiene la capacidad de usarla como fuente de carbono (Morgan *et al.*, 2006). En bacterias Gram negativas se ha utilizado mioinositol como lioprotector (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006).

El glicerol no funciona como lioprotector debido al elevado punto de evaporación e higroscopicidad. Los productos liofilizados con glicerol como lioprotector tienen la característica de ser viscosos. El dimetilsulfóxido no se

recomienda como lioprotector, porque es tóxico y daña las células microbianas cuando termina el proceso por incremento en su concentración (García y Urubu, 2000).

## LITERATURA CITADA

- Anrique, R. G. 2010. Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono. *In: Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa*. Editores: Contreras, P. A. y M. Noro. 3ª ed. Valdivia: América. 25-36 pp.
- Arias, J. L. 1982. Aspectos generales de la biología del rumen. *Monografías de Medicina Veterinaria*. 4(1):1-19.
- Aro, N., T. Pakula and Penttilä. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:719-739.
- Asanuma, N., K. Yoshizawa, K. Kanada and, T. Hino. 2009. Molecular and biochemical characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Curr. Microbiol.* 58:416-420
- Bach, A. y S. Calsamiglia. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿química o física?. *In: XXII Curso de especialización FEDNA*. Barcelona, España. 16 p.
- Barboza, S. P., K. L. Parkey and, I. D. Hume. 2009. *Integrative wildlife nutrition*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany. 342 p.
- Bayer, E. A., R. Lamed, B. A. White and, H. J. Flint. 2008. From cellulosomes to cellulosomics. *Chem. Rec.* 8(6):364-377.
- Blanco, M. R. 1999. Adhesión microbiana en el rumen. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Argentina.
- Breznak, J. A. and A. Brune. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39:453-487.
- Brumm, P., D. Mead, J. Boyum, C. Drinkwater, K. Gowda, D. Stevenson and, P. Weimer. 2011. Functional annotation of *Fibrobacter succinogenes* S85 carbohydrate active enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163:649-657.

- Buxton, D. R. and D. D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *In: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. J. Nutr. Supplement.* 814s-818s.
- Cai, S., J. Li, F. H. Ze, K. Zhang, Y. Luo, B. Janto, R. Boissy, G. Ehrlich and X. Dong. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 76(12):3818-3824.
- Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. *In: XIII Curso de especialización FEDNA. Madrid, España.* 16 p.
- Chen, Y., G. B. Penner, M. M. Oba and, L. L. Guan. 2011. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(16):5770-5781.
- Church, D. C. 1993. *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición.* Zaragoza, España. Ed. Acribia. 641 p.
- Church, D. C., K. R. Pond y W. G. Pond. 2004. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 2ª Edición.* México, D.F. Limusa. 2004. 635 p.
- De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey. K. Schleifer and, W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. Vol. 3. The Firmicutes.* Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 1422 p.
- Galindo, J. y Y. Marrero. 2005. Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. *Rev. Cubana Ciencia Agrícola.* 39:439-459.
- García, L. M. D. y F. F. Uruburu. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM.* 30: 12-16.
- Expasy. 2011. HAMAP: *Fibrobacter succinogenes* (strain ATCC 19169 / S85) complete proteome. Consulta: 17/03/2011.  
<http://expasy.org/sprot/hamap/FIBSS.html>
- Ezer, A., M. Erez, S. Jindou, I. Borovok, N. Atamma, Z. Yu, M. Morrison, E. E. Bayer and, R. Lamed. 2008. Cell surface enzyme attachment is mediated by family 37 carbohydrate-binding modules unique to *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* 190(24):8220-8222.
- Flint, H. J. and K. P. Scott. 2000. Genetics of rumen microorganisms: gene transfer, genetic analysis and strain manipulation. *In: Ruminant Physiology. Digestion,*

- metabolism, growth and reproduction. P. B. Cronje Edited. Department of animal and wildlife sciences. University of Pretoria. Pretoria, South Africa. 389-408 pp.
- Forsberg, C. W., E. Forano and, A. Chesson. 2000. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. *In: Ruminant Physiology. Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction.* P. B. Cronje, editor. CABI publishing. Pretoria, South Africa. 79-97 pp.
- Gregg, K., D. Schafer, C. Cooper and G. Allen. 1995. Ruminants and rumen microorganisms in tropical countries. *In: Rumen Ecology Research Planning.* Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. 227-240 pp.
- Grudsky, P. R. y J. L. B. Arias. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. *Monografías de medicina veterinaria.* Universidad de Chile. 5(2). 13 p.
- Hwan, Y. M., M. Iakiviak, S. Bauer, R. I. Mackie and, I. K. O. Cann. 2011. Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium *Ruminococcus albus* 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15):5157-5169.
- Juárez, R. A. S., M. A. S. Cerrillo, E. O. Gutiérrez, E. M. T. Romero, J. N. Coín y H. B. Bernal. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Tec Pec Méx.* 47(1):55-67.
- Jung H. G. and M. S. Allen. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774-2790.
- Kingston-Smith, A. H., T. E. Davies, J. E. Edwards and, M. K. Theodorou. 2008. From plants to animals: the role of plant cell death in ruminant herbivores. *J. Exp. Bot.* 59(3):521-532.
- Kobayashi, Y., T. Shinkai and, S. Koike. 2008. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion – review. *Folia Microbiol.* 53(3):195-200.
- Krause, D. O., B. P. Dalrymple, J. W. Smith, R. I. Mackie and, C. S. McSweeney. 1999. 16s rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiol.* 145: 1797-1807.

- Kuhad, R. C., A. Singh and, K. L. Eriksson. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 57:45-125.
- Kumar, S. S., G. Sczakas, C. R. Soccol & A. Pandey. 2008. Production of enzymes by solid-state fermentation. *In: Current developments in solid-state fermentation.* Asiatech publishers, INC. 183-204.
- Kumar, S., P. L. Kashyap, R. Singh, and A. K. Srivastava. 2013. Preservation and maintenance of microbial cultures. Chapter 11. *In: Analyzing microbes. Manual of molecular biology techniques.* Editors: D. A. Kumar, S. Das, and M. Sukumar. Springer Protocols Handbooks. 135-152 p.p.
- la Grange, D. C., R. W. den Haan and, W. H. van Zyl. 2010. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:1195-1208.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 399-426.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10): 3592-3597.
- Liu, L., Y. Feng, C. J. Duan, H. Pang, J. L. Tang and, J. X. Feng. 2009. Isolation of a gene encoding endoglucanase activity from uncultured microorganisms in buffalo rumen. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1035-1042.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl and, I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-577.
- Malherbe S. & T. E. Cloete. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Rev. Environ Sci. Biotechnol.* 1:105-114.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap y D. P. Clark. 2009. Brock, *Biología de los microorganismos.* 12 ed. Pearson. México. 1215 p.
- Manzanera, M., S. Vilchez, and A. Tunnacliffe. 2004. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:347-352.
- Matsui, H., T. Ban-Tokuda and, M. Wakita. 2010. Detection of fiber-digesting bacteria in the ceca of ostrich using specific primer sets. *Curr. Microbiol.* 60:112-116.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones and, K. J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72:3004-3018.

- Mellor, J. D. and G. A. Bell. 2003. Freeze-drying | The basic process. *In: Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Second edition. L. Trugo and P. M. Finglas (eds). 2967-2701 pp.
- Microbewiki. 2011. *Ruminococcus*. Consulta: 17/03/2011.  
<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Ruminococcus>
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia and, M. Morrison. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* 84:1294-1309.
- Moore, K. J. and H. G. Jung. 2001. Lignin and fiber digestion. *J. Range Manag.* 54(4):420-430.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez-y-Terrón, y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología.* 14(02): 11-29.
- Morales, M. S. and B. A. Dehority. 2009. Ionized calcium requirement of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* 92(10):5079-5091.
- Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J. Microbiol. Methods.* 66:183-193.
- Morgan, C., and C. Vesey. 2009. Freeze-Drying of microorganisms. *In: Encyclopedia of Microbiology.* M. Schaechter (ed). Third edition. 162-173 pp.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1):472-477.
- Murray, R. G., D. Chairman, J. Brenner, P. Marvin, N. R. Krieg, W. James, P. H. A. Sneath and, J. Staley. 1986. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. ED. Williams & Wilkins. Baltimore MD. USA.
- Nava, C. C. y A. C. Diaz. 2001. Introducción a la digestión ruminal. Departamento de Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Nelson, D. L. y M. M. Cox. 2006. *Lehninger, Principios de Bioquímica*. 4ta edición. Barcelona, España. 1119 p.
- Nouaille, R., M. Matulova, V. Pätoprstý, A. Delort and, E. Forano. 2009. Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* S85 growing on sugars, cellulose and wheat straw. *App. Microbiol. Biotechnol.* 83:425-433.

- Oba, M. 2011. Review: effects of feeding sugar on productivity of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 91:37-46.
- Özköse, E., M. S. Ekinçi and, N. Özcan. 2001. Physiological studies on the plant cell wall degrading enzymes of the rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Turk. J. Biol.* 25: 113-122.
- Perry, S. F. 1995. Freeze-Drying and cryopreservation of bacteria. *Methods. Mol. Biol.* 38:21-30.
- Perry, S. F. 1998. Freeze-Drying and cryopreservation of bacteria. *Mol. Biotechnol.* 9(1):59-64.
- Ponce, N. T. y A. O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *In: XXX Aniversario de Biotecnología y bioingeniería. Avance y Perspectiva.* 21: 273-277.
- PSU. 1996. From Feed to Milk: Understanding Rumen Function. Extension circular 422. Pennsylvania State University.
- Qi, M., H. Jun and, C. W. Forsberg. 2007. Characterization and synergistic interactions of *Fibrobacter succinogenes* glycoside hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(19):6098-6105.
- Qi, M., H. Jun and, C. W. Forsberg. 2008. Cel9D, an Atypical 1,4- $\beta$ -D-Glucan glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: Characteristics, catalytic residues, and synergistic interactions with other cellulases. *J. Bacteriol.* 190(6):1976-1984.
- Ransom-Jones, E., D. L. Jones, A. J. McCarthy and, J. E. McDonald. 2012. The *Fibrobacteres*: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microb. Ecol.* 63:267-281.
- Relling, A. E. y G. A. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. 72 p.
- Russell, J. B. and, J. L. Rychlik. 2001. Factors alter rumen microbial ecology. *Sci. New Ser.* 292(5519):1119-1122.
- SAGARPA. 2009. Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado. México, DF. 8 p.
- Shinkai, T. and Y. Kobayashi. 2007. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous material as determined by fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5):1646-1652.



- SIAP. 2011. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Consulta: 20/06/2011.
- Spain, A. M., C. W. Forsberg and, L. Krumholz. 2010. *Phylum XVII. Fibrobacteres* Garrity and Holt 2001. *In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Krieg, N. R., J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig and, W. B. Whitman (eds). Second Ed. Vol. 4. Springer Science+Business Media. 737-746 pp.
- Stern, M. S., S. Calsamiglia y M. I. Endres. 1994. Dinámica del metabolismo de los carbohidratos y del nitrógeno en el rumen. *In: X Curso de especialización FEDNA*. Madrid, España. 18 p.
- Taricska, J. R., D. A. Long, J. P. Chen, H. Yung-Tse and, Z. Shuai-Wen. 2007. Anaerobic digestion. *In: Biosolids treatment processes*. Wang, L.K., N. K. Shamma and, y. Hung (eds). Vol. 6. Handbook of Environmental Engineering. Totowa, New Jersey. 135-176 pp.
- UE. 2011. Fibrobacter y Ruminococcus. The University of Edinburg. Consulta: 17/03/2011.  
<http://www.link.vet.ed.ac.uk/clive/cal/rumencal/frames/frmfibro.html>  
<http://www.link.vet.ed.ac.uk/clive/cal/rumencal/frames/frmrumen.html>
- Valáskova, V. and P. Baldrian. 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiol.* 152: 3613-3622.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Varga, A. G. and E. S. Kolver. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *J. Nutr.* 127(5):8195-8235.
- Wanapat, M. and A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58:294-299.
- Warren, R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 183-212.
- Wong, D. W. S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157:174-209.

- Yokoyama, M. T., and K. A. Johnson. 1993. Microbiología del rumen e intestino. *In:* El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (eds). Acribia, S. A. ed. Zaragoza, España. 137-158 pp.
- Zavaleta, E. 1976. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. *Ciencia Veterinaria*. 1: 223-240.

# **Capítulo 1 . AISLAMIENTO DE UNA BACTERIA RUMINAL CELULOLÍTICA Y SU CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN *IN VITRO* EN COCULTIVO CON BACTERIAS RUMINALES TOTALES**

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

Las bacterias celulolíticas anaerobias aisladas se clasifican en cinco categorías: actinomicetos, formadores de esporas termófilas, bacilos, no formadores de esporas y cocos (Hungate, 1950). Los principales géneros de bacterias celulolíticas anaerobias son: *Acetivibrio*, *Anaerocellum*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Desulfurococcus*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fibrobacter*, *Halocella*, *Ruminococcus*, *Spirochaeta* y *Thermotoga* (Tsavkelova y Netrusov, 2012). En el rumen sólo algunas bacterias celulolíticas se han cultivado y representan el 2% del RNAr 16S de las bacterias ruminales, entre las que destacan *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* (Cai *et al.*, 2010).

Publicaciones anteriores a 1950 sobre aislamiento de bacterias anaerobias dejan dudas sobre el procedimiento; aunque las bacterias se hayan aislado con éxito, las técnicas descritas eran confusas y los criterios usados no fueron rigurosos que dejan duda de la pureza de los cultivos axénicos (Hungate, 1950). Hungate (1950) publica la primera metodología capaz de ser reproducible para el aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias. En 1969, Hungate describió una técnica denominada “Método del tubo rodado para el cultivo de bacterias anaerobias estrictas”. En 1972, Bryant publicó diversos comentarios que mejoraron la técnica de Hungate (1969). La técnica descrita por Hungate en 1950 se ha modificado en muchos aspectos con la finalidad de adaptarse a las necesidades de estudio y las particularidades de cada científico (Bryant, 1972).

## **1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El experimento se desarrolló en una campana de bioseguridad Labconco con purificador de clase II provista de rayos ultravioleta.

### **1.2.1. Aislamiento de la bacteria celulolítica ruminal**

Se obtuvo fluido ruminal de una vaca Jersey con cánula ruminal. El fluido ruminal se centrifugó 1,157 g a 25 °C por 3 min en una centrifuga Eppendorf 5804. Se tomó el sobrenadante y se utilizó como inóculo inicial. La preparación de los medios de cultivo celulolíticos líquidos y sólidos (Cuadro 1.1) se realizó con base en la técnica de Hungate (1969) modificada por Bryant y Robison (1962) y Cobos y Yokoyama (1995). Los medios de cultivo antes de ser vertidos se esterilizaron 121 °C a 15 PSI por 15 min en una esterilizadora Tuttnover 2540F. Los procesos de inoculación y preparación de medios de cultivo selectivos celulolíticos se realizaron bajo flujo continuo de CO<sub>2</sub> para conservar condiciones de anaerobiosis. Los medios de cultivo antes de utilizarlos se incubaron a 39 °C por 72 h en una incubadora Riossa modelo EO-71 para comprobar esterilidad.

El primer medio selectivo se preparó con base en papel Whatman-fluido ruminal (W-FR). En tubos de cultivo (18x150 mm) se colocó una tira de papel Whatman (3x30 mm) y se adicionaron 9 mL de medio W-FR (Cuadro 1.1). Un tubo de cultivo se inoculó con 1 mL de inóculo inicial (3 repeticiones independientes) y se incubó a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (72 h). Cuando se degradó el papel Whatman, se transfirió 1 mL a otro tubo de cultivo con medio W-FR y se incubó a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (72 h). Se realizaron 3 transferencias totales en medio W-FR.

### **1.2.1.1. Primera prueba de degradación *in vitro* de materia seca**

La primera prueba de degradación *in vitro* se realizó para corroborar el proceso de aislamiento de una bacteria celulolítica y comparar su capacidad de degradación *in vitro* con bacterias ruminales totales (BRT). Los sustratos fueron pasto bermuda molido (1 mm Ø) y celulosa cristalina a peso constante. Los inóculos fueron: *a)* consorcio de bacterias celulolíticas (CBC); se usó la tercera transferencia en medio W-FR como inóculo; y *b) BRT*; se obtuvo fluido ruminal de una vaca Jersey con cánula ruminal. El fluido ruminal se centrifugó 1,157 g a 25 °C por 3 min, se tomó el sobrenadante y se utilizó como inóculo. La concentración de bacterias totales se midió en los inóculos y se igualó la concentración.

Para la medición de la concentración de bacterias totales se mezcló 1 mL de muestra con 0.25 mL de formaldehído (10%), las bacterias se observaron y se contaron en una cámara Petroff-Hausser utilizando un microscopio Olympus EX51; el valor obtenido se sustituyó en la siguiente ecuación:

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

Dónde:

[B] = Concentración de bacterias por mL.

$\bar{x}$  = Media del conteo de bacterias.

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

$2 \times 10^7$  = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser.

1 mL =  $[1000 \text{ mm}^3 / (0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm})]$ .

En tubos de cultivo (18x150 mm) se pesaron 0.1 g de sustrato y se adicionaron 9 mL de medio con base en fluido ruminal (FR, Cuadro 1.1). Dos tubos de cultivo se inocularon con 1 mL de cada inóculo y se incubaron 39 °C por 72 h. La capacidad de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) se calculó al recuperar por filtración en papel Whatman No. 541 el sustrato no degradado, se secó a 60 °C por 72 h en una estufa Riosa H8-62 y se pesó para

estimar la cantidad de sustrato degradado. La fórmula para obtener %DEGMS fue:

$$\% \text{ DEGMS} = \frac{\text{MS}_i \text{ (g)} - \text{MS}_n \text{ (g)}}{\text{MS}_i \text{ (g)}} \times 100$$

Dónde:

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

g MS<sub>i</sub> = g de materia seca inicial.

g MS<sub>n</sub> = g de materia seca no degradada.

La información del %DEGMS fue analizada como un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2x2, considerando como factores a los inóculos (CBC y BRT) y sustratos (pasto bermuda y celulosa cristalina). Las medias fueron ajustadas por mínimos cuadrados usando el PROC LSMEANS de SAS (2011) y comparadas con la prueba de Tukey ajustada.

Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + B_j + (\alpha B)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta en la repetición k;  $i=1,2$

Nivel j de b, nivel i de A.  $j=1,2$

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto del factor A al nivel i.

$B_j$  = Efecto del factor B al nivel j.

$(\alpha B)_{ij}$  = Efecto de la interacción AB al nivel i, j.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error aleatorio.

**Cuadro 1.1. Composición de medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos celulolíticos.**

Componente (100 mL)	W-FR	FR	CMC-FR	CMC-FRS
Agua destilada (mL)	52.6	52.6	52.6	50.6
Líquido ruminal clarificado <sup>1</sup> (mL)	30.0	30.0	30.0	30.0
Solución mineral I <sup>2</sup> (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0
Solución mineral II <sup>3</sup> (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0
Resarzurina 0.1% <sup>4</sup> (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1
Peptona de soya (g)	0.2	0.2	0.2	0.2
Cisteína-sulfido <sup>5</sup> (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1	0.1	0.1	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% <sup>6</sup> (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0
Carboximetilcelulosa (g)	-	-	0.2	0.2
Agar	-	-	-	2

<sup>1</sup>. Líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, se centrifugó 12,857 g por 10 min y se esterilizó a 15 PSI a 121 °C por 15 min; el proceso se repitió dos veces.

<sup>2</sup>. Contiene (1 L) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g.

<sup>3</sup>. Contiene (1 L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO<sub>4</sub>, 2.45 g; CaCl-2H<sub>2</sub>O, 1.6 g.

<sup>4</sup>. Contiene (100 mL) Resarzurina 0.1 g.

<sup>5</sup>. 3.125 g de L-cisteína (disuelta en 2N NaOH hasta pH 10), más 3.125 g de Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O; la mezcla se aforó a 250 mL con agua destilada y se esterilizó a 15 PSI a 121 °C por 15 min.

<sup>6</sup>. Contiene (100 mL) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 8 g.

### **1.2.1.2. Aislamiento de la bacteria celulolítica**

Un medio líquido (CMC-FR) y uno sólido (CMC-FRS) se prepararon con base en carboximetilcelulosa-fluido ruminal (Cuadro 1.1). El medio CMC-FRS se preparó al adicionar 9 mL de medio CMC-FRS en un tubo de cultivo (18x150 mm). El tubo de cultivo se inclinó 10° hasta su solidificación. El medio CMC-FR se preparó en un tubo de cultivo (18x150 mm) con 9 mL de medio CMC-FR.

La tercera transferencia en medio W-FR se usó para inocular un tubo con medio CMC-FRS por estriado con un asa bacteriológica y se incubó a 39 °C por 72 h para obtener colonias definidas y aisladas. La colonia que presentó buena definición y aislamiento se transfirió a un tubo de cultivo con medio CMC-FR y se incubó a 39 °C por 24 h. Al término de la incubación, una muestra se observó en un microscopio Olympus EX51 usando una amplificación de 1000 veces para identificar las bacterias que crecieron. El proceso se repitió hasta lograr una sola morfología de bacteria celulolítica. La bacteria celulolítica aislada (BCA) se caracterizó morfológicamente y se determinó su tinción Gram.

### ***1.2.1.3. Segunda prueba de degradación in vitro***

La bacteria celulolítica aislada (BCA) antes de conservarse en medio CMC-FR mediante liofilización, se evaluó mediante una segunda prueba de degradación *in vitro* para determinar si existió un efecto positivo en cocultivo (50:50) con BRT. El pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) se usó como sustrato, se molió (1 mm Ø), se lavó con agua corriente para eliminar micropartículas (< 25 µm), se filtró el exceso de agua corriente con manta de cielo y se llevó a peso constante. La concentración de bacterias totales se determinó a BRT y BCA, para igualar la concentración y preparar un cocultivo (50:50). En tubos de cultivo (18x150 mm) se pesó 0.1 g de pasto bermuda y se adicionaron 9 mL de medio FR. Tres tubos de cultivo se inocularon con 1 mL de cada inóculo y se incubaron a 39 °C por 72 h. El %DEGMS se calculó según lo descrito en el apartado *primera prueba de degradación in vitro*.

Los datos del %DEGMS fueron analizadas usando un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron usando el PROC GLM de SAS (2011) y las medias comparadas con Tukey ( $\alpha=0.05$ ). El modelo estadístico fue:

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



dónde:

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta en la repetición  $j$ ,  $i=1,2$   
Nivel  $i$  de tratamiento,  $j=1,2$ .

$\mu$  = Media general.

$\tau^i$  =Efecto del  $i$ -ésimo inóculo.

$\varepsilon^{ij}$  = Error aleatorio.

### **1.2.2. Conservación de la bacteria**

En un vial serológico (100 mL) se pesó 1 g de celulosa cristalina y se adicionaron 50 mL de medio FR. Un vial serológico se inoculó con 2 mL de la bacteria celulolítica aislada (BCA) de un tubo de cultivo con medio CMC-FR y se incubó a 39 °C por 72 h. El vial se colocó en un congelador de rodillo Labconco Shell Freezer durante 40 min para alcanzar una temperatura de -38 °C. Inmediatamente, el vial se guardó en un ultracongelador ThermoScientific Revco (-54 °C) hasta su liofilización.

El contenido del vial se liofilizó durante 24 h en una Liofilizadora Labconco Freezone 4 L en modo automático (condiciones: temperatura de -40 °C y presión de 0.24 mBar).

### **1.2.3. Prueba de degradación *in vitro* de forrajes**

Los sustratos alfalfa (*Medicago sativa*), pasto bermuda (*Cynodon dactylon*), y rastrojo de maíz (*Zea mays*) se molieron (1 mm Ø), se lavaron con agua corriente para eliminar micropartículas (< 25 µm), se filtró el exceso de agua corriente con manta de cielo y se llevaron a peso constante. En tubos de cultivo (18x150 mm) se pesaron 0.05 g de sustrato y se adicionaron 9 mL de medio FR (Cuadro 1.1). Los inóculos fueron *a*) BCA, en un tubo de cultivo con medio CMC-FR se adicionaron 0.05 g de liofilizado de BCA y se incubó a 39 °C por 24 h. *b*) BRT, según lo descrito en el apartado *primera prueba de degradación*

*in vitro*; y c) cocultivo entre BCA y BRT (50:50). La concentración de bacterias totales se determinó en BCA y BRT para igualar la concentración. Tres tubos de cultivo con un sustrato se inocularon con 1 mL de cada inóculo y se incubaron a 39 °C por 72 h. El pH se midió a las 72 h de incubación con un potenciómetro modelo 250A (calibración con pH 7 y 4). El %DEGMS se calculó según lo descrito en el apartado *primera prueba de degradación in vitro*.

### **1.2.3.1. Ácidos grasos volátiles**

Para estimar la concentración en unidades miliMolar (mM) de ácidos grasos volátiles (AGV) a las 72 h de incubación, se tomó 1 mL del medio y se depositó en tubos para microcentrifuga con 0.25 mL de ácido metafosfórico (25%; proporción 4:1). Las muestras se centrifugaron a 18,800 g por 10 min en una centrífuga Ilettich EBA21 y el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía. Los AGV (acetato, propionato y butirato) se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Claurus 500 con detector de ionización de flama (FID); las condiciones de análisis fueron: 1 µL de volumen de inyección; columna 15 m x 0.32 mm (Elite FFAP; temperatura de 130 °C en horno, 250 °C en inyector y 250 °C en columna; se usó nitrógeno como gas acarreador (flujo 8 mL min<sup>-1</sup>); H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min<sup>-1</sup>); tiempos de retención de 1.26 min para acetato, 1.60 min para propionato y 2.09 para butirato.

Los valores obtenidos de acetato, propionato y butirato se utilizaron para estimar la eficiencia de fermentación (EF) usando la ecuación de Chalupa (1980):

$$EF = ((0.62A + 1.09P + 0.78B)/(A+P+B))*100$$

dónde:

EF = Eficiencia de la fermentación (%).

A = Acetato (mM).

P = Propionato (mM).

B = Butirato (mM).

### **1.2.3.2. Análisis estadístico**

Las variables del %DEGMS, AGV y pH fueron analizadas como un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos 3x3, considerando como factores a los inóculos (BCA, BRT y cocultivo) y sustratos (rastroy de maíz, pasto bermuda y alfalfa). Las medias fueron ajustadas por mínimos cuadrados usando el PROC LSMEANS de SAS (2011) y comparadas con la prueba de Tukey ajustada.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + B_j + (\alpha B)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta en la repetición k;  $i=1,2$   
Nivel j de b, nivel i de A.  $j=1,2$

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto del factor A al nivel i.

$B_j$  = Efecto del factor B al nivel j.

$(\alpha B)_{ij}$  = Efecto de la interacción AB al nivel i, j.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error aleatorio.

Los coeficientes de correlación entre %DEGMS, AGV y pH se calcularon usando el procedimiento CORR de SAS (2011).

### 1.3. RESULTADOS

#### 1.3.1. Pruebas de degradación *in vitro* antes de liofilizar la bacteria

El Cuadro 1.2 muestra la primera prueba de degradación *in vitro* usando como inóculo un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC). El CBC no presentó diferencias ( $p>0.05$ ) con las bacterias ruminales totales (BRT) en el porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) en pasto bermuda. Sin embargo, en celulosa cristalina el CBC fue diferente a BRT y cuantificó el menor ( $p\leq 0.05$ ) %DEGMS de la prueba (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2. Degradación *in vitro* de materiales celulolíticos por un consorcio de bacterias celulolíticas**

Sustrato	Inóculo	% DEGMS
Pasto bermuda	BRT	63.10 <sup>a</sup> (0.52)*
	CBC	59.60 <sup>a</sup> (0.70)
Celulosa cristalina	BRT	57.30 <sup>a</sup> (2.63)
	CBC	19.69 <sup>b</sup> (3.55)

Medias con distinta literal son diferentes ( $p\leq 0.05$ ).

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

%DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 72 h; BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración de  $5.57 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); CBC, inóculo de un consorcio de bacterias celulolíticas después de la tercera transferencia en medio de papel Whatman-fluido ruminal (concentración de  $6.89 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ).

El Cuadro 1.3 muestra la degradación *in vitro* de pasto bermuda usando como inóculo la bacteria celulolítica aislada en cocultivo con bacterias ruminales totales antes de liofilizar. El cocultivo presentó el mejor %DEGMS en pasto bermuda (58.08%) por lo que mejoró 3.45 puntos porcentuales el %DEGMS respecto a BRT ( $p\leq 0.05$ ). En contraste, la BCA sólo degradó 6.13% la materia seca del pasto bermuda. Sin embargo, por el efecto cuantificado de la BCA en

cocultivo con BRT se tomó la decisión de conservar la bacteria. La BCA se caracterizó morfológicamente, se liofilizó y se desarrolló una tercera prueba de degradación *in vitro* utilizando tres sustratos celulolíticos.

**Cuadro 1.3. Degradación *in vitro* de pasto bermuda por una bacteria celulolítica aislada en cocultivo con bacterias ruminales totales**

Tratamiento	%DEGMS
Cocultivo	58.08 <sup>a</sup> (0.39)*
BRT	54.63 <sup>b</sup> (0.49)
BCA	6.13 <sup>c</sup> (0.44)

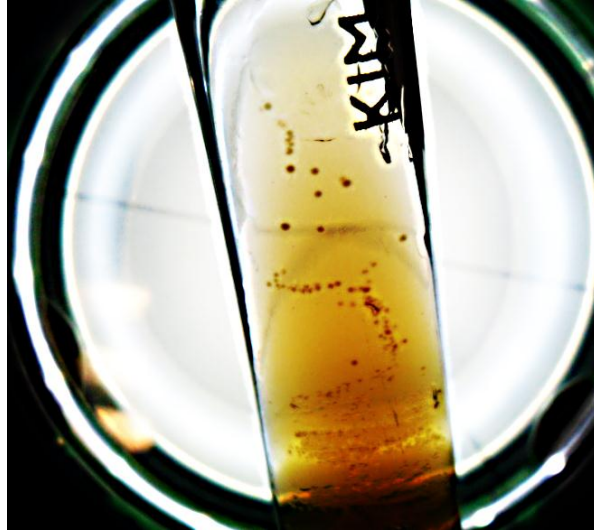
Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

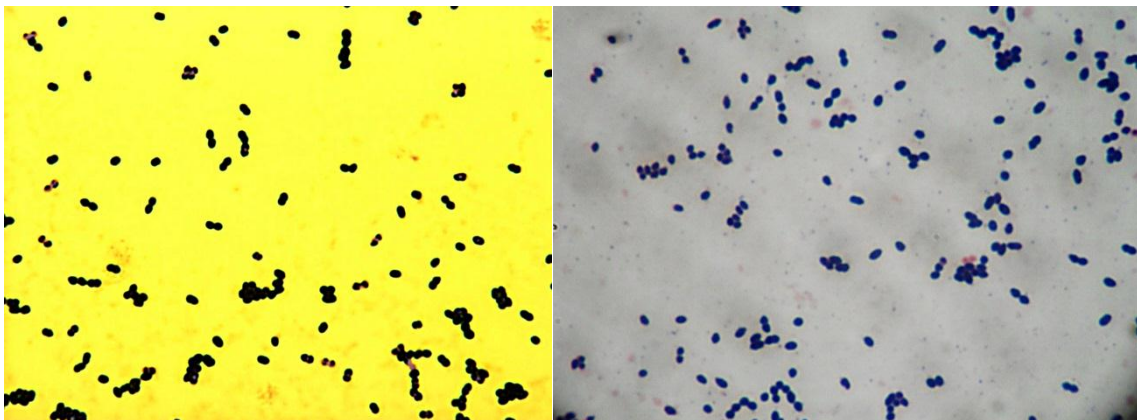
%DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 72 h; BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración de  $6.5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); BCA, inóculo de la bacteria celulolítica aislada (concentración de  $6.4 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ); Cocultivo, relación 50:50.

### 1.3.2. Descripción morfológica de la bacteria celulolítica aislada

La Figura 1.1 muestra colonias definidas y aisladas de la BCA en medio sólido de carboximetilcelulosa-fluido ruminal (CMC-FRS). Las colonias de BCA presentaron forma circular, bordes enteros, elevación convexa, textura membranosa y color blanco-cremoso (Ramírez-Gama *et al.*, 1998). La BCA se observó a 1000 ampliaciones, se identificó una morfología en forma de cocos, formación de dicocos y ocasionalmente cadenas de tres o más cocos (Figura 1.3). La BCA presentó tinción de Gram positiva (Figura 1.2).



**Figura 1.1. Colonias de la bacteria celulolítica aislada en medio sólido.**



**Figura 1.2. La bacteria celulolítica aislada presentó una tinción Gram positiva**



**Figura 1.3. Bacteria celulolítica aislada observada a 1000 ampliaciones**

### **1.3.3. Prueba de degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos**

El Cuadro 1.4 muestra el efecto de BCA en cocultivo con bacterias ruminales totales (BRT) sobre tres sustratos celulolíticos. Los mejores porcentajes de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) se presentaron en la interacción de rastrojo con los inóculos BRT y cocultivo, sin diferencias entre ellos ( $p \geq 0.05$ ); pero diferentes ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones. En contraste, los valores menores %DEGMS se cuantificaron en la interacción de la BCA con pasto bermuda y rastrojo, sin diferencias ( $p > 0.05$ ) entre ellos (Cuadro 1.4).

El efecto positivo ( $p \leq 0.05$ ) de adicionar BCA en BRT (cocultivo) en el %DEGMS se cuantificó sólo en alfalfa; ya que el cocultivo (56.23%) fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) a BRT (49.90%). En pasto bermuda y rastrojo no se observaron diferencias entre cocultivo y BRT ( $p \geq 0.05$ ). La BCA en cada sustrato cuantificó el menor ( $p \leq 0.05$ ) %DEGMS (Cuadro 1.4).

El pH y la producción total de ácidos grasos volátiles (AGV) muestran una relación directa. Dentro de cada sustrato, el pH y AGV no presentaron

diferencias ( $p > 0.05$ ) entre cocultivo y BRT. La BCA presentó el pH más alto ( $p \leq 0.05$ ) en cada sustrato, el cual se asoció directamente con la menor ( $p \leq 0.05$ ) producción de AGV. La mayor producción de AGV la cuantificaron las interacciones del cocultivo y BRT con pasto bermuda, sin diferencias ( $p \geq 0.05$ ) entre ellos, pero diferentes ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones (Cuadro 1.4).

**Cuadro 1.4. Degradación *in vitro* de materiales celulolíticos por una bacteria celulolítica aislada en cocultivo con bacterias ruminales**

Sustrato	Inóculo	% DEGMS		pH		AGV	
Alfalfa	BCA	25.42 <sup>d</sup>	(0.36)*	7.07 <sup>a</sup>	(0.02)	35.79 <sup>e</sup>	(0.34)
	BRT	49.90 <sup>c</sup>	(1.38)	6.97 <sup>bc</sup>	(0.01)	52.88 <sup>d</sup>	(0.63)
	Cocultivo	56.23 <sup>b</sup>	(0.50)	6.93 <sup>c</sup>	(0.01)	53.41 <sup>d</sup>	(0.77)
Pasto bermuda	BCA	7.56 <sup>e</sup>	(0.48)	6.99 <sup>b</sup>	(0.01)	32.48 <sup>f</sup>	(0.09)
	BRT	55.92 <sup>b</sup>	(0.52)	6.80 <sup>de</sup>	(0.01)	60.36 <sup>a</sup>	(0.70)
	Cocultivo	53.96 <sup>b</sup>	(0.62)	6.82 <sup>d</sup>	(0.01)	58.85 <sup>ab</sup>	(0.22)
Rastrojo	BCA	9.63 <sup>e</sup>	(0.22)	6.92 <sup>c</sup>	(0.01)	34.28 <sup>ef</sup>	(0.52)
	BRT	60.94 <sup>a</sup>	(0.54)	6.76 <sup>e</sup>	(0.01)	55.75 <sup>c</sup>	(0.51)
	Cocultivo	62.61 <sup>a</sup>	(0.50)	6.76 <sup>e</sup>	(0.01)	56.78 <sup>bc</sup>	(0.29)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

%DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 72 h; AGV, concentración en mM de los ácidos grasos volátiles a 72 h de incubación; BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración  $8.5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); BCA, inóculo de la bacteria celulolítica aislada (concentración  $9.5 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ); Cocultivo, relación 50:50.

El Cuadro 1.5 muestra la contribución del acetato, propionato y butirato en la producción final de AGV de las interacciones entre inóculos y sustratos celulolíticos. La interacción BCA-alfalfa produjo la mayor proporción de acetato (83.42%) y fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones. Se observó un efecto positivo en el porcentaje de acetato con la adición de la BCA a BRT (cocultivo); ya que en cada sustrato el cocultivo mostró mejor ( $p \leq 0.05$ )



proporción de acetato que BRT. Además, la proporción de acetato producido por la BCA en cada sustrato fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) y diferente al resto de los inóculos (Cuadro 1.5).

**Cuadro 1.5. Porcentaje de acetato, propionato y butirato en la concentración final de ácidos grasos volátiles**

Sustrato	Inóculo	Acetato, %	Propionato, %	Butirato, %
Alfalfa	BCA	83.42 <sup>a</sup> (0.12)*	9.14 <sup>g</sup> (0.10)	7.44 <sup>c</sup> (0.04)
	BRT	68.39 <sup>d</sup> (0.16)	21.91 <sup>cd</sup> (0.23)	9.70 <sup>b</sup> (0.09)
	Cocultivo	69.74 <sup>c</sup> (0.13)	20.38 <sup>e</sup> (0.07)	9.89 <sup>b</sup> (0.06)
Pasto bermuda	BCA	82.01 <sup>b</sup> (0.05)	10.12 <sup>f</sup> (0.03)	7.86 <sup>c</sup> (0.03)
	BRT	66.84 <sup>e</sup> (0.41)	23.27 <sup>b</sup> (0.36)	9.89 <sup>b</sup> (0.07)
	Cocultivo	68.03 <sup>d</sup> (0.14)	21.44 <sup>d</sup> (0.05)	10.53 <sup>a</sup> (0.12)
Rastrojo	BCA	81.95 <sup>b</sup> (0.10)	10.20 <sup>f</sup> (0.04)	7.86 <sup>c</sup> (0.13)
	BRT	65.53 <sup>f</sup> (0.23)	24.60 <sup>a</sup> (0.17)	9.87 <sup>b</sup> (0.07)
	Cocultivo	67.72 <sup>de</sup> (0.28)	22.47 <sup>c</sup> (0.14)	9.81 <sup>b</sup> (0.15)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración  $8.5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); BCA, inóculo de la bacteria celulolítica aislada (concentración  $9.5 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ); Cocultivo, relación 50:50.

El mejor porcentaje de propionato se mostró en la interacción rastrojo-BRT (24.60%) y fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones. El inóculo BRT cuantificó mayor proporción de propionato que el cocultivo en cada sustrato ( $p \leq 0.05$ ). La BCA mostró las menores ( $p \leq 0.05$ ) proporciones de propionato en cada sustrato. El mayor ( $p \leq 0.05$ ) porcentaje de butirato lo cuantificó la interacción pasto bermuda-cocultivo (10.53%) y fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones. El cocultivo no presentó diferencias ( $p > 0.05$ ) con BRT en alfalfa y rastrojo; pero, si en pasto bermuda ( $p \leq 0.05$ ). El menor ( $p \leq 0.05$ ) porcentaje de butirato se cuantificó para BCA en cada sustrato, sin diferencias ( $p > 0.05$ ) entre ellos (Cuadro 1.5).

El Cuadro 1.6 muestra los resultados de la eficiencia de fermentación de las interacciones entre inóculos y sustratos. La mejor ( $p \leq 0.05$ ) eficiencia fermentativa la mostró la interacción de rastrojo-BRT (75.11%) y fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones. El inóculo BCA cuantificó la menor ( $p \leq 0.05$ ) eficiencia de fermentación en todos los sustratos. La adición de BCA a BRT (cocultivo) redujo ( $p \leq 0.05$ ) la eficiencia de fermentación de BRT, ya que en cada sustrato los cocultivos fueron menores ( $p \leq 0.05$ ) a BRT (Cuadro 1.6).

**Cuadro 1.6. Estimación del porcentaje de eficiencia de fermentación utilizando la producción de ácidos grasos volátiles**

Sustrato	Inóculo	Eficiencia de la fermentación (%)
Alfalfa	BCA	67.51 <sup>g</sup> (0.05)*
Alfalfa	BRT	73.81 <sup>d</sup> (0.10)
Alfalfa	Cocultivo	73.25 <sup>e</sup> (0.02)
Bermuda	BCA	68.05 <sup>f</sup> (0.00)
Bermuda	BRT	74.55 <sup>b</sup> (0.06)
Bermuda	Cocultivo	73.77 <sup>d</sup> (0.02)
Rastrojo	BCA	68.10 <sup>f</sup> (0.01)
Rastrojo	BRT	75.11 <sup>a</sup> (0.03)
Rastrojo	Cocultivo	74.21 <sup>c</sup> (0.07)

Medias en con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración  $8.5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); BCA, inóculo de la bacteria celulolítica aislada (concentración  $9.5 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ); Cocultivo, relación 50:50.

#### 1.4. DISCUSIÓN

La información sobre descripción morfológica, sustratos usados para su crecimiento y su tinción de Gram de la bacteria celulolítica aislada (BCA) del rumen se utilizaron para inferir el género al que pertenece con base en el Manual de Bergey's (Manual® Bergey's of Systematic bacteriology, 2009). La BCA se clasificó dentro del género *Ruminococcus*, ya que son cocos que se encuentran en pares y cadenas (Figura 1.3). Su tinción Gram es positiva (Figura 1.2). Es un coco estrictamente anaerobio y requiere de carbohidratos fermentables para crecer (uso de carboximetilcelulosa y celulosa cristalina como sustratos en el proceso de aislamiento). La BCA produjo acetato, propionato y butirato como productos de la fermentación microbiana (Cuadro 1.5).

En la presente investigación se cuantificó el efecto de adicionar una bacteria celulolítica aislada (BCA) a una población de bacterias ruminales totales (BRT) en la degradación de sustratos celulolíticos mediante una prueba de degradación *in vitro*. Además, se midió la capacidad de degradación *in vitro* de la BCA como cultivo puro. Los resultados mostraron un efecto positivo en la degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) de la alfalfa cuando se adicionó BCA a BRT en una relación 50:50. Sin embargo, el cocultivo no propició efecto en %DEGMS de rastrojo y pasto bermuda (Cuadro 1.3). Los resultados descritos se debieron a que histológica y químicamente existen diferencias en la conformación de la pared celular entre leguminosas y gramíneas (Fondevila y Dehority, 1996); porque la alfalfa contiene 59% de FDN (NRC, 2007) que contrasta con el 71% de FDN de pasto bermuda (Combellas *et al.*, 1972) y el 70% de FDN de rastrojo (NRC, 2007). La alfalfa muestra más contenido celular de fácil fermentación que los otros sustratos (Cuadro 1.3).

En la literatura no se encontraron artículos sobre la adición de bacterias celulolíticas a una población de microorganismos ruminales para observar el efecto en variables productivas. Además, es mínima la información sobre el

uso de bacterias celulolíticas como probiótico en rumiantes o pretratamiento en insumos forrajeros para rumiantes. La investigación en ciencia aplicada sobre bacterias ruminales no esclarece el efecto de adicionarlas al sistema ruminal.

Los resultados específicos en pasto bermuda muestran que antes de liofilizar la BCA existió diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre cocultivo y BRT (Cuadro 1.3); pero, al conservar la BCA por liofilización se perdió dicha diferencia ( $p \geq 0.05$ ) entre cocultivo y BRT (Cuadro 1.4). Esta situación se atribuye a que durante el proceso de liofilización no se utilizó un lioprotector, que ayudará a conservar sus características genéticas. Dado que el uso de lioprotectores en el proceso de liofilización de células bacterianas mejora la conservación de las características genéticas e incrementa la supervivencia (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morales-García *et al.*, 2010).

Existen estudios sobre aislamiento de bacterias celulolíticas a partir de rumiantes. Algunos autores basan la medición de la actividad enzimática celulolítica en técnicas de colorimetría para las enzimas producidas. Cai *et al.* (2010) aislaron una nueva bacteria celulolítica identificada como *Cellulosilyticum ruminicola* a partir de *Bos grunniens* (Yak). La actividad celulolítica se midió en un ensayo de reducción de azúcares cuantificados por colorimetría. Otros autores midieron la capacidad de degradación de *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* y/o *Fibrobacter succinogenes* como cultivos puros o en cocultivo entre ellas (Odenyo *et al.*, 1991; Varel *et al.*, 1991; Fondevila y Dehority, 1996; Ossa *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2006; Grilli *et al.*, 2011) pero no en cocultivo con bacterias ruminales.

El %DEGMS de la BCA como inóculo axénico en sustratos celulolíticos utilizados en la presente investigación se debe a la capacidad específica como cultivo bacteriano para degradar diferentes tipos de pared celular (Fondevila y Dehority, 1996). La BCA presentó mayor capacidad de degradación sobre

alfalfa que pasto bermuda y rastrojo (Cuadro 1.4). Sin embargo, los resultados obtenidos en pasto bermuda son menores a lo observado por *Ruminococcus flavefaciens* en degradaciones *in vitro* con 48 h de incubación en pastos tropicales (11.96%; Ossa *et al.*, 2003).

El grado de degradación de la BCA sobre los sustratos celulolíticos se atribuyen a dos factores: *a)* la necesidad de interactuar con otros microorganismos; y *b)* la capacidad de represión catabólica por la presencia de glucosa u otros compuestos en el medio.

Cobos (2007) destaca la interacción de las bacterias celulolíticas con otros microorganismos mediante interdependencia alimentaria y/o alimentación cruzada. En el primer caso, *Ruminococcus albus* necesita ácidos grasos de cadena ramificada producidos por *Megasphaera elsdenii* para una adecuada degradación de celulosa a glucosa, la cual es usada por ambas bacterias. En el segundo caso, cuando se adhieren *R. albus* y *F. succinogenes* a una partícula de fibra, liberan celulasas que degradan la celulosa a glucosa, misma que es absorbida para obtener ATP.

Leschine (1995) menciona, en ambientes anaerobios la degradación de celulosa se produce por una interacción de comunidades complejas de microorganismos. Las bacterias y hongos degradan celulosa a través de sistemas extracelulares y los productos de su hidrólisis están disponibles como fuentes de carbón y energía para otros microorganismos.

Thurston *et al* (1994) demostraron la capacidad de represión metabólica para *R. albus*. La bacteria inhibe la síntesis de celulasas o sistemas de transporte de xilosa cuando hay glucosa disponible en el medio. Además, Walter y Schrempf (1996) también reportaron la represión metabólica para *Streptomyces reticuli*.

La determinación de los coeficientes de correlación de la variable %DEGMS con el resto de las variables (Cuadro 1.7) muestra la influencia ejercida en la producción de AGV y niveles de pH. El %DEGMS tiene alta correlación positiva con la concentración de AGV, porcentaje propionato y porcentaje butirato. Así, cuando se incrementó la degradación *in vitro* aumentó la producción de AGV y la participación de propionato y butirato. En contraste, se cuantificó una correlación altamente negativa con el pH y el porcentaje acetato. A medida que aumentó la degradación *in vitro* se disminuyó el pH y la participación del butirato en la producción final de AGV (Cuadro 1.7).

**Cuadro 1.7. Coeficientes de correlación entre eficiencia de fermentación, pH, ácidos grasos volátiles y porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca**

Variable	EF	%DEGMS	pH	AGV	Acetato	Propionato	Butirato
EF	1	0.943	-0.765	0.967	-0.998	0.998	0.940
%DEGMS		1	-0.675	0.946	-0.940	0.940	0.887
pH			1	-0.743	0.760	-0.761	-0.708
AGV				1	-0.968	0.963	0.941
Acetato					1	-0.998	-0.953
Propionato						1	0.935
Butirato							1

Todos los coeficientes de correlación son significativos ( $p \leq 0.05$ ).

EF, Eficiencia de la fermentación (%); %DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca; AGV, ácidos grasos volátiles (mM); Acetato, Propionato y Butirato, porcentaje de participación en la producción de AGV.

La oxidación de los carbohidratos estructurales durante una fermentación anaerobia produce ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato; Barboza *et al.*, 2009). La proporción de estos AGV depende del producto a fermentar y el tipo de bacterias que la fermentan. Así, la

fermentación de materiales celulolíticos produce menos que aquellos productos de fácil fermentación como granos o pastas (Zavaleta, 1976). Juárez *et al* (2009) reportaron una producción de 23.3 mM de AGV totales a 24 h de incubación de pasto bermuda, el cual se inoculó con líquido ruminal fresco de ovinos fistulados y alimentados con heno de alfalfa. La proporción de acetato en AGV totales fue de 71.2%.

La BCA presentó la mejor proporción de acetato en comparación con el resto de los inóculos y la adición de BCA a BRT (cocultivo) propició una mejor proporción de acetato en la producción final de AGV. Estos resultados se deben a que la producción de acetato se favorece con la participación de bacterias celulolíticas. En contraste, los niveles obtenidos de la proporción de propionato en BRT se atribuye a la presencia de bacterias amilolíticas (Anrique, 2010). Cabe destacar, las bajas proporciones de butirato que se reportan en la presente tesis son consecuencia del uso de carbohidratos estructurales, ya que su producción incrementa con la fermentación de azúcares como la fructosa o la galactosa (Oba, 2011).

La BCA no mostró resultados positivos en cocultivo con BRT en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). Sin embargo, es importante discutir la relación del pH con la producción de AGV (Cuadro 1.4), así como la composición de los AGV según el tipo de inóculo (Cuadro 1.5). Russell y Wilson (1996) mencionan al pH como factor determinante para el crecimiento de las bacterias celulolíticas y su actividad. En el presente experimento el pH osciló entre 6.76 y 7.07, el cual se mantuvo dentro del rango de pH que requieren las bacterias celulolíticas para su correcto funcionamiento (Relling y Mattioli, 2003; VanLier-Regueiro, 2008; Barboza *et al.*, 2009; Contreras y Noro, 2010); ya que su desarrollo se inhibe cuando el pH es menor de 6 (Zavaleta, 1976; Owens y Goetsch, 1993; Russell y Rychlik, 2001; Chen *et al.*, 2011).

Zavaleta (1976) menciona que la producción de AGV disminuye conforme aumenta el pH, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la presente tesis, ya que el pH mostró una correlación negativa (-0.743) con los AGV (Cuadro 1.7). El pH presentó una correlación altamente positiva con el porcentaje acetato (0.76). En contraste, el pH se correlacionó negativamente con el porcentaje de propionato (-0.761) y porcentaje de butirato (-0.708). Lo anterior se atribuye a que el pH se asocia al tipo de AGV producido; el aumento en la proporción de acetato acerca el pH a 6.9 y el aumento del propionato produce una acidificación (Relling y Mattioli, 2003).

Los mejores resultados de eficiencia de fermentación se muestran con el inóculo BRT en cada sustrato, porque la producción de propionato interfiere altamente en la estimación de la eficiencia de fermentación (Cuadro 1.6) y BRT cuantificó las mejores producciones de propionato. Esta situación contrasta con la bacteria aislada, al ser una bacteria celulolítica se propició mayor producción de acetato (Cuadro 1.5) y este AGV interfiere en menor medida en la cuantificación de la eficiencia de fermentación. Las tendencias de la eficiencia de la fermentación con acetato y propionato se ratifican con la correlación altamente positiva de eficiencia de la fermentación con propionato (0.998) y altamente negativa con acetato (-0.998; Cuadro 1.7).



## 1.5. CONCLUSIONES

- a. Se logró el aislamiento de una bacteria celulolítica mediante el uso de medios anaerobios celulolíticos.
- b. La bacteria celulolítica asilada en cocultivo con bacterias ruminales totales perdió su capacidad de degradación *in vitro* de la materia seca de pasto bermuda después de su conservación mediante el proceso de liofilización.
- c. La bacteria celulolítica asilada mostró el menor porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca en los sustratos celulolíticos.
- d. La adición de la bacteria celulolítica asilada en bacterias ruminales totales (50:50) mostró un efecto positivo en el porcentaje de degradación de la materia seca en alfalfa.
- e. La adición de la bacteria celulolítica asilada en bacterias ruminales totales (50:50) mejoró la producción de acetato en sustratos celulolíticos comparado con bacterias ruminales totales.
- f. La bacteria celulolítica asilada generó una menor proporción de acetato en la producción total de ácidos grasos volátiles en sustratos celulolíticos.
- g. La menor eficiencia de fermentación en sustratos celulolíticos la produjo bacteria celulolítica asilada; además, no propició una mejor eficiencia cuando se adiciono a bacterias ruminales totales (50:50).

## 1.6. LITERATURA CITADA

- Anrique, R. G. 2010. Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono. *In: Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa*. Editores: Contreras, P. A. y M. Noro. 3ª ed. Valdivia: América. pp 25-36.
- Barboza, S. P., K. L. Parkey and, I. D. Hume. 2009. Integrative wildlife nutrition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany. 342 p.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1324-1328.
- Bryant, M. P. and I. M. Robinson. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *J. Bacteriol.* 64: 605-613.
- Cai, S., J. Li, F. Z. Hu, K. Zhang, Y. Luo, B. Janto, R. Boissy, G. Ehrlich and, X. Dong. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(12):3818-3824.
- Chalupa, W. 1980. Chemical control of rumen microbial metabolism. *In: Digestive physiology and metabolism in ruminant*. Ruckebush, Y. and P. Thived (eds). AVI Publishing Company INC. pp 325-347.
- Cobos, P. M. A. 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales. *In: Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Ed. Trillas. Distrito Federal, México. 498-516 pp.
- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp 151-161.
- Combellas, J., E. J. González y A. Trujillo. 1972. Rendimiento y valor nutritivo de forrajes tropicales. 1. Bermuda cv. Coastal (*Cynodon dactylon*) (L) pers. *Agronomía Tropical.* 22(3):231-238.
- Contreras, P. A. y M. Noro. 2010. Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3ª ed. Valdivia: América. 135 p.
- De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey. K. Schleifer and, W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup>

- Ed. Vol. 3. The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 1422 p.
- Fondevila, M. and B. A. Dehority. 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *J. Anim. Sci.* 74:678-684.
- Grilli, D., S. Paez, V. Egea, M. Cerón, E. Cobos, L. Allegretti y N. Arenas. 2011. Determinación *In vitro* de la digestibilidad de la celulosa contenida en pasturas autóctonas por una cepa de *Fibrobacter succinogenes* aislada de cabras biotipo criollo. *Bioanálisis.* 38:32-36.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14(01):1-49.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In: Methods in Microbiology*, J. R. Norris and D.W. Ribbons (eds). Vol. 3. Academic Press, New York. pp 117-132.
- Juárez, R. A. S., M. A. S. Cerrillo, E. O. Gutiérrez, E. M. T. Romero, J. N. Coín y H. B. Bernal. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Tec. Pec. Méx.* 47(1):55-67.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:399-426.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, R. C. Anderson and, M. E. Hume. 2006. *In vitro* bacterial growth and *in vivo* ruminal microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. *J. Anim. Sci.* 84:2873-2882.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez-y-Terrón, y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología.* 14(02): 11-29.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1):472-477.
- NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids and new world camelids. The National Academics Press. Washington, D.C. 362 p.
- Oba, M. 2011. Review: effects of feeding sugar on productivity of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 91:37-46.

- Odenyo, A. A., R. I. Mackie, G. C. Fahey, Jr and, B. A. White. 1991. Degradation of wheat straw and alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw by *Ruminococcus albus* 8 and *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *J. Anim. Sci.* 69:819-826.
- Ossa, F., M. Arcos, T. E. Díaz and W. Pittroff. 2003. Cell Wall degradation of *Bouteloua repens in vitro* by pure cultures of *R. flavefaciens* and *F. succinogenes* isolate from cattle grazing tropical lowland pastures in Colombia. *Corpoica.* 4(01):29-35.
- Owens, F. N. and A. L. Goetsch. 1993. Fermentación Ruminal. *In: El Rumiante: fisiología digestiva y nutrición.* C. D. Church editor. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp 159-190.
- Ramírez-Gama, R. M., B. M. Luna, A. C. Mejía, O. M. Velázquez, G. R. Tsuzuki, L. G. Vierna, L. G. Hernández y I. Müggenburg. 1998. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM. pp 89-90.
- Relling, A. E. y G. A. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. 72 p.
- Russell, J. B. and J. L. Rychlik. 2001. Factor that alter rumen microbial ecology. *Sci. Ner Series.* 292(5519):1119-1122.
- Russell, J. B. and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Thurston, B., K. A. Dawson and, H. J. Strobel. 1994. Pentose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4):1087-1092.
- Tsavkelova, E. A. and A. I. Netrusov. 2012. Biogas production from cellulose-containing substrates: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 48(05):421-433.
- vanLier, E. y M. Regueiro. 2008. Digestión en retículo-rumen. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay. 28 p.
- Varel, V. H., H. G. Jung and, L. R. Krumholz. 1991. Degradation of cellulose and forage fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in coculture with phenolic monomer-degrading bacteria. *J. Anim. Sci.* 69:4993-5000.
- Walter, S. and H. Schrempf. 1996. Physiological studies of cellulose (avicelase) synthesis in *Streptomyce reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3):1065-1069.

Zavaleta, E. 1976. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes.  
Ciencia Veterinaria. 1: 223-240.

## **Capítulo 2 . USO DE CARBÓN ACTIVADO COMO LIOPROTECTOR EN EL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

La preservación de bacterias es importante porque representa un potencial biotecnológico. La conservación de microorganismos considera tres aspectos: evitar contaminaciones durante el proceso, alta sobrevivencia y permanecer genéticamente estables. Los métodos de conservación varían y se debe elegir un método que se ajuste al microorganismo a preservar (García y Uruburu, 2000; Morales-García *et al.*, 2010). La liofilización es un proceso donde un material congelado se seca a través de la sublimación del agua. El procedimiento consta de tres etapas: congelación, sublimación y desorción. El material a conservar se congela inicialmente, después el agua se retira del producto mediante conversión directa a vapor, el que luego se elimina mediante una diferencia de presión (Perry, 1998; Kumar *et al.*, 2013). La liofilización es el proceso más utilizado en la conservación de productos biológicos porque aúna dos métodos de conservación: congelación y deshidratación. La naturaleza, tiempo y gasto del proceso son directamente dependientes de la naturaleza química y física del microorganismo a liofilizar (Perry, 1995; Ramírez, 2006).

El proceso de liofilización es efectivo para la preservación de células, en un estado viable y de dormancia de organismos pertenecientes a los dominios Eucaria y Bacteria. Para incrementar la supervivencia de las células sometidas a liofilización se utilizan sustancias que actúan como protectoras (lioprotectores). No obstante se tiene que investigar el tipo de lioprotector ya que esto dependerá de la bacteria que se desea conservar (Morales-García *et al.*, 2010).

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El experimento se desarrolló en una campana Labconco de bioseguridad con purificador de clase II provista de rayos ultravioleta.

### **2.2.1. Inóculo**

Se obtuvieron 200 mL de líquido ruminal de una vaca Jersey con cánula ruminal alimentada en pastoreo de praderas de alfalfa en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El líquido ruminal se centrifugó a 1,157 g a 25 °C por 4 min en una centrifuga Eppendorf modelo 5804 para precipitar protozoarios y partículas de fibra. Se recuperó el sobrenadante y se usó como inóculo.

### **2.2.2. Obtención del consorcio de bacterias celulolíticas**

El medio líquido selectivo se preparó con base en fluido ruminal (C-FR; Cuadro 2.1) usando la metodología de Cobos y Yokoyama (1995). En tubos de cultivo (18 x 150 mm) con una tira de papel Whatman (3x30 mm) y 0.05 g de celulosa cristalina se depositaron 9 mL de medio C-FR bajo flujo constante de CO<sub>2</sub> y se incubaron a 39 °C por 72 h en una incubadora Riossa modelo EO-71 para comprobar esterilidad. Los tubos se inocularon con 1 mL de inóculo bajo flujo continuo de CO<sub>2</sub> y se incubaron 39 °C hasta la degradación de papel Whatman (72 h). Se transfirieron 2 mL a otro tubo de cultivo con medio C-FR y se incubó 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (72 h). En total se realizaron cuatro transferencias para obtener un consorcio de bacterias celulolíticas con capacidad de degradar papel Whatman.

**Cuadro 2.1. Composición del medio de cultivo selectivo para bacterias celulolíticas**

Componente (100 mL)	C-FR
Agua destilada (mL)	52.6
Líquido ruminal clarificado <sup>1</sup> (mL)	30.0
Solución mineral I <sup>2</sup> (mL)	5.0
Solución mineral II <sup>3</sup> (mL)	5.0
Resarzurina 0.1% <sup>4</sup> (mL)	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Cisteína-sulfido <sup>5</sup> (mL)	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% <sup>6</sup> (mL)	5.0

<sup>1</sup> Líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, se centrifugó 12,857 g por 10 min y se esterilizó a 15 PSI a 121 °C por 15 min; el proceso se repitió dos veces.

<sup>2</sup> Contiene (1 L) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g.

<sup>3</sup> Contiene (1 L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO<sub>4</sub>, 2.45 g; CaCl-2H<sub>2</sub>O, 1.6 g.

<sup>4</sup> Contiene (100 mL) Resarzurina 0.1 g.

<sup>5</sup> 3.125 g de L-cisteína (disuelta en 2N NaOH hasta pH 10), más 3.125 g de Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O; la mezcla se aforó a 250 mL con agua destilada y se esterilizó a 15 PSI a 121 °C por 15 min.

<sup>6</sup> Contiene (100 mL) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 8 g.

### **2.2.3. Método de conservación**

En viales serológicos (50 mL) con una tira de papel Whatman (3x30 mm) y 0.1 g de celulosa cristalina se depositaron 27 mL de medio C-FR bajo flujo constante de CO<sub>2</sub> y se incubaron a 39 °C por 72 h para comprobar esterilidad. Los viales se inocularon con 3 mL del producto obtenido de la cuarta transferencia y se incubaron a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (10 d).



### **2.2.3.1. Tratamientos**

Se probaron dos tratamientos (TA y TB) con seis repeticiones cada uno, una vez degradado el papel Whatman en los viales serológicos:

**TA**, los viales serológicos se colocaron en un congelador de rodillo Labconco Shell Freezer durante 40 min para alcanzar una temperatura de -38 °C. Inmediatamente, se guardaron en un ultracongelador Thermo Scientific Revco (-54 °C) hasta su liofilización.

**TB**, A cada vial serológico se le adicionó 0.1 g de carbón activado y se incubaron a 39 °C por 2 h. Los viales se colocaron en un congelador de rodillo durante 40 min para alcanzar una temperatura de -38 °C. Inmediatamente, se guardaron en un ultracongelador a -54 °C hasta su liofilización.

Los viales se liofilizaron durante 24 h en una Liofilizadora Labconco Freezone 6 L en modo automático (condiciones: temperatura de -50 °C y presión de 0.135 mBar).

### **2.2.4. Reactivación del liofilizado**

Para la reactivación de los tratamientos, en un tubo de cultivo (18 x 150 mm) que contenía una tira de papel Whatman, 0.05 g de celulosa cristalina y 9 mL de medio C-FR, se adicionaron 0.05 g de liofilizado bajo flujo continuo de CO<sub>2</sub> y se incubó a 39 °C por 10 d. El porcentaje de repeticiones que degradaron papel Whatman se observó a los 7 y 10 d de incubación (seis repeticiones independientes). Al término de la incubación se midió: *a*) pH con un potenciómetro modelo 250A (calibración con pH 7 y 4); *b*) potencial de óxido-reducción con un potenciómetro Orión modelo 710A (calibración solución con +220 de óxido-reducción); y *c*) concentración de bacterias totales. En la medición de la concentración de bacterias se mezcló 1 mL de muestra con 0.25 mL de formaldehído (10%), las bacterias se observaron y contaron en una

cámara Petroff-Hausser utilizando un microscopio Olympus EX51; el valor obtenido se sustituyó en la siguiente ecuación:

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

Dónde:

[B] = Concentración de bacterias por mililitro.

$\bar{x}$  = Media del conteo de bacterias.

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

$2 \times 10^7$  = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser.

1 mL = [1000 mm<sup>3</sup> / (0.05 mm X 0.05 mm X 0.02 mm)].

### **2.2.5. Prueba de degradación *in vitro* de la materia seca**

En tubos de cultivo (18x150 mm) se colocó una tira de papel Whatman (0.01 g) y 0.05 g de celulosa cristalina. En el tubo de cultivo se adicionaron 9 mL de medio C-FR bajo flujo constante de CO<sub>2</sub> y se incubaron a 39 °C por 72 h para comprobar esterilidad. Los tubos de cultivo se inocularon con 1 mL de un tratamiento reactivado y se incubaron a 39 °C por 10 d. El porcentaje de repeticiones que degradaron el papel Whatman se observó a 7 y 10 d de incubación. El pH se midió a los 10 d de incubación. La capacidad de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) a los 10 d se calculó al recuperar por filtración en papel Whatman No. 541 los sustratos no degradados, se secaron a 60 °C por 72 h y se pesaron para estimar la cantidad de sustrato degradado. La fórmula usada para obtener %DEGMS fue:

$$\% \text{ DEGMS} = \frac{\text{MS}_i \text{ (g)} - \text{g MS}_n \text{ (g)}}{\text{MS}_i \text{ (g)}} \times 100$$

dónde:

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

g MSi = g de materia seca inicial (g sustrato + g papel Whatman).

g MSn = g de materia seca no degradada.

### **2.2.5.1. Ácidos grasos volátiles**

Para estimar la concentración (mM) de ácidos grasos volátiles (AGV) a los 10 d de incubación, se tomó 1 mL del medio incubado y se depositó en tubos para microcentrifuga con 0.25 mL de ácido metafosfórico (25%; proporción 4:1). Las muestras se centrifugaron 18,800 g por 10 min y el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía. Los AGV (acetato, propionato y butirato) se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Claurus 500 con detector de ionización de flama (FID); las condiciones de análisis fueron: 1  $\mu$ L de volumen de inyección; columna 15 m x 0.32 mm (Elite FFAP; temperatura de 120 °C en horno, 250 °C en inyector y 250 °C en columna; se usó nitrógeno como gas acarreador (flujo 4 mL min<sup>-1</sup>); H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min<sup>-1</sup>); tiempos de retención de 2.16 min para acetato, 2.59 min para propionato y 3.11 min para butirato.

### **2.2.6. Análisis estadístico**

El experimento se repitió una vez, y la información del %DEGMS, AGV, porcentaje de acetato, porcentaje de propionato, porcentaje de butirato, pH, oxido-reducción y concentración de bacterias totales fue analizada como medidas repetidas en un diseño completamente al azar usando el procedimiento MIXED de SAS (2011). El modelo para todos los análisis incluyó los efectos fijos de tratamiento, tiempo e interacción tratamiento por tiempo y el efecto aleatorio de repetición y error. Las medias fueron ajustadas por mínimos cuadrados y compradas usando la prueba de Tukey ajustada. Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{j(i)} + P_k + (\tau P)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta en observación k, repetición j, tratamiento i.

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento.

$\delta_{j(i)}$  = Error aleatorio asociado con la j-ésima repetición dentro del i-ésimo tratamiento.

$P_k$  = efecto del k-ésimo tiempo.

$(\tau P)_{ik}$  = Efecto de la interacción tratamiento por tiempo.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error aleatorio asociado con k-ésima medida repetida dentro de j-ésima repetición.

### 2.3. RESULTADOS

El Cuadro 2.2 muestra el efecto de la adición del carbón activado como lioprotector en la conservación del consorcio de bacterias celulolíticas durante el proceso de liofilización. En la reactivación de los tratamientos liofilizados, 83.3% de las repeticiones de TB degradaron papel Whatman a los 7 y 10 d, mientras que en TA (sin carbón activado) perdieron su capacidad degradadora. En la prueba de degradación *in vitro* de MS, 100% de las repeticiones de TB degradaron papel Whatman a los 7 y 10 d de incubación, en contraste TA no presentó degradación de papel Whatman (Cuadro 2.2).

Las variables porcentaje de degradación de materia seca (%DEGMS), concentración de bacterias totales, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), porcentaje de butirato y pH no presentaron interacciones entre el factor tiempo y el factor tratamiento. Por tanto, el análisis se realizó por tratamiento (Cuadro 2.3). Se observó un efecto positivo ( $p \leq 0.05$ ) en la concentración de bacterias al adicionar carbón activado (TB), ya que la población bacteriana se incrementó en  $3.27 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  respecto al tratamiento sin carbón

(TA). Cabe destacar que, antes de liofilizar las muestras se obtuvo una concentración promedio de  $7.25 \times 10^8 \pm 0.758 \times 10^8$  bacterias mL<sup>-1</sup>.

**Cuadro 2.2. Porcentaje de repeticiones que degradaron papel Whatman a los 7 y 10 días de incubación**

Tratamiento	Reactivación de liofilizado		Prueba degradación <i>in vitro</i> MS		N
	7 d	10 d	7 d	10 d	
	Con Carbón (TB)	83.3	83.3	100.0	
Sin Carbón (TA)	0.0	0.0	0.0	0.0	12

**Cuadro 2.3. Efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar un consorcio de bacterias celulolíticas**

Tratamiento	[Bacterias]	%DEGMS	pH <sub>RE</sub>	pH <sub>DE</sub>
Con Carbón (TB)	9.58X10 <sup>8a</sup> (0.66X10 <sup>8</sup> )*	31.82 <sup>a</sup> (1.51)	6.98 <sup>b</sup> (0.05)	6.62 <sup>a</sup> (0.03)
Sin Carbón (TA)	7.21 X10 <sup>8b</sup> (0.66X10 <sup>8</sup> )	3.20 <sup>b</sup> (1.62)	7.21 <sup>a</sup> (0.05)	6.79 <sup>b</sup> (0.03)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

[Bacterias], concentración de bacterias ruminales totales a 10 d de incubación; %DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 10 d; pH<sub>RE</sub>, pH medido a 10 d de la reactivación de tratamientos liofilizados; pH<sub>DE</sub>, pH medido a 10 d de incubación en la prueba de degradación *in vitro*.

El principal efecto se observó en %DEGMS. El consorcio de bacterias celulolíticas con carbón activado (TB) cuantificó 31.82%, lo que representó 28.62 puntos porcentuales más que el tratamiento sin carbón activado (TA;  $p \leq 0.05$ ). El crecimiento bacteriano se reflejó en el pH<sub>DE</sub>. El medio de TB se acidificó (6.62) por la cantidad de productos finales de la fermentación anaerobia producida (Cuadro 2.4) comparado con TA (6.79; Cuadro 2.3). El efecto del consorcio bacteriano celulolítico durante la reactivación de los

tratamientos liofilizados sobre el pH<sub>RE</sub> se mantuvo dentro del rango usado en la elaboración de medios anaerobios (6.8 a 7.2). Aunque se presentó diferencia entre tratamientos, donde TB fue menor a TA ( $p \leq 0.05$ ; Cuadro 2.3).

El Cuadro 2.4 muestra el efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar bacterias celulolíticas sobre la producción de AGV. TB mejoró la producción de AGV en 23 mM durante la prueba de degradación *in vitro* de MS comparado con TA (Cuadro 2.4;  $p \leq 0.05$ ). El agregar carbón activado no generó efecto en el porcentaje de butirato sobre la concentración final de AGV (Cuadro 2.4); ya que no hubo diferencias entre tratamientos ( $p \geq 0.05$ ).

**Cuadro 2.4. Efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar un consorcio de bacterias celulolíticas sobre la producción de ácidos grasos volátiles totales y porcentaje de butirato**

Tratamiento	AGV		% Butirato	
Con Carbón (TB)	81.57 <sup>a</sup>	(1.440)*	15.63 <sup>a</sup>	(0.639)
Sin Carbón (TA)	58.55 <sup>b</sup>	(1.440)	14.67 <sup>a</sup>	(0.639)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

AGV, concentración en mM de los ácidos grasos volátiles a las 10 d de incubación en la prueba de degradación *in vitro*.

El Cuadro 2.5 muestra las variables que presentaron interacción entre factor tiempo y factor tratamiento ( $p \leq 0.05$ ). La variable porcentaje de acetato presentó la mayor cantidad de interacciones entre tratamiento y tiempo; de modo que estadísticamente no se estableció si existió o no efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar los consorcios de bacterias celulolíticas. En la primera prueba del experimento existieron diferencias entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), pero al repetirlo ya no se presentó la diferencia ( $p > 0.05$ ).

La adición del carbón activado sobre el porcentaje de propionato en la concentración final de AGV por tiempo en que se realizó el experimento no presentó diferencias entre tratamientos ( $p>0.05$ ). El potencial de óxido-reducción de los medios de cultivos de los tratamientos no se afectó ( $p>0.05$ ) por la adición de carbón activado, ya que la interacción significativa fue en TA en los dos tiempos de medición.

**Cuadro 2.5. Efecto de la adición de carbón activado antes de liofilizar un consorcio de bacterias celulolíticas sobre el porcentaje de acetato, propionato y potencial óxido-reducción**

Tratamiento	Tiem- po	Acetato, %		Propionato, %		Potencial de Oxido- Reducción, mvolts	
Con Carbón (TB)	1	64.54 <sup>a</sup>	(0.85)*	20.97 <sup>a</sup>	(0.87)	-224.60 <sup>ab</sup>	(14.72)
Sin Carbón (TA)	1	69.10 <sup>b</sup>	(0.85)	18.22 <sup>ab</sup>	(0.87)	-269.25 <sup>a</sup>	(14.72)
Con Carbón (TB)	2	69.72 <sup>b</sup>	(0.85)	13.51 <sup>c</sup>	(0.87)	-233.92 <sup>ab</sup>	(14.72)
Sin Carbón (TA)	2	67.93 <sup>ab</sup>	(0.85)	15.41 <sup>bc</sup>	(0.87)	-194.20 <sup>b</sup>	(14.72)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

## 2.4. DISCUSIÓN

No existe un método universal aplicable para la conservación con éxito de cualquier tipo de bacteria (Perry, 1998). El proceso de liofilización es el método más utilizado para la preservación y transporte de grandes colecciones de cultivos de cepas microbianas (Morgan *et al.*, 2006; Morales-García *et al.*, 2010). Muñoz-Rojas *et al* (2006) y Morales-García *et al* (2010) mencionan que para la conservación de las características genéticas e incrementar la supervivencia de las células bacterianas sometidas a la liofilización, se utilizan sustancias que actúen como protectoras (lioprotectores). Lo anterior se corrobora en el presente estudio, ya que se realizó la liofilización de un

consorcio de bacterias celulolíticas sin la adición de un lioprotector (TA), lo que redujo 28 puntos porcentuales su capacidad de degradación de celulosa comparada con el consorcio donde se adicionó un lioprotector (TB; Cuadro 2.3). Sin embargo, Morales-García *et al* (2010) mencionan que no existe un lioprotector universal para la conservación de bacterias y se tiene que investigar el lioprotector ideal para bacterias celulolíticas u otro tipo de microorganismo.

Los lioprotectores se añaden durante el crecimiento del microorganismo, antes de la congelación o del secado. El tipo de lioprotector depende del tipo microorganismo, pero existen algunos que parecen funcionar con muchas especies (Morgan *et al.*, 2006). Entre los lioprotectores más utilizados están los disacáridos como trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa (Leslie *et al.*, 1995; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006) o hidroxietilcelulosa (Manzanera *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso de este tipo de lioprotectores está reportado en la conservación de microorganismos de importancia en salud y nutrición humana, por la relevancia científica que da su conservación.

Existen reportes de conservación de bacterias de importancia en la nutrición animal mediante liofilización (Jung *et al.*, 2004; Safronova y Novikova, 1996; Cobos *et al.*, 2007; Cobos *et al.*, 2011), pero sólo como parte del proceso de investigación; ya que no hay publicaciones pecuarias donde el enfoque principal sea el proceso de conservación del microorganismo. Morgan *et al* (2006) indican que la metodología de conservación de microorganismos mediante liofilización es un área de la ciencia basada en pruebas empíricas en vez de hechos y teorías probadas. El principal problema a superar es la generación de teoría para todas las cepas bacterianas; pues no existe información sobre el uso de lioprotectores en bacterias celulolíticas anaerobias de origen ruminal.



El uso de carbón activado como lioprotector de cualquier cepa bacteriana durante el proceso de liofilización no está reportado en la literatura. Sin embargo, juega un papel importante en ciertas áreas de la ciencia y tecnología, como la purificación de líquidos y gases, separación de partículas y catálisis (Littrell *et al.*, 2002). Roussak y Gesser (2013) señalan que la aplicación del carbón activado en infinidad de estudios se debe a sus características: *a)* capacidad de adsorción física, además de ser un proceso reversible permitiendo recuperar la especie absorbida; *b)* adsorción en fase líquida acompañada por la precipitación de especies que no se eliminan por simple desorción; y *c)* la porosidad está encerrada por átomos de carbono y es el espacio accesible a las moléculas.

Existen numerosas investigaciones donde se aprovechan las características y estructuras del carbón activado. Por ejemplo, Mercier *et al* (2013) usaron carbón activado granular en pruebas *in situ* para medir su capacidad como soporte de crecimiento bacteriano para biorremediación de bifenilo policlorado; reportando una rápida adherencia de las bacterias en el carbón activado. Por otra parte, Yuan *et al* (2011) aprovecharon la capacidad reversible de la adsorción física del carbón activado y aislaron cuatro bacterias degradadoras de 2-metilisoborneol de un filtro de carbón activado para agua potable.

Gabr *et al* (2009) compararon la bioadsorción de cromo hexavalente usando carbón activado granulado y un biofilms de *Escherichia coli* soportado en carbón activado granulado; su conclusión fue que la capacidad de absorción del carbón activado granulado se redujo por la presencia de la bacteria, pues se disminuyó la porosidad y área superficial disponibles. Otros autores reportan el uso de carbón activado en la adsorción de microorganismos en biorremediación (Bakhaeva *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2000), mejoramiento de fermentaciones alcohólicas con *Saccharomyces cerevisiae* (Ikegamai *et al.*,

2000), desinfección de agua potable (Okochi *et al.*, 1996) y eliminación de microorganismos patógenos (Lechevallier *et al.*, 1984; Camper *et al.*, 1985).

Dadas las características del carbón activado, en el presente estudio se probó su uso como lioprotector de un consorcio de bacterias celulolíticas (TB) antes de liofilizarlas. La comparación de los resultados obtenidos en las variables %DEGMS y degradación de papel Whatman respecto al tratamiento sin adición de un lioprotector (TA); muestran que el carbón activado sirve como lioprotector de bacterias celulolíticas.

El consorcio de bacterias celulolíticas con adición de carbón activado (TB) conservaron sus características genéticas para producir las enzimas celulolíticas necesarias (endo- $\beta$ -1,4-glucanasas, exo- $\beta$ -1,4-glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas) para degradar celulosa, mientras aquellas donde no se adicionó carbón activado (TA) no presentaron degradación del papel Whatman. Se puede inferir que el carbón activado reduce el estrés durante el proceso de liofilización de las bacterias celulolíticas, permitiéndoles conservar sus características genéticas después de la liofilización. Resultados similares reportaron Henckly y Quay (1981), ellos publicaron la generación de daños en DNA de *Serratia marcescens* por efecto de la liofilización, pero estos se redujeron al adicionar inositol como lioprotector antes del proceso.

El uso del carbón activado como lioprotector también mejoró la concentración de las bacterias celulolíticas; ya que a TB se le cuantificó una concentración de  $9.58 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  a las 24 h de incubación, lo que representó  $2.37 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  más que en TA. El resultado fue por la capacidad del carbón activado de absorber bacterias dentro de su estructura porosa y su posterior liberación (Roussak y Gesser, 2013) durante la reactivación del liofilizado.

La mayor producción de AGV en TB fue por la concentración de bacterias y la conservación de sus características genéticas por el uso del carbón activado como lioprotector; pero este no interfirió en la proporción de butirato y propionato producidos en la concentración final de AGV. El potencial de óxido-reducción del medio de cultivo utilizado para la reactivación de las bacterias celulolíticas no se afectó por la adición de carbón activado.

Morales-García *et al* (2010) señalan que el proceso de liofilización en bacterias ocasiona pérdida de viabilidad durante el proceso. La densidad celular inicial, estado fisiológico de la célula, composición del medio de crecimiento y tipo de lioprotector utilizado son factores que influyen en la pérdida de viabilidad (MacKenzie, 1976; Potts, 1994; García y Uruburu, 2000; Hubálek, 2003; Morgan *et al.*, 2006; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Los resultados de viabilidad obtenidos en el presente estudio contrastan porque el consorcio de bacterias celulolíticas con (TB) o sin la adición del lioprotector (TA) no presentaron pérdida de viabilidad. A las 24 h de rehidratación, TA mantuvo la misma concentración de bacterias, mientras TB mejoró la concentración de bacterias con respecto a la concentración antes de la liofilización. Henckly y Blank (1980) reportaron una disminución en la viabilidad de *Yersenia pestis* las 24 de reconstitución, su concentración inicial fue de  $6.5 \times 10^8$  bacterias  $g^{-1}$  y a las 24 h fue de  $5 \times 10^8$  bacterias  $g^{-1}$ .

## **2.5. CONCLUSIONES**

- a. Las bacterias celulolíticas necesitan de un lioprotector antes del proceso de liofilización para conservar su viabilidad y características genéticas.
- b. El carbón activado funciona como lioprotector de bacterias celulolíticas antes del proceso de liofilización.
- c. El uso carbón activado como lioprotector en bacterias celulolíticas, ayudó a conservar su capacidad de degradar papel Whatman y celulosa cristalina, mejorando con ello la producción de ácidos grasos volátiles.
- d. El uso carbón activado como lioprotector en bacterias celulolíticas no afecto la proporción de propionato y butirato en la concentración final de ácidos grasos volátiles.
- e. El uso carbón activado como lioprotector en bacterias celulolíticas no afecto el potencial de óxido-reducción de los medios de cultivo donde se reactivaron las bacterias celulolíticas.

## 2.6. LITERATURA CITADA

- Bakhaeva, L. P., G. K. Vasilyeva, E. G. Surovtseva, and V. M. Mukhin. 2001. Microbial degradation of 3,4-dichloroaniline sorbed by activated carbon. *Microbiol.* 70(3):277-284.
- Camper, A. K., M. W. Lechevallier, S. C. Broadaway, and G. A. McFeters. 1985. Growth and persistence of pathogens on granular activated carbon filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(6):1378-1382.
- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp 151-161.
- Cobos, M. A., A. Ley de Coss, N. D. Ramírez, S. S. González, R. Ferrera Cerrato. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Res. Vet. Sci.* 90:26-30.
- Cobos, M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp Shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:324-330.
- Gabr, R. M., S. M. F. Gad-Elrab, R. N. N. Abskharon, S. H. A. Hassan, and A. A. M. Shoreit. 2009. Biosorption of hexavalent chromium using biofilm of *E. coli* supported on granulated activated carbon. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1695-1703.
- García, L. M. D. y F. F. Uruburu. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM.* 30: 12-16.
- Heckly, R. and H. Blanck. 1980. Virulence and viability of *Yersenia pestis* 25 years after lyophilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(3):541-543.
- Heckly, R. J. and J. Quay. 1981. A brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations. *Cryobiology.* 18:592-597.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms: a review. *Cryobiology.* 46:205-229.

- Ikegamai, T., H. Yanagishita, D. Kitamoto, and K. Haraya. 2000. Accelerated ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* with addition of activated carbon. *Biotechnol. Lett.* 22:1661-1665.
- Jung, H. G., F. M. Engels, and P. J. Weimer. 2004. Degradation of Lucerne stem cell walls by five rumen bacterial species. *NJAS – Wageningen J. Life Sci.* 52(1):11-28.
- Kumar, S., P. L. Kashyap, R. Singh, and A. K. Srivastava. 2013. Preservation and maintenance of microbial cultures. Chapter 11. *In: Analyzing microbes. Manual of molecular biology techniques.* Editors: D. A. Kumar, S. Das, and M. Sukumar. Springer Protocols Handbooks. pp 135-152
- Lechevallier, M. W., T. S. Hassenauer, A. K. Camper, and G. A. McFeters. 1984. Desinfection of bacteria attached to granular activated carbon. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(5):918-923.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(10): 3592-3597.
- Littrell, K. C., N. R. Khalilli, M. Campbell, G. Sandi, and P. Thiyagarajan. 2002. Structural characterization of activated carbon adsorbents prepared from paper mill sludge. *Appl Phys A.* 74 (suppl): S1403-S1405.
- MacKenzie, A. P. 1976. Comparative studies on the freeze-drying survival of various bacteria: Gram type, suspending media and freeze rate. *Dev. Biol. Stand.* 36: 263-277. *FEMS Microbiol. Lett.* 233(2):347-352.
- Manzenara, M., S. Vilchez, and A. Tunnacliffe. 2004. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine.
- Mason, C. A., G. Ward, K. Abu-salah, O. Keren, C. G. Dosoretz. 2000. Biodegradation of BTEX by bacteria on powdered activated carbon. *Bioprocess Eng.* 23:331-336.
- Mercier, A., G. Wille, C. Michael, J. Harris-Hellal, L. Amalric, C. Morlay, and F. Battaglia-Brunet. 2013. Biofilm formation vs. PCB adsorption on granular activated carbon in PCB-contaminated aquatic sediment. *J. Soils. Sediments.* 13:793-800.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez-y-Terrón, y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias

- preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*. 14(02): 11-29.
- Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J. Microbiol. Methods*. 66:183-193.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1):472-477.
- Okochi, M., T. K. Lim, N. Nakamura, and T. Matsunaga. 1997. Electrochemical disinfection of drinking water using an activated-carbon-fiber reactor capable of monitoring its microbial fouling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:18-22.
- Perry, S. F. 1995. Freeze-Drying and cryopreservation of bacteria. *Methods. Mol. Biol.* 38:21-30.
- Perry, S. F. 1998. Freeze-Drying and cryopreservation of bacteria. *Mol. Biotechnol.* 9(1):59-64.
- Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of Prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58(4): 755-805.
- Ramírez, N. J. S. 2006. Liofilización de alimentos. Universidad del Valle. Cali. Colombia. ReCiTeIA. 06 (02). 36 p.
- Roussak, O. V. and H. D. Gesser. 2013. Carbon-Based Polymers, activated carbons. Chapter 16. *In: Applied Chemistry*. 2nd ed. Springer+Busine Media New York. pp 279-290
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Safronova, V. I. and N. I. Novikova. 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing. *J. Microbiol. Methods*. 24(3):231-237.
- Yuan, R., B. Zhou, C. Shi, L. Yu, C. Zhang, and J. Gu. 2012. Biodegradation of 2-methylisoborneol by bacteria enriched from biological activated carbon. *Front. Environ. Sci. Eng.* 6(5): 701-710.

# Capítulo 3 . DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE SUSTRATOS CELULOLÍTICOS POR UN CONSORCIO DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS

## 3.1. INTRODUCCIÓN

Las pruebas de digestibilidad *in vivo* sirven para calcular el valor nutritivo de los alimentos usados en rumiantes, pero requieren de grandes inversiones en animales y alimento, tiempo de prueba, entre otros. Estos factores limitan el uso de la técnica. No obstante, se han desarrollado técnicas sencillas para la predicción de la digestibilidad *in vivo* (Iantcheva *et al.*, 1999). La técnica *in vitro* se usa en la evaluación de forrajes y estudios de fermentación ruminal. Esta técnica permite medir la degradación de un sustrato en determinado tiempo. Los microorganismos ruminales son usados como inóculo para recrear las condiciones del rumen (Dhanoa *et al.*, 2004; Váradyová *et al.*, 2005). Las técnicas *in vitro* son menos costosas, requieren menor tiempo y permiten mayor control sobre las condiciones experimentales que las pruebas *in vivo* (Iantcheva *et al.*, 1999; Makkar, 2005; Váradyová *et al.*, 2005).

La celulosa es la molécula más abundante encontrada en plantas (Arias, 1982; Malherbe y Cloete, 2002; Bach y Calsamiglia, 2006). Los mamíferos no tienen la capacidad de digerir la celulosa, ya que no producen las enzimas encargadas de romper los enlaces  $\beta$ -1-4; pero existen bacterias que las producen (Hungate, 1975; Arias, 1982). Las bacterias del rumen: *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* son capaces de penetrar la pared celular de los vegetales y degradar forraje, por lo que son los microorganismos con mayor actividad celulolítica (Akin y Risby, 1985). Estas bacterias representan alrededor de 0.3 a 4% de la población microbiana del rumen (Forsberg *et al.*, 2000).



## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se utilizó una campana de bioseguridad Labconco con purificador de clase II provista de rayos ultravioleta para mantener condiciones de esterilidad en la manipulación de las bacterias.

### **3.2.1. Inóculos y sustratos**

Los tipos de inóculo fueron *a)* a partir de bacterias ruminales totales (BRT), se obtuvieron 200 mL de líquido ruminal de una vaca Jersey con cánula ruminal alimentada en praderas de alfalfa ubicadas en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El líquido ruminal se centrifugó a 1,157 g a 25 °C por 4 min en una centrifuga Eppendorf modelo 5804 para precipitar protozoarios y partículas de fibra, se recuperó el sobrenadante y se usó como inóculo BRT. *b)* Se usó el liofilizado del consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) descrito en el *Capítulo 2 de la presente tesis*. El medio con base en fluido ruminal (C-FR) se preparó usando la metodología de Cobos y Yokoyama (1995; Cuadro 3.1). En viales serológicos (50 mL) con una tira de papel Whatman (3x30 mm) y 0.02 g de celulosa cristalina se depositaron 30 mL de medio C-FR bajo flujo continuo de CO<sub>2</sub> y se incubaron a 39 °C por 72 h en una incubadora Riossa modelo EO-71 para comprobar esterilidad. Para reactivar el liofilizado de CBC se adicionaron 0.05 g de liofilizado en un vial serológico con medio C-FR bajo flujo continuo de CO<sub>2</sub> y se incubó a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (10 d) y se usó como inóculo CBC.

Los sustratos rastrojo de maíz (*Zea mays*), alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) se molieron (1 mm Ø), se lavaron con agua corriente para eliminar micropartículas (< 25 µm), se filtró el exceso de agua corriente con manta de cielo y se llevaron a peso constante. También se utilizó celulosa cristalina (Sigma) como sustrato.

**Cuadro 3.1. Composición del medio de cultivo celulolítico.**

Componente (100 mL)	C-FR
Agua destilada (mL)	52.6
Líquido ruminal clarificado <sup>1</sup> (mL)	30.0
Solución mineral I <sup>2</sup> (mL)	5.0
Solución mineral II <sup>3</sup> (mL)	5.0
Resarzurina 0.1% <sup>4</sup> (mL)	0.1
Peptona de soya (g)	0.2
Cisteina-sulfido <sup>5</sup> (mL)	2.0
Extracto de levadura (g)	0.1
Carbonato de sodio, sol a 8% <sup>6</sup> (mL)	5.0

1. Líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, se centrifugó 12,857 g por 10 min y se esterilizó a 15 PSI a 121 °C por 15 min; el proceso se repitió dos veces.
2. Contiene (1 L) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g.
3. Contiene (1 L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO<sub>4</sub>, 2.45 g; CaCl-2H<sub>2</sub>O, 1.6 g.
4. Contiene (100 mL) Resarzurina 0.1 g.
5. 3.125 g de L-cisteína (disuelta en 2N NaOH hasta pH 10), más 3.125 g de Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O; la mezcla se aforó a 250 mL con agua destilada y se esterilizó a 15 PSI a 121 °C por 15 min.
6. Contiene (100 mL) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 8 g.

### **3.2.2. Prueba de degradación *in vitro***

En tubos de cultivo (18x150) con 0.05 g de un sustrato a peso constante se adicionaron 9 mL de medio C-FR bajo flujo constante de CO<sub>2</sub> y se incubaron a 39 °C por 72 h para comprobar esterilidad. En cada sustrato se usaron tres inóculos con cinco repeticiones independientes. Los inóculos fueron: BRT, CBC y un cocultivo entre BRT y CBC (50:50). A los inóculos BRT y CBC se les cuantificó la concentración de bacterias totales para igualar la concentración. Para medir la concentración de bacterias totales, se mezcló 1 mL de muestra en 0.25 mL de formaldehído (10%), las bacterias se observaron y contaron en

una cámara Petroff-Hausser utilizando un microscopio Olympus EX51; el valor obtenido se sustituyó en la siguiente ecuación:

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

Dónde:

[B] = Concentración de bacterias por mililitro.

$\bar{x}$  = Media del conteo de bacterias.

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

$2 \times 10^7$  = Constante de la capacidad volumétrica de la cámara Petroff-Hausser.

1 mL =  $[1000 \text{ mm}^3 / (0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.02 \text{ mm})]$ .

Tres tubos de cultivo con un tipo de sustrato, se inocularon con 1 mL de cada inóculo y se incubaron a 39 °C por 72 h. Al finalizar la incubación se midió el pH con un potenciómetro modelo 250A (calibración con pH 7 y 4). La capacidad de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) se calculó al recuperar por filtración en papel Whatman No. 541 los sustratos no degradados, se secaron 72 h / 60 °C y se pesaron para estimar la cantidad de sustrato degradado. La fórmula usada para obtener %DEGMS fue:

$$\% \text{ DEGMS} = \frac{\text{MS}_i \text{ (g)} - \text{g MS}_n \text{ (g)}}{\text{MS}_i \text{ (g)}} \times 100$$

dónde:

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

g MS<sub>i</sub> = g de materia seca inicial.

g MS<sub>n</sub> = g de materia seca no degradada.

### **3.2.2.1. Ácidos grasos volátiles**

Para estimar la concentración (mM) de ácidos grasos volátiles (AGV), se tomó 1 mL del medio que se incubó 72 h y se depositó en tubos para microcentrifuga con 0.25 mL de ácido metafosfórico (25%; proporción 4:1). Las muestras se centrifugaron 18,800 g por 10 min y el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía. Los AGV (acetato, propionato y butirato) se analizaron en un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Claurus 500 con detector de ionización de flama (FID); las condiciones de análisis fueron: 1 µL de volumen de inyección; columna 15 m x 0.32 mm (Elite FFAP; temperatura de 130 °C en horno, 250 °C en inyector y 250 °C en columna; se usó nitrógeno como gas acarreador (flujo 8 mL min<sup>-1</sup>); H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> como gases para generar flama (flujo 45 y 450 mL min<sup>-1</sup>); tiempos de retención de 1.26 min para acetato, 1.60 min para propionato y 2.09 para butirato.

Los valores obtenidos de acetato, propionato y butirato se utilizaron para estimar la eficiencia de fermentación (EF) usando la siguiente de Chalupa (1980):

$$EF = ((0.62A + 1.09P + 0.78B)/(A+P+B))*100$$

dónde:

EF = Eficiencia de la fermentación (%).

A = Acetato (mM).

P = Propionato (mM).

B = Butirato (mM).

### **3.2.3. Análisis estadístico**

Las variables %DEGMS, AGV, porcentaje de acetato, porcentaje de propionato, porcentaje de butirato, eficiencia de la fermentación y pH fueron analizadas como un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de

tratamientos 3x4, considerando como factores a los inóculos (BCA, BRT y cocultivo) y sustratos (rastroyo de maíz, pasto bermuda, alfalfa y celulosa cristalina). Las medias fueron ajustadas por mínimos cuadrados usando el PROC LSMEANS de SAS (2011) y comparadas con la prueba de Tukey ajustada.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + B_j + (\alpha B)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dónde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta en la repetición k;  $i=1,2$   
 Nivel j de b, nivel i de A.  $j=1,2$

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto del factor A al nivel i.

$B_j$  = Efecto del factor B al nivel j.

$(\alpha B)_{ij}$  = Efecto de la interacción AB al nivel i,j.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error aleatorio.

### 3.3. RESULTADOS

El Cuadro 3.2 muestra los efectos de la interacción entre sustratos (rastroyo, alfalfa, pasto bermuda y celulosa cristalina) e inóculos (BRT, CBC y cocultivo) sobre %DEGMS, pH y AGV. Los mejores %DEGMS se presentaron en las interacciones de alfalfa-CBC, alfalfa-cocultivo y rastroyo-BRT sin diferencias entre ellas ( $p \geq 0.05$ ). Los menores %DEGMS los presentó CBC en celulosa cristalina y rastroyo sin diferencias entre ellas ( $p \geq 0.05$ ; Cuadro 3.2).

El efecto positivo de adicionar CBC a las BRT (Cocultivo) sobre %DEGMS se observó en alfalfa, ya que el cocultivo (63.17%) mejoró la degradación *in vitro* comparado con BRT (57.02%;  $p \leq 0.05$ ). En contraste, el cocultivo en rastroyo (58.18%) presentó menor degradación *in vitro* que BRT (62.31%;  $p \leq 0.05$ ). En

celulosa cristalina y pasto bermuda no hubo diferencias entre BRT y cocultivo ( $p \geq 0.05$ ). El consorcio bacteriano celulolítico (CBC) presentó únicamente mejor porcentaje de degradación *in vitro* que BRT ( $p \leq 0.05$ ) en alfalfa; ya que en rastrojo, pasto bermuda y celulosa cristalina fue menor a BRT ( $p \leq 0.05$ ; Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.2. Degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos por un consorcio de bacterias celulolíticas en cocultivo con bacterias ruminales**

Sustrato	Inóculo	% DEGMS	pH	AGV
Alfalfa	CBC	61.43 <sup>a</sup> (0.20)	6.89 <sup>e</sup> (0.001)	77.11 <sup>abc</sup> (2.03)
	BRT	57.02 <sup>b</sup> (1.41)*	7.00 <sup>c</sup> (0.001)	73.80 <sup>abcd</sup> (1.04)
	Cocultivo	63.17 <sup>a</sup> (0.24)	6.99 <sup>c</sup> (0.005)	72.43 <sup>bcd</sup> (0.50)
Pasto bermuda	CBC	43.89 <sup>c</sup> (0.35)	6.88 <sup>e</sup> (0.004)	79.55 <sup>ab</sup> (4.01)
	BRT	55.13 <sup>b</sup> (0.77)	6.95 <sup>d</sup> (0.001)	80.17 <sup>ab</sup> (1.33)
	Cocultivo	55.97 <sup>b</sup> (0.30)	6.88 <sup>e</sup> (0.008)	80.56 <sup>a</sup> (2.27)
Celulosa cristalina	CBC	35.96 <sup>d</sup> (1.01)	6.87 <sup>e</sup> (0.019)	62.12 <sup>e</sup> (0.78)
	BRT	43.16 <sup>c</sup> (0.36)	7.11 <sup>b</sup> (0.007)	66.71 <sup>de</sup> (0.29)
	Cocultivo	45.35 <sup>c</sup> (0.54)	7.15 <sup>a</sup> (0.006)	70.43 <sup>cd</sup> (0.66)
Rastrojo	CBC	37.30 <sup>d</sup> (0.45)	6.89 <sup>e</sup> (0.008)	71.75 <sup>cd</sup> (1.02)
	BRT	62.31 <sup>a</sup> (0.56)	6.90 <sup>e</sup> (0.005)	73.36 <sup>abcd</sup> (0.15)
	Cocultivo	58.18 <sup>b</sup> (0.83)	6.88 <sup>e</sup> (0.004)	69.27 <sup>de</sup> (0.44)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

%DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 72 h; AGV, concentración en mM de los ácidos grasos volátiles a 72 h de incubación; BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración  $5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); CBC, inóculo de un consorcio de bacterias celulolíticas (concentración  $8.7 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ); cocultivo, relación 50:50.

El nivel más alto de pH se presentó en la interacción celulosa cristalina-cocultivo (7.15) y fue diferente al resto de las interacciones ( $p \leq 0.05$ ). En contraste la interacción pasto bermuda-BRT fue el medio más ácido a las 72

h de incubación con un pH de 6.95 y fue diferente al resto de las interacciones ( $p \leq 0.05$ ). En general, los niveles de pH de las interacciones se cuantificaron dentro de los niveles usados en el cultivo *in vitro* de bacterias celulolíticas (rango de 6.8 a 7.2; Cuadro 3.2).

La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) se relaciona con el tipo de sustrato celulolítico. La producción de AGV en alfalfa, pasto bermuda y rastrojo no fue influenciado por el tipo de inóculo usado, ya que no hay diferencias entre inóculos dentro de cada sustrato ( $p \geq 0.05$ ). En celulosa cristalina hubo diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre CBC y cocultivo, pero ambos no presentaron diferencias con BRT ( $p \geq 0.05$ ; Cuadro 3.2).

El Cuadro 3.3 muestra los porcentajes de participación de acetato, propionato y butirato en la producción de ácidos grasos volátiles. El inóculo del consorcio bacteriano celulolítico (CBC) presentó mejores proporciones de acetato que las bacterias ruminales totales (BRT) dentro de cada sustrato celulolítico (Cuadro 3.3).

El Cuadro 3.4 muestra los resultados en la eficiencia de fermentación con base en los mM de AGV producidos. La mejor eficiencia de fermentación se cuantificó en la interacción celulosa cristalina-BRT y fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) al resto de las interacciones. El efecto de la adición del CBC a BRT (cocultivo) no produjo efecto en alfalfa y rastrojo de maíz ( $p > 0.05$ ) comparado con BRT. En pasto bermuda la eficiencia fermentativa en cocultivo fue menor ( $p \leq 0.05$ ) que BRT. El consorcio bacteriano celulolítico (CBC) estimó las menores eficiencias fermentativas en cada sustrato (Cuadro 3.4).

El único efecto positivo ( $p \leq 0.05$ ) de adicionar CBC a BRT (cocultivo) en la proporción de acetato fue la interacción con celulosa cristalina, ya que el cocultivo produjo 74.51% de acetato, mientras BRT produjo 63.60%. En alfalfa, pasto bermuda y rastrojo, el cocultivo no presentó diferencias ( $p > 0.05$ )

con BRT en la proporción de acetato. Cabe señalar, en celulosa cristalina el porcentaje de acetato fue diferente para todos los inóculos ( $p \leq 0.05$ ; Cuadro 3.3).

**Cuadro 3.3. Participación del acetato, propionato y butirato en la concentración final de ácidos grasos volátiles (mM)**

Sustrato	Inóculo	Acetato, %		Propionato, %		Butirato, %	
Alfalfa	CBC	76.72 <sup>a</sup>	(0.56)*	14.12 <sup>d</sup>	(0.58)	9.16 <sup>def</sup>	(0.28)
	BRT	67.71 <sup>cd</sup>	(0.10)	21.46 <sup>bc</sup>	(0.06)	10.82 <sup>a</sup>	(0.10)
	Cocultivo	69.34 <sup>bc</sup>	(0.18)	20.01 <sup>c</sup>	(0.09)	10.65 <sup>ab</sup>	(0.14)
Pasto bermuda	CBC	75.21 <sup>a</sup>	(1.02)	15.20 <sup>d</sup>	(1.01)	9.59 <sup>cd</sup>	(0.12)
	BRT	67.79 <sup>cd</sup>	(0.20)	22.28 <sup>bc</sup>	(0.04)	9.94 <sup>bcd</sup>	(0.17)
	Cocultivo	69.61 <sup>bc</sup>	(0.40)	19.57 <sup>c</sup>	(0.30)	10.81 <sup>a</sup>	(0.23)
Celulosa cristalina	CBC	70.85 <sup>b</sup>	(0.31)	19.79 <sup>c</sup>	(0.35)	9.35 <sup>de</sup>	(0.08)
	BRT	63.60 <sup>e</sup>	(0.32)	27.95 <sup>a</sup>	(0.33)	8.45 <sup>f</sup>	(0.08)
	Cocultivo	74.51 <sup>a</sup>	(0.23)	16.77 <sup>c</sup>	(0.17)	8.72 <sup>ef</sup>	(0.14)
Rastrojo	CBC	74.65 <sup>a</sup>	(1.22)	15.98 <sup>d</sup>	(1.32)	9.37 <sup>de</sup>	(0.32)
	BRT	66.02 <sup>de</sup>	(0.28)	23.74 <sup>b</sup>	(0.27)	10.23 <sup>abc</sup>	(0.03)
	Cocultivo	68.20 <sup>bcd</sup>	(0.47)	21.15 <sup>bc</sup>	(0.49)	10.64 <sup>ab</sup>	(0.10)

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

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración  $5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); CBC, inóculo de un consorcio de bacterias celulolíticas (concentración  $8.7 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ); cocultivo, relación 50:50.

La mejor proporción de propionato fue de 27.95% y ocurrió en la interacción celulosa cristalina-BRT y fue diferente al resto de las interacciones ( $p \leq 0.05$ ). En rastrojo, alfalfa y pasto bermuda, BRT no presentó diferencias con cocultivo ( $p \geq 0.05$ ). La proporción de propionato en celulosa cristalina de CBC fue mejor que el cocultivo; en contraste, el cocultivo cuantificó mejor proporción de propionato que el CBC ( $p \leq 0.05$ ) en los demás sustratos.



**Cuadro 3.4. Estimación del porcentaje de la eficiencia de fermentación utilizando la producción de ácidos grasos volátiles (mM)**

Sustrato	Inóculo	Eficiencia de la fermentación (%)	
Alfalfa	BRT	73.69 <sup>cde</sup>	(0.03)*
	Cocultivo	73.35 <sup>def</sup>	(0.18)
	CBC	70.10 <sup>h</sup>	(0.26)
Pasto	BRT	73.97 <sup>cd</sup>	(0.06)
Bermuda	Cocultivo	73.24 <sup>ef</sup>	(0.08)
	CBC	71.11 <sup>g</sup>	(0.08)
Celulosa cristalina	BRT	76.29 <sup>a</sup>	(0.11)
	Cocultivo	71.51 <sup>g</sup>	(0.13)
	CBC	72.94 <sup>f</sup>	(0.12)
Rastrojo de maíz	BRT	74.64 <sup>b</sup>	(0.05)
	Cocultivo	74.10 <sup>bc</sup>	(0.12)
	CBC	71.57 <sup>g</sup>	(0.16)

Medias en con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

\* Valores entre paréntesis representan el error estándar.

BRT, inóculo de bacterias ruminales totales (concentración  $5 \times 10^9$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ , se diluyó 1 mL en 9 mL de medio C-FR); CBC, inóculo de un consorcio de bacterias celulolíticas (Concentración  $8.7 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ), Cocultivo, relación 50:50.

La proporción de butirato de las interacciones oscila entre 8.45 y 10.82%. En alfalfa, rastrojo y celulosa cristalina el cocultivo no presentó diferencias con BRT ( $p \geq 0.05$ ), pero en pasto bermuda la proporción de butirato del cocultivo (10.81%) fue mejor que BRT (9.94%;  $p \leq 0.05$ ). En rastrojo y alfalfa el inóculo CBC mostró las menores proporciones de butirato respecto a los otros inóculos ( $p \leq 0.05$ ); pero en pasto bermuda, CBC no tuvo diferencias con BRT ( $p \geq 0.05$ ) y en celulosa cristalina CBC fue mejor que BRT ( $p \leq 0.05$ ). El consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) no mostró diferencias en la proporción de butirato en todos los sustratos ( $p \geq 0.05$ ); mientras el inóculo cocultivo no presentó diferencias en alfalfa, rastrojo y pasto bermuda ( $p \geq 0.05$ ; Cuadro 3.3).

### 3.4. DISCUSIÓN

El principal objetivo de la presente tesis fue aislar una bacteria celulolítica y cuantificar su capacidad de degradación de sustratos celulolíticos. Sin embargo, los niveles de degradación *in vitro* son bajos por ser cultivos axénicos (Cuadro 1.3) debido a la necesidad que tienen las bacterias celulolíticas de interactuar con otros microorganismos (Leschine, 1995; Cobos, 2007). Miranda *et al* (1999) reportan que conforme se aíslan bacterias celulolíticas a partir de fluido ruminal van perdiendo la capacidad de degradación. El objetivo del presente capítulo fue cuantificar la degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos usando un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC).

La condición de utilizar el consorcio de bacterias celulolíticas como inóculo fue que degradara el papel Whatman, ya que la degradación de este asegura la presencia de bacterias celulolíticas (Miranda *et al.*, 1999). En promedio, el CBC cuantificó 44.65% de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) en los sustratos celulolíticos. El %DEGMS representó 33 puntos porcentuales más que el promedio de la bacteria celulolítica aislada; lo cual permite inferir en la necesidad de las bacterias celulolíticas por interactuar con otros microorganismos para mejorar el %DEGMS de sustratos celulolíticos (Leschine, 1995; Cobos, 2007). Los resultados son similares a lo publicado por Miranda *et al* (1999) y Mateo-Sánchez *et al* (2002).

Miranda *et al* (1999) aislaron un cultivo mixto de bacterias celulolíticas de un ovino canulado usando rastrojo de maíz como sustrato en el medio de cultivo. El %DEGMS en rastrojo fue 39.98% en rastrojo de maíz, similar a lo cuantificado por el CBC (37.30%). Mateo-Sánchez *et al* (2002) aislaron bacterias ruminales degradadoras de aserrín a partir de fluido ruminal y el %DEGMS en alfalfa a las 72 h fue 22.1%. El valor de %DEGMS fue inferior a lo que se cuantificó en el presente capítulo en alfalfa por CBC (61.43%).

La celulosa cristalina se utilizó en la prueba de degradación *in vitro* para cuantificar la degradación de celulosa pura, ya que no influyó el contenido celular de los sustratos celulolíticos (Cuadro 3.2). El %DEGMS del CBC en celulosa cristalina fue 35.96%, los resultados son mayores al promedio reportado por Stewart *et al* (1981). Ellos aislaron bacterias celulolíticas de ganado lechero y obtuvieron una degradación *in vitro* promedio de 24.86% en celulosa.

El %DEGMS de CBC en celulosa cristalina no presentó diferencias con rastrojo ( $p \geq 0.05$ ) porque el rastrojo contiene 70% de FDN (NRC, 2007). En contraste, el %DEGMS fue menor en pasto bermuda y alfalfa debido a que las tasas de degradación de la celulosa varía según el tipo de forraje utilizado como sustrato (Ifkovits *et al.*, 1965; Argyle y Hespell, 1987; Varel *et al.*, 1989).

La adición del consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) a bacterias ruminales totales (BRT) en cocultivo (50:50) mostró efecto positivo en alfalfa ( $p \leq 0.05$ ); ya que en pasto bermuda y celulosa cristalina no hubo diferencias ( $p \geq 0.05$ ), además de un efecto negativo en rastrojo ( $p \leq 0.05$ ; Cuadro 3.2). El comportamiento en los diferentes sustratos se debe a que los forrajes de bajo valor nutricional (pasto bermuda y rastrojo) presentan menor degradación en comparación con aquellos de mejor valor nutricional (alfalfa) (Ifkovits *et al.*, 1965). Así mismo, el contenido de azúcares u otros carbohidratos de fácil fermentación (Argyle y Hespell, 1987) y compuestos fenólicos (inhiben degradación de celulosa) que contiene la pared celular en cada sustrato varían (Beerver, 1993).

Los coeficientes de correlación y las significancias (Cuadro 3.5) son distintas a las del primer capítulo de la presente tesis (Cuadro 1.7) por el uso de un CBC en lugar de una bacteria celulolítica. El %DEGMS se correlacionó positivamente ( $p \leq 0.05$ ) con AGV y porcentaje de butirato. La correlación indica que a mayor %DEGMS mayor es la producción de AGV y butirato.

**Cuadro 3.5. Coeficientes de correlación entre eficiencia de fermentación, pH, ácidos grasos volátiles y porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca**

Variables	EF	%DEGMS	pH	AGV	Acetato	Propionato	Butirato
EF	1	0.141&	0.253&	-0.248&	-0.949#	0.943#	0.188&
%DEGMS		1	-0.112&	0.409#	-0.231&	0.114&	0.570#
pH			1	-0.219&	-0.206&	0.303#	-0.412#
AGV				1	0.129&	-0.204&	0.319#
Acetato					1	-0.977#	-0.269#
Propionato						1	0.058&
Butirato							1

& Coeficientes no significativos ( $p > 0.05$ ); #, coeficientes significativos ( $p \leq 0.05$ )

EF, Eficiencia de la fermentación (%); %DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca; AGV, ácidos grasos volátiles (mM); Acetato, Propionato y Butirato, porcentaje de participación en la producción de AGV.

El CBC promedió una producción de 72.63 mM de ácidos grasos volátiles; la relación acetato-propionato-butirato fue 74-16-10. BRT produjo en promedio 73.51 mM de AGV con una relación 66-24-10. Los resultados de relación de los componentes de AGV producidos por BRT son similares a lo reportado por Argely y Hespell (1987), al cuantificar una relación 73-14-7 para acetato-propionato-butirato. Aunque el cocultivo no mejoró la producción de AGV, si mejoró la proporción de acetato pues su relación de AGV fue 70-19-11. Las producciones de acetato en CBC y cocultivo se deben a la presencia de bacterias celulolíticas que favorecen su producción (Anrique, 2010; Relling y Mattioli, 2003). Los coeficientes de correlación entre los componentes de AGV indican que acetato se correlaciona negativamente ( $p \leq 0.05$ ) con propionato y butirato. Esto indica que a mayor proporción de acetato decrece la proporción de propionato y butirato (Cuadro 3.5).

El CBC produjo 77.11 mM de AGV con una relación de 77-14-9 para acetato-propionato-butirato en alfalfa, 79.55 mM (relación 75-15-10) para pasto bermuda y 71.75 mM (relación 75-16-9) en rastrojo, lo que representa mejores resultados a los publicados por Doane *et al* (1997) y Juárez *et al* (2009). Doane *et al* (1997) fermentaron 100 mg de alfalfa madura y rastrojo de maíz por 48 h usando como inóculo fluido ruminal, los resultados fueron 57.6 mM (relación 64-29-07) para alfalfa y 52.1 mM (relación 60-29-11) para rastrojo. Juárez *et al* (2009) fermentaron 500 mg de pasto bermuda e inocularon con fluido ruminal de ovinos fistulados alimentados con heno de alfalfa y concentrado comercial; sus resultados fueron 23.3 mM de AGV (relación 71-15-14).

La estimación de la eficiencia de fermentación contrasta con los resultados que se buscan en el presente capítulo. El uso de un consorcio de bacterias celulolíticas fomenta la producción de acetato como parte del proceso fermentativo anaerobio. La ecuación de eficiencia de fermentación da más peso a la producción de propionato que de acetato con base en los coeficientes utilizados en la ecuación. Lo anterior se demuestra porque la eficiencia de fermentación tiene una correlación altamente negativa (-0.949) con acetato y altamente positiva (0.943) con propionato; a medida que la proporción de acetato es menor y la proporción de propionato es mayor se aumenta la eficiencia de fermentación (Cuadro 3.5).

### 3.5. CONCLUSIONES

- a. La adición de un consorcio de bacterias celulolíticas a las bacterias ruminales totales en cocultivo (50:50) mejoro el porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca de alfalfa.
- b. El consorcio de bacterias celulolíticas propició una mejor proporción de acetato en la producción final de ácidos grasos volátiles.
- c. La estimación de la eficiencia de fermentación no se ajusta al presente capítulo porque el consorcio de bacterias celulolíticas mejora la producción de acetato.
- d. La producción milimolar de ácidos grasos volátiles del consorcio de bacterias celulolíticas no presentó diferencias con las bacterias ruminales totales.
- e. Las mejores estimaciones del índice de la eficiencia de la fermentación se produjeron donde estuvieron involucradas las bacterias ruminales totales en la degradación *in vitro*.

### 3.6. LITERATURA CITADA

- Anrique, R. G. 2010. Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono. *In: Rumen: Morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa*. Editores: Contreras, P. A. y M. Noro. 3ª ed. Valdivia: América. pp 25-36.
- Akin, E. D. and L. L. Rogsby. 1985. Degradation of Bermuda and orchard grass by species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4):825-830.
- Argyle, J. L. and R. B. Hespell. 1987. Digestion of alfalfa hay using washed ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* 70:2525-2533.
- Arias, J. L. 1982. Aspectos generales de la biología del rumen. *Monografías de Medicina Veterinaria.* 4(1). 17 p.
- Bach, A. y S. Calsamiglia. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿química o física?. *In: XXII Curso de especialización FEDNA*. Barcelona, España. 16 p.
- Beever, D. E. 1993. Rumen function. *In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Forbes, J. M. and J. France (eds). CAB International. Wallington, Oxon. UK. pp 205-206
- Cobos, P. M. A. 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales. *In: Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Ed. Trillas. Distrito Federal, México. 498-516 pp.
- Cobos, M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp 151-161
- Dhanao, M. S., J. France, L. A. Crompton, R. M. Mauricio, E. Kebreab, J. A. N. Mills, R. Sanderson, J. Dijkstra, and S. Lopez. 2004. Technical note: a proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the *in vitro* gas production technique using feces as the inoculum. *J. Anim. Sci.* 82:733-746.
- Doane, P. H., P. Schofield and, A. N. Pell. 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the *in vitro* fermentation of six forages. *J. Anim. Sci.* 75(12):3342-2252.
- Forsberg, C. W., E. Forano and A. Chesson. 2000. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. *In: Ruminant Physiology. Digestion,*

- Metabolism, Growth and Reproduction. P. B. Cronje, editor. CABI publishing. Pretoria, South Africa. 79-97.
- Hungate, R. E. 1975. The rumen microbial ecosystem. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 6:39-66.
- Iantcheva, N., H. Steingass, N. Todorov and, D. Pavlov. 1999. A comparison of *in vitro* rumen fluid and enzymatic methods to predict digestibility and energy value of grass and alfalfa hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 81:333-344.
- Ifkovits, R. W., H. S. Ragheb, R. F. Barnes and, L. V. Packett. 1965. A pure-culture inoculum method for evaluation of forage cellulose digestibility. *J. Anim. Sci.* 24:1092-1099.
- Juárez, R. A. S., M. A. S. Cerrillo, E. O. Gutiérrez, E. M. T. Romero, J. N. Coín y H. B. Bernal. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Tec. Pec. Méx.* 47(1):55-67.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:399-426.
- Makkar, H. P. S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 291-302.
- Malherbe, S. and T. E. Cloete. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamental and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1:105-114.
- Mateo-Sánchez, J. M., M. A. Cobos-Peralta, A. Trinidad-Santos, V. Cetina-Alcalá y J. Vargas-Hernández. 2002. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras del aserrín. *Agrociencia.* 36(5):523-529.
- Miranda, R. L. A., M. A. P. Cobos, G. D. M. Mendoza, S. S. M. González y C. M. B. García. 1999. Degradación *in vitro* de rastrojo de maíz con cultivos mixtos de bacterias ruminales. *Agrociencia.* 33:133-139.
- NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids and new world camelids. The National Academics Press. Washington, D.C. 362 p.
- Relling, A. E. y G. A. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. 72 p.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.



- Stewart, C. S., C. Paniagua, D. Dinsdale, K. J. Cheng and S. H. Garrow. 1981. Selective isolation and characteristics of *Bacteroides succinogenes* from the rumen of a cow. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(2):504-510.
- Váradyová, Z., M. Baran and, I. Zelenák. 2005. Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 81-94.
- Varel, V. H., A. J. Richardson and, C. S. Stewart. 1989. Degradation of barley straw, ryegrass, and alfalfa cell walls by *Clostridium longisporum* and *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(12):3080-3084.

## CONCLUSIONES GENERALES

1. La bacteria celulolítica aislada cuantificó menos de 10% de degradación *in vitro* de la materia seca en sustratos celulolíticos como el rastrojo de maíz y pasto bermuda.
2. La bacteria celulolítica aislada antes de ser conservada mediante liofilización presentó un efecto positivo en la degradación *in vitro* de la materia seca del pasto bermuda cuando se adicionó en cocultivo con bacterias ruminales totales.
3. La bacteria celulolítica aislada después del proceso de liofilización no mostró efecto positivo en la degradación *in vitro* de la materia seca del pasto bermuda en cocultivo con bacterias ruminales totales.
4. La bacteria celulolítica aislada se clasificó dentro del género *Ruminococcus* con base en el Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology
5. El consorcio de bacterias celulolíticas mejoró la degradación de sustratos celulolíticos comparada con los resultados de la bacteria celulolítica aislada.
6. Las bacterias celulolíticas requieren de un lioprotector para conservar sus características genéticas cuando se someten al proceso de liofilización.
7. El carbón activado funciona como lioprotector de las bacterias celulolíticas porque conservan sus características genéticas después del proceso de liofilización.
8. La bacteria celulolítica asilada y el consorcio de bacterias celulolíticas mejoraron el porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca de la alfalfa cuando se adicionaron en cocultivo con bacterias ruminales totales.
9. La bacteria celulolítica asilada y el consorcio de bacterias celulolíticas mejoraron la proporción de acetato en la producción final de ácidos grasos volátiles.