



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

AISLAMIENTO, FILOGENIA E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA ESPECIE DE *Shigella* DE RUMEN CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR CELULOSA

LORENA LUNA RODRÍGUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **Aislamiento, filogenia e identificación bioquímica de una especie de *Shigella* de rumen con capacidad para degradar celulosa**, realizada por la alumna **Lorena Luna Rodriguez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, fue aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD-GANADERÍA
CONSEJO PARTICULAR

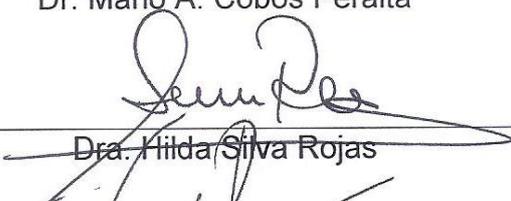
CONSEJERO


Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR


Dr. Mario A. Cobos Peralta

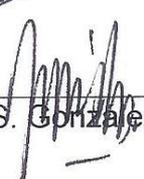
ASESOR


Dra. Hilda Silva Rojas

ASESOR


Dr. César Cortez Romero

ASESOR


Dr. Sergio S. Gonzalez Muñoz

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero del 2013

AISLAMIENTO, FILOGENIA E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA ESPECIE DE *Shigella* DE RUMEN CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR CELULOSA

Lorena Luna Rodríguez, Dra.

Colegio de Posgraduados, 2013

RESUMEN

De una muestra tomada del rumen de un bovino se aisló una cepa de *Shigella* sp nov en condiciones anaerobias, y creció en medio selectivo cuya única fuente de carbono fue celulosa, a 39 °C y pH 6.8. La bacteria aislada es Gram negativa, en forma de coco bacilo, con actividad celulolítica cuando se utilizó la tinción con rojo congo en colonias de 10 d. Los resultados filogenéticos indican que se encuentra ubicada en el grupo monofilético perteneciente al género *Shigella*, pero con 98 % de similitud con respecto a las demás especies del taxa, por lo cual este microorganismo es una especie no reconocida. La utilización de azúcares y alcoholes de la cepa aislada se determinó con el Kit API 50 CH y el Software API WEB. De acuerdo con los resultados hubo fermentación de los sustratos glicerol, ribosa, xilosa, sacarosa, galactosa y glucosa; pero con las pruebas bioquímicas no fue posible identificar la cepa aislada debido a que los resultados no se encuentran en la base de datos, lo cual concuerda con el resultado de especie no reconocida.

Palabras clave: *Shigella*, rumen, celulolítica, monofilético.

**SHIGELLA ISOLATION, FILOGENIA AND IDENTIFICATIO FROM RUMEN
WITH POTENTIAL TO CELULOSE HIDROLYSIS**

Lorena Luna Rodríguez, Dr.

Colegio de Posgraduados, 2013

ABSTRACT

Of a sample taken from rumen of a bovine was isolated a strain of *Shigella* nov sp in anaerobic conditions, and cultivated in medium selective whose only carbon source was cellulose, at 39 °C and pH 6.8. The isolated bacterium is cocobacillus, Gram negative, with cellulolytic activity when the red Congo was used in colonies of 10 d. The results phylogenetic indicate that it is located in the monophyletic group pertaining to the *Shigella*, with 98 % of similarity with respect to the other species of taxa, thus this microorganism is a species nonrecognized. The use of sugars and alcohol of the isolated strain determined with Kit API 50 CH and Software API WEB. In agreement with the results fermentation substrates was glicerol, ribosa, xylose, saccharose, galactosa and glucose; but with the biochemical tests it was not possible to identify the isolated because the results are not in the data base, which agrees with the result of species nonrecognized.

Palabras clave: *Shigella*, rumen, cellulolytic, monophyletic.

DEDICATORIA

Para quienes a día de hoy me acompañan y son parte importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sincero agradecimiento a la Línea Prioritaria de Investigación 5, Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal, y a la Línea Prioritaria de Investigación 11, Sistemas de Producción Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola y Pesquera del Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico para realizar esta investigación.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Planteamiento del problema	2
2. Objetivos	3
3. Hipótesis	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Biomasa vegetal	4
4.2 Pared celular	4
4.2.1 Estructura de la pared celular	5
4.2.2 Componentes de la pared celular	6
4.3 Aprovechamiento de los componentes de la biomasa vegetal	9
4.3.1 Hidrólisis de lignina por hongos basidiomicetos	10
4.3.1.1 Enzimas ligninolíticas extracelulares	10
4.3.2 Descomposición de celulosa por microorganismos ruminales	11
4.3.2.1 Microorganismos ruminales celulolíticos	12
4.3.2.2 Mecanismos de adherencia en bacterias celulolíticas	13
4.3.2.2.1 Celulosoma	14
4.3.2.2.2 Glicocalix	17
4.3.2.2.3 Pili	18
4.3.2.2.4 Gliconasas	19
4.4 Catabolismo de la fermentación ruminal	19
4.5 Análisis moleculares en microorganismos ruminales	20
4.5.1 Ácido desoxirribonucleico	20
4.5.1.1 Síntesis de la secuencia de DNA	21
4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
4.5.3 Sistematización de las técnicas genéticas	23
4.5.4 Clonación de genes provenientes de microorganismos ruminales	24
4.5.5 Composición y proporción de las poblaciones	26

4.5.6 Identificación microbiana	28
4.5.6.1 Sistemas miniaturizados de identificación microbiana ...	28
4.5.6.2 Identificación microbiana mediante técnicas genéticas ...	31
4.5.6.3 Inferencia filogenética	33
4.5.6.3.1 Alineación de secuencias.....	34
4.5.6.3.2 Construcción de cladogramas	36
4.5.6.3.3 Estima de la confianza de los cladogramas.....	38
4.5.6.4 El 16S rDNA, la molécula de elección en estudios de filogenia microbiana	39
5. LITERATURA CITADA	44

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y FILOGENIA DE UNA ESPECIE DE <i>Shigella</i> DE RUMEN CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR CELULOSA	61
Resumen	61
2.1 Introducción.....	62
2.2 Materiales y Métodos.....	63
2.2.1 Aislamiento de una bacteria ruminal con capacidad para hidrolizar carbohidratos estructurales	63
2.2.1.1 Obtención del inóculo ruminal bacteriano.....	63
2.2.1.2 Crecimiento del cultivo en medio líquido selectivo	63
2.2.1.3 Aislamiento de bacterias en medio sólido	64
2.2.2 Actividad enzimática de celulasas	67
2.2.3 Identificación y análisis filogenético del cultivo aislado.....	67
2.2.3.1 Extracción del material genómico (DNA)	68
2.2.3.2 Amplificación de los fragmentos de DNA	68
2.2.3.3 Purificación del producto de PCR	70
2.2.3.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	71
2.2.3.5 Secuenciación del producto clonado	72
2.2.3.6 Análisis filogenético	72
2.3 Resultados y Discusión	73
2.3.1 Actividad enzimática de celulasas	73
2.3.2 Morfología macroscópica y microscópica	74

2.3.3 Filogenia	75
2.3.3.1 Alineamiento múltiple de secuencias e inferencia filogenética	78
2.4 Conclusiones	78
2.5 Literatura citada	79
CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA ESPECIE DE <i>Shigella</i> DE RUMEN CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR CELULOSA.	86
Resumen	86
3.1 Introducción	87
3.2 Materiales y Métodos	88
3.2.1 Activación de la cepa celulolítica aislada	88
3.2.2 Identificación bioquímica de la cepa celulolítica aislada	88
3.2.2.1 Preparación de las galerías API 50 CH	90
3.2.2.2 Preparación del inóculo	90
3.2.2.3 Inoculación de las galerías API 50 CH	90
3.3 Resultados y Discusión	91
3.4 Conclusiones	93
3.5 Literatura citada	95

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1 Estudios de la clonación de genes <i>Ruminococcus sp</i> codificantes para enzimas que hidrolizan fibra	25
Cuadro 2.1 Medio de cultivo anaerobio líquido para el aislamiento de bacterias celulolíticas	65
Cuadro 2.2 Medio carboximetil celulosa sólido (MCS) para el aislamiento de bacterias celulolíticas.....	66
Cuadro 2.3 Secuencias de los iniciadores para amplificar el gen 16S rDNA	69
Cuadro 2.4 Mezcla de reacción para PCR.....	69
Cuadro 2.5 Programa para el ensayo de la PCR. Gen 16S rDNA..	70
Cuadro 3.1 Medio carboximetil celulosa líquido (CML) anaerobio....	89
Cuadro 3.2 Características bioquímicas de la cepa aislada.....	92

Página

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de la planta de la pared celular, y la ubicación de los componentes principales de polisacáridos (Pérez y Samain 2010)	5
Figura 1.2 Representación molecular de la estructura de la cadena de celulosa (Pérez y Samain 2010)	7
Figura 1.3 Estructura química de la lignina (Önnerud <i>et al.</i> , 2002) ..	9
Figura 1.4 Árbol filogenético con los tres dominios de la vida (<i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> y <i>Eucarya</i>) basado en la distancia evolutiva de la molécula 16S rDNA (Barns <i>et al.</i> , 1996)	42
Figura 2.1 Identificación de colonias degradadoras de celulosa tinción de Rojo Congo, en medio de cultivo sólido carboximetil celulosa, crecidas durante 10 d	74
Figura 2.2 Morfología colonial del microorganismo aislado, crecido en medio de cultivo sólido carboximetil celulosa, durante 48 h	74
Figura 2.3 Resultados de la amplificación del 16S rDNA visualizados en gel de agarosa por electroforesis	76
Figura 2.4 Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA del microorganismo aislado y cepas de referencia	77
Figura 3.1 Cambio de color en los microtubos durante un período de incubación de 24 h	91

INTRODUCCIÓN GENERAL

El 93 % de la biomasa lignocelulósica es utilizada como energía primaria en procesos de combustión (Suárez y Martín, 2010), y esta puede ser hidrolizada a oligosacáridos por microorganismos anaerobios celulolíticos (Hu *et al.*, 2005), anaerobios termófilos (*Clostridium* y *Cellulomonas*) y anaerobios mesófilos (*Fibrobacter*, *Ruminococcus*) (Forbes *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010) mediante mecanismos de adherencia (Weimer *et al.*, 2006) y un conjunto de celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Schwarz, 2001; Fierobe *et al.*, 2002).

La digestión de la celulosa por anaerobios mesófilos del rumen implica la adherencia del microorganismo a las fibras vegetales, para *Ruminococcus albus* (Ohara *et al.*, 2000) y *R. flavofaciens* (Ding *et al.*, 2001) es debido a los celulosomas, (Mirón *et al.*, 2001a; Rakotoarivonina *et al.*, 2002), proteínas del Pili, (Rakotoarivonina *et al.*, 2005) y glicocalix que contiene las sustancias poliméricas extracelulares (Weimer *et al.*, 2006). Los géneros reportados como microorganismos ruminales celulolíticos son *Fibrobacter* y *Ruminococcus*. Pero Wang *et al.* (2011) reportaron el aislamiento y caracterización de *Shigella flexneri* G3 de líquido ruminal en condiciones mesófilas, manifestando una producción eficiente de azúcares a partir de celulosa.

1. Planeamiento del problema

Las bacterias colonizan diversos , ambientes extremos e incluso organismos vivos; esta capacidad de adaptación y potencial genético para aprovechar los nutrientes presentes en un hábitat, permite el uso de biomasa vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina) para crecimiento y sobrevivencia. Es posible identificar un microorganismo del ecosistema ruminal, capaz de liberar enzimas endoglucanasa y xilanasas para aprovechar los componentes de la pared celular (celulosa, celobiosa y xilosa) (Fung, 2002).

Así, se plantea realizar un método de aislamiento microbiológico en esta línea de investigación, donde el desarrollo de medios de cultivo selectivos para bacterias ruminales celulolíticas permite identificar un cultivo puro mediante una caracterización fenotípica (morfología colonial y microscópica). Esta metodología permite continuar con ensayos en sistemas miniaturizados de identificación microbiana basados en el metabolismo de sustratos específicos (pruebas bioquímicas) y el uso de técnicas genéticas, cuya aplicación marca un punto de inflexión positivo en el análisis de la especie microbiana aislada.

2. Objetivos

Objetivo general

Aislar e identificar filogenéticamente una bacteria del ambiente ruminal, y cultivarla en medio anaerobio selectivo usando celulosa como única fuente de carbono.

Objetivos específicos

- Identificar la bacteria ruminal aislada mediante la caracterización metabólica y morfológica tradicional.
- Identificar un microorganismo ruminal a partir de un cultivo puro de la bacteria ruminal con la amplificación del 16S rDNA mediante la técnica de PCR.
- Analizar filogenéticamente las secuencias obtenidas con la amplificación por PCR por medio del ClustalW del programa MEGA.

3. Hipótesis

- Es posible el desarrollo de un protocolo que permita aislar una bacteria ruminal celulolítica en un medio anaerobio selectivo.
- La secuencia del gen ribosomal 16S rDNA proporcionará información filogenética del microorganismo aislado con capacidad para hidrolizar componentes de la pared celular.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Biomasa vegetal

La biomasa está conformada por materiales producidos con la energía de la radiación solar, mediante la fotosíntesis y almacenada en los enlaces químicos de los tejidos de organismos fotosintéticos, luego es transferida a los animales a través de las cadenas tróficas y se libera al ambiente en procesos de oxidación, como los de la descomposición de los materiales biológicos residuales o bien de una forma más rápida en los procesos de combustión (Suárez y Martín, 2010). Además, el término biomasa vegetal se utiliza para referirse al material vegetal (residuos forestales, desechos lignocelulósicos urbanos, residuos agrícolas y agroindustriales), la cual tiene una estructura variada por lo cual se describirán de manera detallada los componentes de esta.

4.2 Pared celular

La arquitectura, mecánica y función de las plantas depende de la estructura de la pared celular localizada en la zona exterior de la célula, está en contacto con la membrana plasmática, compuesta por carbohidratos estructurales, organizados en cadenas de polisacáridos con pequeñas cantidades de lignina y proteínas. La pared celular actúa como una limitación mecánica y como una matriz extracelular que interacciona con las proteínas de la superficie celular, mediando las relaciones de la célula vegetal con el entorno; además actúa como barrera frente a microorganismos lignocelulolíticos (Zeiger y Taiz, 2007).

4.2.1 Estructura de la pared celular

La estructura de la pared está constituida por una lámina media, pared primaria (Figura 1.1) y pared secundaria. La lámina media es la primera capa que se sitúa durante la división celular vegetal, una vez concluida, queda localizada entre las paredes primarias. Está formada principalmente de sustancias pécticas, las cuales cementan y acoplan las paredes primarias de las células adyacentes (Heredia *et al.*, 1995).

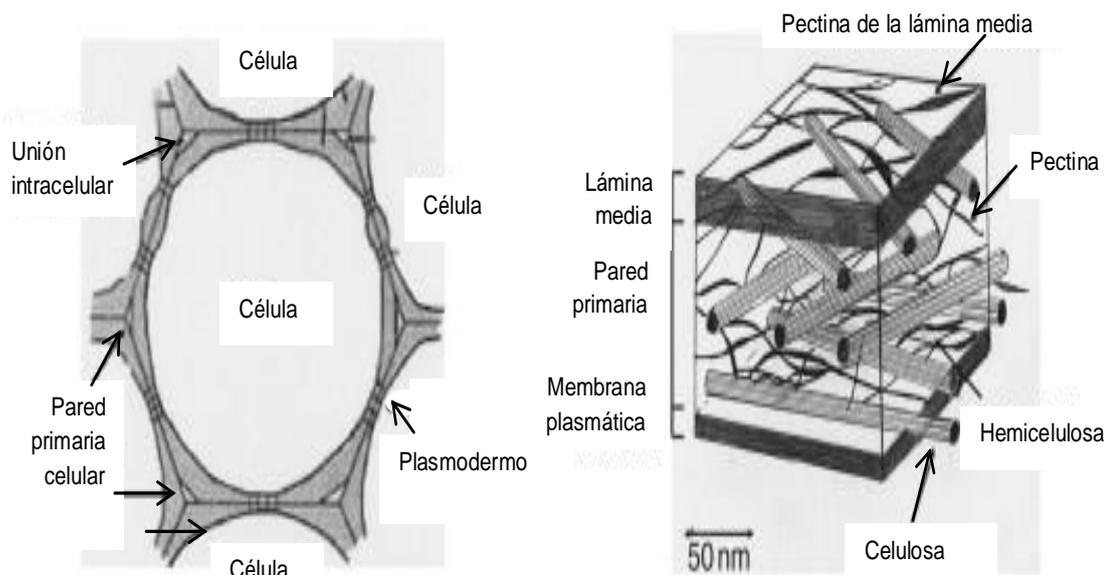


Figura 1.1 Representación esquemática de la planta de la pared celular, y la ubicación de los componentes principales de polisacáridos (modificado de Pérez y Samain 2010).

La pared primaria está presente en todas las células vegetales (Figura 1.1) y es el producto de la acumulación de microfibrillas de celulosa orientadas en diversas direcciones formando una red laxa, permitiendo el crecimiento celular, y cuyos componentes principales son la celulosa (25 %), hemicelulosa

(25 %), pectina (35 %), glicoproteínas estructurales y proteínas solubles (1 a 8 %) (Goodwin y Mercer, 1983; Smith, 1993; Zeiger y Taiz, 2007).

La pared secundaria es la capa más adyacente a la membrana plasmática, aparece una vez concluido el crecimiento celular y se distinguen tres subcapas (S1- lámina externa a la pared primaria, S2- en medio y S3- dentro de la pared primaria). A diferencia de la pared primaria, tiene mayor proporción de celulosa, una baja cantidad de hemicelulosas y en el xilema y las traqueidas se puede encontrar lignina o cera (Smith, 1993).

4.2.2 Componentes de la pared celular

El modelo básico de la pared se describe como una red compleja tridimensional y organizada, formada por microfibrillas de polímeros de celulosa unidas entre si por hemicelulosas, embebidas en una matriz de sustancias pécticas, glicoproteínas estructurales, y en ocasiones por compuestos aromáticos como la lignina. Estos polímeros componen la pared celular y en conjunto constituyen la lignocelulosa (Zeiger y Taiz, 2007).

La celulosa es el principal carbohidrato estructural sintetizado por las plantas, es un homopolímero lineal de β -D glucosa unido por enlaces β -1,4 glucosídicos (Figura 1.2). La unidad estructural de la celulosa es la celobiosa formada por dos residuos de glucosa, con una rotación entre éstas de 180° (Delmer y Amor 1995).

En las plantas la celulosa se desarrolla en forma de microfibrillas en paredes primarias y secundarias, como resultado de la formación de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. En la pared secundaria la celulosa

forma varias láminas donde las microfibrillas se organizan en paralelo, presentando una orientación diferente en cada lámina (Beguin y Aubert, 1994).

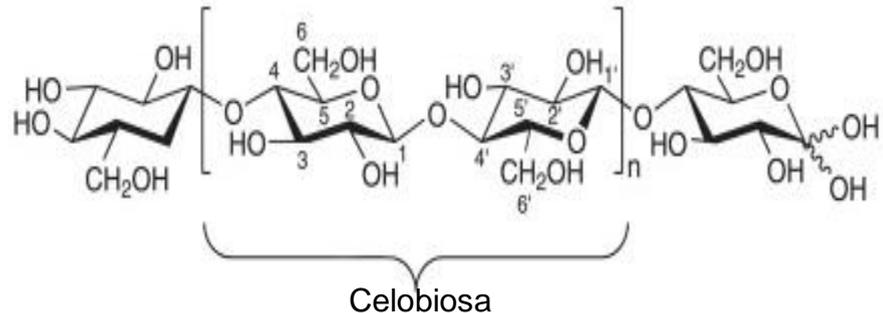


Figura 1.2 Representación molecular de la estructura de la cadena de celulosa (Pérez y Samain 2010).

Las hemicelulosas se componen de polisacáridos heterogéneos neutros (pentosanas, pentosas y hexosanas) cuya cadena principal presenta ramificaciones cortas; éstas, simultáneamente con las pectinas, proteínas y lignina, se unen químicamente a la celulosa, formando una estructura llamada microfibrillas. Las hemicelulosas en los vegetales son el xilano, galactoglucomanano, xiloglucano, galactomanano, glucomanano, manano y calosa (De Vries y Visser, 2001).

Las pectinas son una mezcla de heteropolisacáridos ácidos y neutros, caracterizadas por la capacidad de formar geles, formando parte de la matriz amorfa en la pared primaria y en la lámina media, donde su función principal es cementante y lubricante. Heredia (1995) y De Vries y Visser (2001) mencionan al galacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalactano y el arabinano como algunos de estos compuestos.

Las glicoproteínas difieren de las proteínas citoplasmáticas, presentándose en pequeñas cantidades como partes constituyentes normales de la pared primaria celular y desempeña una función importante en el control del desarrollo celular.

La lignina (Figura 1.3) es un polímero heterogéneo compuesto por unidades metoxiladas de fenil propano (p-cumárico, coniferil y alcohol sinapil) y forma parte de los tejidos vasculares de plantas superiores, proporcionando soporte estructural, impermeabilidad y resistencia frente al ataque microbiano y al estrés mecánico (Higuchi, 1990). La biosíntesis de este polímero se produce por la unión de radicales fenoxi que se originan en la oxidación enzimática de alcoholes precursores. Hay varias enzimas oxidativas participantes en la síntesis de la lignina, fundamentalmente peroxidasas y fenol oxidasas (Lynd *et al.*, 2002). La reactividad de los radicales fenoxi llevó a considerar la polimerización de estos precursores como un proceso al azar (Kirk y Farrell, 1987 Hatfield *et al.*, 2005).

La lignificación comienza en la región más alejada del protoplasto en las esquinas celulares, la lámina media y la capa S1, extendiéndose después por el resto de la pared secundaria hacia el lumen, lo que sugiere la ubicación de puntos de inicio ligados a regiones específicas de la pared indicando que la localización ultra estructural de las enzimas es necesaria para confirmar su función en el control de la química de la superficie celular, y por lo tanto otras biomoléculas pueden dirigir esta polimerización porque son candidatos para ser sitios de inicio y éstas son las proteínas dirigentes, proteínas ricas en

hidroxiprolina (HRPs) y los polisacáridos de la pared celular (Davin y Lewis, 2000).

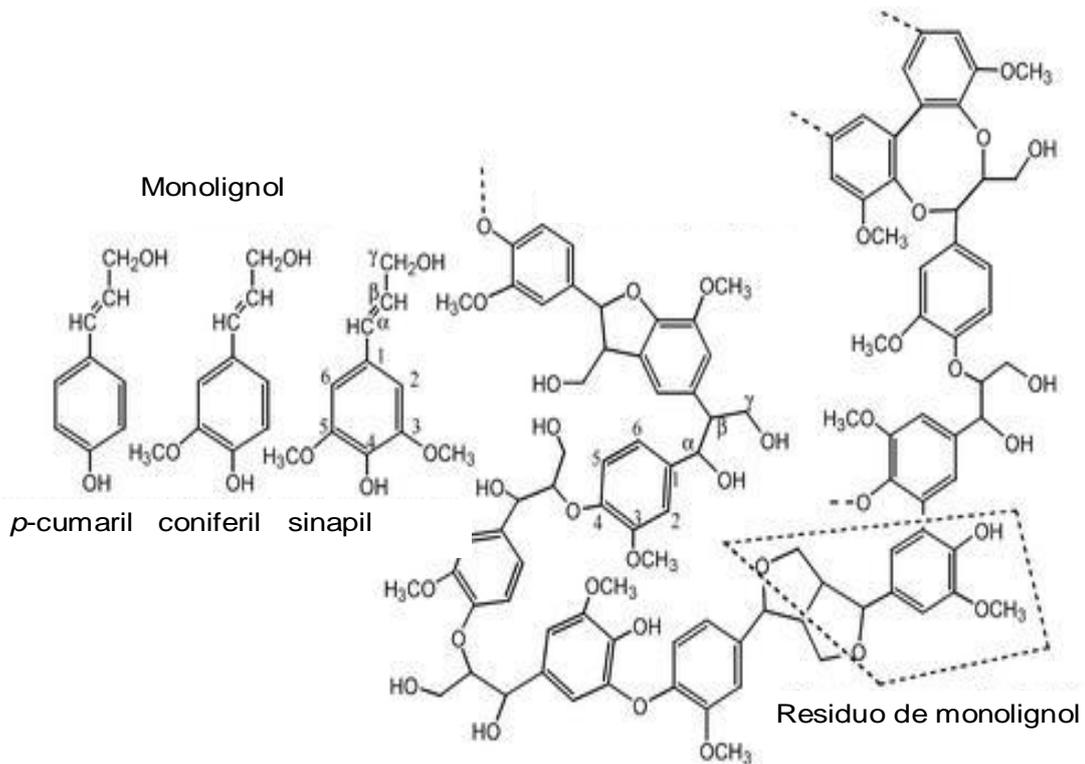


Figura 1.3 Estructura química de la lignina (Önnerud *et al.*, 2002).

4.3 Aprovechamiento de los componentes de la biomasa vegetal

La capacidad de digerir la celulosa está distribuida filogenéticamente en los grupos fungi dentro del dominio *Eucarya* y entre los géneros del dominio *Bacteria*, el cual ubica a microorganismos aerobios con capacidades celulolíticas en el orden *actinomicetal* (phylum *Actinobacteria*) y anaerobios en el orden *Clostridiales* (phylum *Firmicutes*) (Lynd *et al.*, 2002). Las bacterias celulolíticas se agrupan en anaerobias Gram positivo (*Clostridium* y *Ruminococcus*), anaerobias Gram negativo (*Butyrivibrio*, *Acetivibrio* y

Fibrobacter), aerobias Gram positivo (*Thermobifida*), aerobias facultativas (*Cytophaga* y *Sporocytophaga*).

4.3.1 Hidrólisis de lignina por hongos basidiomicetos

Los organismos aerobios acceden de manera eficiente a la fuente de energía de la biomasa vegetal, y organismos como los basidiomicetos pueden hidrolizar lignina por un proceso oxidativo, multienzimático e inespecífico, en el que participan enzimas ligninolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas (Higuchi, 2004).

En los basidiomicetos se han identificado tres familias de enzimas ligninolíticas extracelulares, lignino peroxidasas (LiP) (Schick y Tien, 1997) y manganeso peroxidasas (MnP) y lacasas (Leonowicz *et al.*, 2001). De manera particular el género *Pleurotus*, además de las enzimas LiP, MnP y lacasas posee otra enzima, la aril alcohol oxidasa (AAO), encargada de la ruptura de unidades fenólicas y oxidación de alcoholes bencílicos (Caramelo *et al.*, 1999). Estas enzimas tienen la capacidad de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina (Márquez, 2007).

4.3.1.1 Enzimas ligninolíticas extracelulares

La MnP oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} en presencia de peróxidos (Hatakka, 1994), y la mayoría de estas peroxidasas se caracterizan por depender del Mn^{2+} para concluir el ciclo catalítico además de actuar de manera directa en la lignina. Martínez *et al.* (1996) en géneros de *Pleurotus* observaron producción de peroxidasas dependientes de Mn^{2+} y adyacentemente no dependientes, estas últimas oxidando eficientemente el Mn^{2+} para cerrar el ciclo. En *Pleurotus*

eryngui se purificó una enzima que comparte propiedades catalíticas de LiP y MnP de otros basidiomicetos, y además puede oxidar fenoles que no oxidan directamente las LiPs y MnPs convencionales (Camarero *et al.*, 1999). Debido a su potencial óxido reducción la LiP oxida directamente compuestos aromáticos no fenólicos, y por lo tanto, la mayor parte de las unidades de la lignina (Schick y Tien, 1997).

Las lacasas (ρ -difenoil: oxígeno óxido reductasas) son polifenoloxidasas glicosiladas que contienen cobre y tienen un peso molecular en un intervalo de 60 a 80 kDa (Gianfreda *et al.*, 1999); éstas constituyen una parte esencial de un sistema complejo enzimático no específico ligninolítico secretado por hongos que hidrolizan lignina (Leonowicz *et al.*, 2001). Además pueden reducir el oxígeno y son estables a pH alcalino, debido a la inactivación del grupo hidroxilo durante el proceso de auto-oxidación (Gianfreda *et al.*, 1999).

Oxidasas y reductasas. En los basidiomicetos la función de las oxidasas extracelulares glicoxal oxidasa y aril alcohol oxidasa (AAO) es formar peróxido de hidrógeno para la función de las peroxidasas, así como de las reductasas de compuestos aromáticos y oxidoreductasas de celobiosas involucradas en la degradación de la lignina (Kersten, 1990; Asada *et al.*, 1995).

4.3.2 Descomposición de celulosa por los microorganismos ruminales

Con respecto a la degradación de la biomasa vegetal lignocelulósica por los microorganismos anaerobios, la barrera estructural y bioquímica que limita el aprovechamiento es el contenido de lignina (Buxton y Casler, 1993), por ubicarse transversalmente y vinculada a los polisacáridos por puentes químicos. Las células vegetales maduras presentan un marcado grado de

lignificación, las paredes presentan un engrosamiento en la lámina media de la pared primaria, y en ocasiones estas células sólo pueden ser digeridas desde el interior de la misma (Buxton y Radfearn, 1997).

El rumen está altamente especializado para almacenar y procesar forraje, la fermentación y utilización de este material está regulado por factores como la estructura y composición de las plantas, el animal y las características de las poblaciones bacterianas (Ortega, 1987). Esta parte del tubo digestivo aporta un ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos anaerobios, responsables de la descomposición del forraje (Trinci *et al.*, 1994; Selinger *et al.*, 1996).

En el rumen hay una tasa baja de detección de oligosacáridos producidos de la celulosa lo cual indica un consumo inmediato por los microorganismos ruminales y el aprovechamiento indirecto de ellos por los rumiantes, lo cual se debe a la alta polimerización y la capacidad para degradar celulosa por estos microorganismos (Taguchi *et al.*, 2004).

4.3.2.1 Microorganismos ruminales celulolíticos

Fibrobacter succinogenes, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus* son microorganismos celulolíticos representativos en rumen (Shinkai y Kobayashi, 2007). Estas especies pueden utilizar celulosa o xilano y productos hidrolíticos como fuentes de energía casi únicas para crecimiento, desarrollando índices similares de digestión de celulosa (Weimer, 1996).

4.3.2.2 Mecanismos de adherencia en bacterias celulolíticas

La digestión de la pared celular mediante una fermentación ruminal ocasionada por la acción de las bacterias fibrolíticas implica la adherencia del microorganismo a las fibras vegetales vía una glicoproteína, característica que da lugar a diversas funciones ecológicas de las poblaciones adherentes y no adherentes de cada especie, proporcionando una ventaja selectiva a estas bacterias celulolíticas en un ambiente ruminal. Pero las dificultades importantes para la digestión de la celulosa son causados por la estructura de la membrana celular de la planta y por la penetración limitada de los microbios celulolíticos no móviles en el lumen de la célula (Weimer, 1996).

El proceso de adherencia de bacterias celulolíticas en rumen fue dividido por Miron *et al.* (2001) en: 1) transporte de bacterias no móviles al sustrato; 2) adherencia inicial no específica al sustrato dominada por los elementos que constituyen el glicocalix; 3) la adherencia específica formada de uniones con el sustrato dominada por celulosomas, conexiones de frimbrae y etiope glicoxilados de CBP (proteína de unión a celulosa) o glicocalix. Los mecanismos de adherencia de *R. albus* (Ohara *et al.*, 2000) y *R. flavefaciens* (Ding *et al.*, 2001) se deben a los complejos extracelulares descritos como celulosomas, los cuales pueden hidrolisar celulosa, hemicelulosa, y pectina; así como de las proteínas del Pili (Morrison y Miron, 2000; Miron *et al.*, 2001a; Rakotoarivonina *et al.*, 2002; Rakotoarivonina *et al.*, 2005) y glicocalix que contiene las sustancias poliméricas extracelulares (Weimer *et al.*, 2006).

4.3.2.2.1 Celulosoma

La hidrólisis de la pared celular vegetal por microorganismos anaerobios celulolíticos se debe a un complejo multicatalítico y multifuncional, identificado por primera vez en *Clostridium thermocellum* (Bayer y Lamed, 1986; Bayer *et al.*, 1998), y posteriormente en *Acetivibrio*, *Bacteroides* (Aurilia *et al.*, 2000; Devillard *et al.*, 2004) y *Ruminococcus* analizándose bioquímica y ultraestructuralmente. Este complejo extracelular de multi-proteínas llamado celulosoma contribuye a la actividad enzimática concertada en proximidad a la célula bacteriana, permitiendo sinergismo óptimo entre las celulasas, hemicelulasas y pectinasas presentes en el celulosoma (Fierobe *et al.*, 2002), y contribuye a la proliferación de bacterias celulolíticas en materiales celulósicos, con la flexibilidad para adherirse firmemente al sustrato (Lynd *et al.*, 2002). De igual forma, el celulosoma reduce al mínimo el excedente de la difusión de los productos de la hidrólisis de la celulosa, permitiendo el aprovechamiento eficiente de estos oligosacáridos por la célula huésped (Schwarz, 2001).

Para entender los mecanismos de adhesión de los celulosomas se realizaron estudios con biología molecular, analizando las secuencias de los dominios de anclaje (docking). Así, Aurilia *et al.* (2000) identificaron tres genes, por análisis de proteína (zigmograma) y SDS-PAGE, para la degradación de la pared celular en *R. flavefaciens* 17, con dominios esterasa: XynB (87 kDa), CesA (84 kDa) y XynE (88 kDa); los dominios CesA y XynB comparten 44 % de identidad significativa en la secuencia y pertenecen a la familia 3-carbohidrato esterasa, con actividad enzimática capaz de remover grupos acetil de xilanos.

Los policelulosomas (100 MDa) y celulosomas individuales (650,000 Da a 2.5 MDa) (Doi *et al.*, 2003) pueden hidrolizar celulosa, hemicelulosas, y pectina, los cuales son producidos por bacterias anaerobias tales como *Clostridium* (Schwarz, 2001). Los celulosomas se componen de un conglomerado de subunidades, cada una de las cuales abarca un sistema de módulos funcionales. Una subunidad no enzimática (Bayer *et al.*, 1994) integra funcionamientos múltiples llamada proteína de andamio (scaffolding) descrita por Shoseyov *et al.* (1992) y Sabathe *et al.* (2003) como CbpA, CipA o CipC, responsables de organizar las subunidades celulolíticas en el complejo multi-enzimático (Ding *et al.*, 2001), logrado por la interacción de dos dominios complementarios situados en los tipos de subunidades separadas que obran recíprocamente; es decir, múltiples dominios de cohesión en forma de andamio y un dominio anclaje en cada subunidad enzimática (Fierobe *et al.*, 2002), la interacción de alta afinidad de los múltiples dominios de andamio con el dominio de anclaje va a definir la estructura del celulosoma (Miller *et al.*, 2009).

Las secuencias del dominio de anclaje similares a las de *Clostridium* spp. fueron encontradas en enzimas de *Ruminococcus*; estos incluyen xilanasas, celulasas, y esterases de *R. flavefaciens* 17 (Aurilia *et al.*, 2000), y celulasas de *R. albus* (Ohara *et al.*, 2000). El descubrimiento de estos dominios en estas enzimas sugiere la organización del celulosoma en *Ruminococcus* spp implicando la presencia de dominios de proteína de anclaje que pueden organizar subunidades de enzima en tales complejos.

En el análisis de la organización de los celulosomas, Rincón *et al.* (2003) reportan la secuencia completa de DNA que codifica para la proteína de

andamio celulosomal ScaA de *R. flavefaciens* 17, con una masa molecular de 90.198 Da y tres dominios de cohesión, un dominio de anclaje C-terminal, y un dominio único N-terminal X de función desconocida. Los tres dominios de cohesión de ScaA reconocen dominios de anclaje situados en enzimas hidrolíticas, como EndB (Rincón *et al.*, 2001), XynB (Aurilia *et al.*, 2000). Las interacciones entre el dominio de anclaje ScaA y diversos dominios de cohesión en ScaB, indican que en los primeros existan diversas subunidades debido a la variabilidad en especificidad de las enzimas. Con respecto al tamaño se reportan celulosomas con una masa de 650,000 Da a 2.5 MD y policelulosomas de 100 MDa (Doi *et al.*, 2003).

Rincón *et al.* (2004) relacionaron a ScaC, proteína estructural como parte del celulosoma de *R. flavefaciens*, con un dominio de cohesión cuyo análisis filogenético revela una diferencia entre los dominios similares en las proteínas estructurales ScaA y ScaB de *R. flavefaciens*; pero ScaC posee un dominio de anclaje similar a dominios equivalentes en las enzimas EndB, EndA, XynB y XynD. El análisis de interacción proteína-proteína del dominio de cohesión de ScaC reveló que el dominio de anclaje de ScaC interactúa específicamente con el dominio de cohesión de ScaA. Los resultados indican que ScaC tiene una función estructural en el ensamblaje del celulosoma de *R. flavefaciens* mediante el cual se incorporan nuevos polipéptidos al andamiaje principal del celulosoma.

Devillard *et al.* (2004) reportaron una carencia de dominios de anclaje en las proteínas glicosida hidrolasa Cel9B (familia 9) y Cel84A (familia 48) de *R. albus* 8 indicando que estas enzimas no son proteínas celulosomales, pero

ambas proteínas son esenciales para la degradación y solubilidad eficiente de la celulosa. El análisis filogenético indica que los módulos *R. albus* identificados son diferentes a los de otras bacterias formando un ensamblaje distinto. Así, una variedad de funciones posibles se pueden todavía considerar para los módulos del C-terminal X (Rincón *et al.*, 2003), tales como facilitar la adherencia a celulosa, induciendo el acceso a la superficie de la célula, y mediar el ensamble en un complejo multiproteico del celulosoma (Devillard *et al.*, 2004).

El análisis genómico de *R. flavefaciens* Fd-1 revela lo diverso y elaborado del complejo celulosoma, el cual está conformando de 222 proteínas para el dominio de anclaje, las cuales participan en el montaje del celulosoma (Miller *et al.*, 2009) y mediante el estudio bioinformático se observaron en ellas patrones distintivos y regiones conservadoras en la secuencia. De acuerdo a las características únicas de la secuencia se dividen en seis grupos, y se evalúa la arquitectura modular de las proteínas emparentadas, algunas de las cuales tienen funcionamientos múltiples, ya que los dominios de anclaje contienen más de un módulo catalítico (Rincón *et al.*, 2010).

4.3.2.2.2 Glicocalix

Algunas especies anaerobias que utilizan celulosa no secretan cantidades mensurables de celulosa extracelular, pero sus celulasas están ubicadas directamente en la superficie de la célula en el glicocalix. Las especies celulolíticas anaerobias crecen óptimamente cuando se presenta la estrategia celulosa-enzima-microorganismo (CEM) y en donde la adherencia parece ser obligatoria para la utilización del sustrato (Lynd *et al.*, 2002), ya que

la inhibición de la adherencia célula-celulosa o la separación de las células ya adheridas reduce o evita totalmente la utilización de la celulosa en *F. succinogenes* y *Ruminococcus* spp. (Weimer *et al.*, 1993).

Los mecanismos de *R. albus* para la adherencia a la pared celular de plantas no se ha caracterizado completamente, pero recurre a estrategias múltiples que coordina las estructuras fimbrial del tipo 4 y otras asociadas a la célula bacteriana (Devillard, 2004), como el glicocalix que compone la estructura de la fimbria la cual implica a la proteína de CbpC, y celulosoma (Miron *et al.*, 2001). Así, el glicocalix se halla como un mecanismo dominante en bacterias celulolíticas ruminales, aun cuando cada especie de manera individual utiliza diferentes mecanismos de adherencia.

4.3.2.2.3 Pili

Muchas proteínas del pili actúan en la patogénesis, específicamente en la colonización de la célula huésped. Según Rakotoarivonina *et al.* (2002), pili está presente en la superficie de *R. albus* 20, e identificaron y caracterizaron una proteína denominada GP25 participa en la adherencia, y pertenece probablemente a la familia del pili de tipo IV, ya que GP25 presenta las características típicas de muchas bacterias patógenas Gram negativas. En estos organismos, la adherencia inmediata del pili de tipo IV a las células huésped está integrada por una sola subunidad estructural de masa molecular relativamente baja (17 a 25 kDa) (Alm y Mattick, 1997).

El *R. albus* 20 exhibe por lo menos dos estructuras de adherencia: pili (Rakotoarivonina *et al.*, 2002) o glicocalix (Mosoni y Gaillard-Martinie, 2001) y celulosoma (Miron *et al.*, 2001b). Aunque la presencia de las proteínas de pili

no se manifiestan en todas las especies de *R. albus* (Pegden *et al.*, 1998), el celulosoma siempre está implicado en el mecanismo de adherencia (Miron *et al.*, 2001b). Estos tres mecanismos de adherencia en *R. albus*, le permiten ser competitiva en este ecosistema.

4.3.2.2.4 Gliconasas

Las gliconasas están en especies de bacterias ruminales como *Fibrobacter succinogenes* (McGavin *et al.*, 1990), y su actividad parece estar relacionada con enzimas intracelulares más que a extracelulares. Al respecto, la degradación eficaz del sustrato se puede facilitar por el contacto directo entre las gliconasas superficiales y el sustrato celulósico. Las gliconasas superficiales pueden estar asociadas directa o indirectamente, con el proceso de la adherencia, pero en *R. albus* no están unidas directamente a la celulosa. Miron *et al.* (2001a) sugirieron que la adherencia y contacto directo entre las gliconasas bacterianas y el sustrato no son necesarios para la degradación eficaz, debido a que el celulosoma y organelos fimbriales se proponen para mediar el proceso de adherencia en *R. albus* (Morrison y Miron, 2000).

4.4 Catabolismo de la fermentación ruminal

Las endo y exocelulasas hidrolizan los enlaces β 1-4 liberando celobiosa, glucosa o pentosa como productos finales; la fragmentación de la hemicelulosa se asocia en un conjunto heterogéneo con otros componentes de la pared celular como la lignina, pero los productos finales de la hidrólisis son xilosa, xilobiosa y arabinosa (Church, 1993). Los monosacáridos son usados por bacterias anaerobias celulolíticas, a partir de glucosa 1-P por la acción de fosforilasas intracelulares, que metabolizan la glucosa-6-fosfato, vía ciclo de

Embden-Meyerhoff del catabolismo de la glucosa (Silva de Oliveira *et al.*, 2007), produciendo ácido acético y el CO₂.

En los anaerobios celulolíticos, el piruvato componente intermedio se cataliza vía oxido-reductasa, decarboxila el piruvato para dar origen a acetil-CoA, hasta la formación de ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente acetato, propionato y butirato. El lactato, no es un producto importante de la fermentación en los anaerobios. Así, la regeneración del electrón reducido implica no solamente al NAD reducido generado en el curso de la glicólisis, si no también el ferredoxin reducido generado vía piruvato por acción de la dehidrogenasa. La oxidoreductasa ferredoxin-ferredoxin-NAD es importante para volver a dirigir el flujo a etanol-lactato dehidrogenasa, fosfotransacetilasa y acetato quinasa (Lynd *et al.*, 2002).

4.5 Análisis moleculares en microorganismos ruminales

4.5.1 Ácido desoxirribonucleico

El DNA es un polinucleótido constituido por una cadena de unidades de desoxirribonucleótidos unidas covalentemente mediante enlaces fosfodiéster. Así, el DNA está constituido por una doble cadena helicoidal de desoxirribonucleótidos orientadas en sentido antiparalelo, una en sentido 5'→3' y la otra en 3'→5' (Watson y Crick, 1953). Las moléculas de oxígeno del ácido fosfórico se encuentran hacia el exterior de la hélice confirmando el carácter ácido, mientras en el interior se encuentran las bases nitrogenadas, las cuales pueden ser purinas (adenina y guanina) o pirimidinas (timina y citosina) (Madigan *et al.*, 2009). Si en una posición determinada de una cadena hay una adenina en la cadena complementaria siempre habrá una timina,

manteniéndose esta relación mediante dos enlaces de hidrógeno. Análogamente guanina y citosina forman otra correspondencia de bases mediante tres puentes de hidrógeno. Así el DNA forma una hélice de giro dextrógiro con 3.4 nm de longitud por vuelta completa con dos hendiduras llamadas surco mayor y surco menor (Rodríguez y Barrera, 2004).

4.5.1.1 Síntesis de la secuencia de DNA

Uno de los métodos usados de manera rutinaria para la síntesis *in vitro* de DNA es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) donde un segmento particular de DNA es específicamente amplificado por un par iniciadores que flanquean la región deseada. La amplificación se realiza en forma exponencial a través de repetidos ciclos con diferentes periodos y temperaturas en presencia de una enzima DNA polimerasa termoestable procedente del microorganismo termófilo *Thermus thermophilus*, clonada y purificada a partir de *Escherichia coli*. De este modo, un proceso de PCR de 20 a 40 ciclos, amplifica un millón de veces el número de copias de la región de DNA deseada (Mullis y Fuloona, 1987). El éxito científico reside en la obtención *in vitro* de copias de fragmentos específicos de DNA, basándose en mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del DNA durante la división celular.

4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto DNA específico, posibilitando la identificación y prescindiendo del uso de

radioisótopos, indispensables antes de su invención (Rodríguez y Barrera, 2004), y que consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

- 1) Desnaturalización del DNA bicatenario presente en la muestra, que consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del DNA a una temperatura de alrededor de 95 °C, por 1 min.
- 2) Apareamiento. Unión específica de los iniciadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases; la temperatura a la cual se realiza la unión (T_a , *annealing temperature*) es importante para controlar la especificidad de la reacción. La T_a depende de la composición de bases y del tamaño de los iniciadores. Se suelen emplear dos iniciadores que se unen cada uno a una cadena diferente, delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de los iniciadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR. Al ocurrir la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco con los iniciadores, la enzima que realiza la hibridación necesita del grupo OH- libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde se inicia la síntesis. Este proceso se realiza a una temperatura que oscila entre 50 y 60 °C.
- 3) Extensión de la cadena de DNA. Una vez que los iniciadores han encontrado la región complementaria en el DNA molde de cadena sencilla, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5'→3'. Esta etapa se realiza a 72 °C, temperatura donde la polimerasa tiene máxima actividad. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación y se

estima 1 min para alargar 1000 nucleótidos. Al finalizar todos los ciclos se realiza una última extensión a 72 °C por 5 min, para garantizar que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y logren exactamente la misma longitud (Pérez *et al.*, 2006).

4.5.3 Sistematización de las técnicas genéticas

La utilización de polimerasas termoestables junto con el diseño de termocicladores permitieron la automatización de la técnica de PCR, facilitando su empleo rutinario; además la creciente disponibilidad de iniciadores específicos es un factor clave para la expansión (Kanikuma *et al.*, 2003). Los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos permite conocer las secuencias de un número considerable de genes, y así el diseño de iniciadores para bacterias se desarrolló cuantitativamente y en especificidad. Mosoni *et al.* (2007) reportan diferentes conjuntos de iniciadores de PCR diseñados para amplificar cada una de estas poblaciones de bacterias, evaluando el uso y ventajas relativas para cada uno de ellos.

Actualmente, las técnicas de PCR desde la amplificación del material genético al análisis de los productos finales están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estos avances en las técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) se basan en la utilización de compuestos fluorescentes reduciendo en el tiempo necesario para obtener resultados, al no requerir un posterior análisis electroforético de los productos de PCR y al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se minimizan las posibilidades de contaminación con DNA exógeno. Además, el equipo proporciona en tiempo real un resultado cuantitativo (Hanna *et al.*, 2005).

4.5.4 Clonación de genes provenientes de microorganismos ruminales

Para comprender la función de las comunidades microbianas ruminales se realizaron diversos estudios para medir la actividad de genes de enzimas celulasas, xilanasas, celodextrinasa, glucanasa y endoglucanasa (Cuadro 1.1). Estos fueron clonados en diversos vectores y reproducidos en *E. coli* como sistema de expresión, para entender la importancia que tienen en la degradación de la fibra en rumen (Wallace, 1994).

El gen codificante para la síntesis de β -1,4- endoglucanasa en *R. albus* F-40 fue clonado por Kawai *et al.* (1987) en *E. coli* C600, usando el vector pBR322 y la enzima de restricción Hind III, para construir el plásmido recombinante pRA1 que contuvo a un fragmento del gen (3.6 Kbp) de *R. albus*. Barros y Thomson (1987) clonaron este mismo gen y lo expresaron en *E. coli*. En el Cuadro 1.1 se muestran algunos de los genes de *Ruminococcus* spp. que hidrolizan polisacáridos.

Howard y Write (1988) describieron el aislamiento y la expresión de 10 fragmentos de genes que codifican en *R. albus* δ para la actividad carboximetilcelulasa, usando el bacteriófago λ DASH como vector de la clonación y *E. coli* P2392 como sistema de expresión.

Ohmiya *et al.* (1988) utilizaron un plásmido pBR322 y *E. coli* HB101 para clonar el gen para celulasa de *R. albus* F-40, el cual codificó para un fragmento de 3.4 kbp, el tamaño de este fragmento fue reducido (1.9 kbp) y ligado en pUC19 para producción de celulasa por *E. coli* JM103. En el mismo año Chen *et al.* (1988) reportan una recombinación intergénica estable del gene β -

glucosidasa de *R. albus*, reproducido en *E. coli* HB101 con el plásmido pBR322.

Cuadro 1.1 Estudios de la clonación de genes *Ruminococcus sp* codificantes para enzimas que hidrolizan fibra.

Autor	Genes	Fuente	Vector	Sistema de expresión
Flint <i>et al.</i> 1989	Xilanasa $\beta(1-3,1-4)$ glucanasa	<i>R. flavefanciens</i>	λ EMBL3	<i>E. coli</i> P2392 y Q358
Chung-Ming <i>et al.</i> 1989	Endo- β -1,4-D-glucanasa Exo- β -1,4-D-glucanasa β -glucosidasa	<i>R. flavefanciens</i> 186	λ NM1149	<i>E. coli</i>
Ohmiya <i>et al.</i> 1989	Endo- β -1,4-D-glucanasa	<i>R. albus</i> F-40	Plásmido pUC118, pUC119	<i>E. coli</i> JM103
Howard y Write, 1990	Celulasa y xilanasa	<i>R. flavefanciens</i>	λ DASH	<i>E. coli</i>
Flint <i>et al.</i> 1991	Xilanasa (xynA y xynB)	<i>R. flavefanciens</i> 17	(clonado) λ EMBL3 y (subclonado) Plásmido pUC13	<i>E. coli</i> HBI01
Ohmiya <i>et al.</i> 1991	Endoglucanasa	<i>R. albus</i>	Plásmido pUC118, pUC119	<i>E. coli</i>
Flint <i>et al.</i> 1993	Xilanasa glucanasa	<i>R. flavefanciens</i>	Phaghe EMBL3	<i>E. coli</i>
Wang <i>et al.</i> 1993	Endoglucanasa y celodextrinasa	<i>R. flavefanciens</i>	Suttle vector pEB1	<i>E. coli</i>

Ohmiya *et al.* (1989) estudiaron la estructura del Gen Endo-1,4-1-glucanase en *Ruminococcus*, con un fragmento cromosómico de DNA que codifica para este, el cual fue clonado y expresado en *E. Coli* con el plásmido pUC18.

Cocconcelli *et al.* (1992) realizaron la transformación acertada para *R. albus* subespecie *Ruminococcus*, usando un vector lactococcal pCK17 y pSC22, los cuales fueron introducidos por electroporación. El uso de *E. coli* como una bacteria transformante y como sistema de expresión es debido a la caracterización detallada de este microorganismo, lo que determina su uso potencial (Cosloy y Oishi, 1973).

4.5.5 Composición y proporción de las poblaciones

La complejidad del ecosistema ruminal, dificulta estudiarlo por los métodos convencionales de aislamiento y caracterización, además de la carencia de un medio que permita el crecimiento de la totalidad de los microorganismos ruminales; la composición y proporción de las poblaciones basadas en características fenotípicas y pruebas bioquímicas no son suficientes para estudiar la diversidad entre estos, así como los cambios en la población ruminal debido a diferentes dietas; por lo tanto, tales variaciones pueden ser estudiadas usando diversas técnicas moleculares (Kamra, 2005).

Los análisis moleculares de bacterias ruminales se basan en *Fibrobacter succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens*, debido a la importancia en la degradación de la pared celular de la planta, relacionada con la dinámica de poblaciones de estas bacterias (Mosoni *et al.*, 2007).

Los estudios moleculares de la microbiota ruminal se basan en la composición y proporción de las poblaciones, aportando un panorama de la variación de estas con respecto a factores externos, los cuales se han estudiado utilizando enfoques moleculares dirigidos al gen ribosomal 16S rRNA o a el gen 16S rDNA (Denman y McSweeney, 2006; Mosoni *et al.*, 2007; Stevenson y Weimer 2007).

Krause *et al.* (1999) determinaron en *Ruminococcus* spp. la relación existente entre el genotipo y el fenotipo (digestibilidad de la fibra) usando métodos de tipificación genética como la técnica de rep-PCR, que consiste en la amplificación de regiones ERIC (secuencias repetidas intergénicas conceso de enterobacterias), REP (secuencias repetidas extragénicas palindrómicas) y las regiones conservadas del 16-23S rDNA, mostrando una diversidad fenotípica y genotípica sugiriendo cultivos altamente fibrolíticos.

Las variaciones microbianas en rumen, debido a cambios en la dieta, se estudian diseñando y validando iniciadores (Tajima *et al.*, 2001), para la detección específica de bacterias ruminales por PCR tiempo real. Las poblaciones de las bacterianas celulolíticas: *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens* en líquido ruminal se estudian usando registros genómicos de cada especie (Mosoni *et al.*, 2007; Wanapat y Cherdthong 2009).

Los estudios concernientes a la expresión genética de los microorganismos del rumen *in vitro* o *in vivo* que describen la actividad de grupos microbianos, midiendo la expresión de los genes que definen la función fueron reportadas por Krause *et al.* (2005), Esta actividad genética (mRNA) se traduce en proteínas y las funciones metabólicas que caracterizan el

ecosistema en un momento determinado. Por ejemplo, la abundancia relativa y la actividad enzimática de un grupo discreto funcional de las bacterias del rumen depende de la dieta y el tiempo, con relación a la frecuencia de la alimentación (Mosoni *et al.*, 2007).

4.5.6 Identificación microbiana

4.5.6.1 Sistemas miniaturizados de identificación microbiana

Existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con la finalidad de identificación como el uso de la catalasa y oxidasa (enzimas vinculadas con la respiración) de lectura inmediata. Dentro de las pruebas rápidas (tiempo de lectura 6 h) se reportan la hidrólisis del hipurato, la β -galactosidasa (ONPG orto nitro β -D-galactopiranosico), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol (utilización de compuestos nitrogenados); y las pruebas lentas (tiempo de lectura 18 a 48 h) óxido-fermentación (requerimientos de oxígeno), reducción de nitratos (utilización de compuestos nitrogenados), fenilalanina-desaminasa (descomposición de aminoácidos), hidrólisis de la esculina, rojo de metilo-Voges Proskauer (detección de enzimas y vías metabólicas), agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares (producción de ácido o gas), coagulasa, DNAsa, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa (detección de exoenzimas), utilización de citratos y malonato como fuente única de carbono, prueba de CAMP y pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias (optoquina, bacitracina y medio hipersalino), el inconveniente de estas pruebas es lo tardío e impreciso (Inserberg, 2004; MacFaddin, 2000).

Algunas pruebas bioquímicas experimentan mejoras sensibles en el tiempo de respuesta, la miniaturización de las baterías de pruebas, la automatización de realización y lectura. Actualmente existen en el mercado sistemas multipuebas con el fin hacer eficiente la identificación de bacterias, los cuales se basan en el metabolismo de sustratos específicos y detección mediante un sistema de indicadores, constituyendo el perfil bioquímico de un microorganismo determinado (Fung, 2002). Respecto a los sistemas miniaturizados de identificación microbiana disponibles en la actualidad, destacan los siguientes: OBIS (Oxid Biochemical Identification System) API BBL Enterotube y Oxi/Ferm Tube.

En el área de microbiología se realiza la identificación de organismos mediante el crecimiento en medios de cultivo, a pesar de la constatación de que la mayoría de ellos (> 99 %) no son cultivables por los métodos estándar (Amann *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998), estos métodos microbiológicos comparan determinadas características fenotípicas o expresión fenotípica de las cepas tipo con la descripción de la cepa a identificar, en correlación con el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática o los resultados de la compilación de las cepas caracterizadas de American Type Culture Collection (ATCC).

Los métodos microbiológicos tradicionales dependen de las condiciones de crecimiento, las cuales son influenciadas por la temperatura, pH, la presencia de nutrientes, potencial de óxido-reducción, estrés químico y ambiental, actividad de agua; por ello, la mayor parte de la identificación

microbiológica que recae en la detección de expresión fenotípica de bacterias, está inherentemente sometida a variación (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Las técnicas microbiológicas convencionales continúan basándose en principios y pruebas las cuales requieren el crecimiento del microorganismo, lo cual resulta en un proceso de identificación lento; además, una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos. Estas técnicas tienen limitaciones evidentes en cuanto a aplicabilidad y confiabilidad cuando se trata de microorganismos que crecen con dificultad, o no crecen en absoluto en medios de cultivo, o que muestran una actividad bioquímica muy limitada. Por lo tanto, se desarrollaron diferentes metodologías basadas en técnicas genéticas, dirigidas a minimizar estas limitaciones, aportando aspectos importantes como confiabilidad de la identificación y, en algunos casos, diagnóstico directo a partir de la muestra sin cultivo previo. Pero estas técnicas han superado a las clásicas en algunos casos, debido a diferentes problemas como complejidad técnica, disponibilidad sólo para ciertos microorganismos y la relación beneficio/costo. En conjunto, la irrupción de las técnicas genéticas tienen una repercusión muy importante en virología clínica, mientras en bacteriología, micología y parasitología, esta repercusión es menor (Muñoz-Bellido *et al.*, 2012).

De esta manera los métodos moleculares se dirigen a la detección de características estables contenidas en los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes en los seres vivos que cambian con el tiempo y pueden considerarse como cronómetros moleculares (Woese, 1987). Asumiendo que los cambios se producen al azar y aumentan con el tiempo de

manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas, estableciendo relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para la clasificación e identificación (Zuckerlandl y Pauling, 1965; Wells y Bennik, 2003).

4.5.6.2 Identificación microbiana mediante técnicas genéticas

La identificación de organismos vivos se inicia en 1735 y Carl Von Linne en *Systema Naturae* describió un sistema de clasificación de las plantas; pero se considera que hasta 1758 se formalizó el sistema jerárquico de nomenclatura binomial para clasificar a los organismos, esta jerarquía fue concebida independientemente de la teoría evolutiva (Koerner, 1999) y el éxito residía en la complejidad morfológica. Esta clasificación se trasladó a los microorganismos, pero la simplicidad morfológica, las características de desarrollo y la ausencia de fósiles condujeron estos planteamientos al fracaso. Después se logró unificar los sistemas de clasificación bacteriana, en Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology* publicado en 1923 por la sociedad Americana de Microbiología (ASM), el cual debido a los avances en el conocimiento de la estructura del DNA (Watson y Crick, 1953) se ha modificado con cambios cuantitativos y cualitativos.

Una vez que se explica la naturaleza y estructura de la molécula de DNA, se perciben conceptos como el de la evolución que es el proceso de cambio en el perfil genético de una población de individuos en el tiempo. Lo anterior, junto al desarrollo de nuevos métodos y técnicas para el estudio de la

composición de la secuencia de pares de bases, consiguieron establecer principios precisos para la clasificación bacteriana, además, las investigaciones basadas en el estudio de las secuencias del 16S y 5S RNA aportaron datos muy valiosos para llevar a cabo una clasificación bacteriana filogenética (Koerner, 1999).

En 1980 comenzó a desarrollarse un nuevo estándar para identificación de bacterias. Estas relaciones filogenéticas y después todas las formas de vida, podrían ser determinadas mediante la comparación de una parte estable del código genético (Woese, 1987; Wells y Bennik, 2003). Aquí se incluyeron los genes que codifican para las regiones 5S, 16S, 23S rRNA y los espacios intergénicos, y actualmente el gen 16S rRNA (subunidad pequeña del RNA ribosomal) es la molécula de elección en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, y otros microorganismos a nivel de especie, con 10,000 secuencias parciales o totales disponibles para la comparación (Garrity y Holt, 2001; Harmsen y Karch, 2004).

Para la identificación de un microorganismo se usó una técnica genética sencilla basada en la hibridación de ácidos nucleicos con sondas genéticas conocidas (oligonucleótidos sintéticos), utilizando sondas marcadas con compuestos radiactivos. Los problemas inherentes a la utilización de estos marcadores condujeron al empleo de sondas marcadas con enzimas y diseñadas para hibridar el RNA ribosómico del microorganismo en estudio. La técnica de PCR, propuesta por Mullis (1990), se emplea para amplificar el DNA de los microorganismos blanco y disponer así de una cantidad suficiente que permita la identificación (Gupta y Maiden, 2001). Estrategias moleculares

basadas en la PCR, clonación, secuenciación y el uso de sondas, permitió a los biólogos examinar la comunidad bacteriana total en una muestra sin un conocimiento a priori de las especies presentes en la mezcla (Amann *et al.*, 1995).

4.5.6.3 Inferencia filogenética

Cuando se clasifica a un organismo este se agrupa en especies y estas a su vez en otros grupos taxonómicos mayores, conectando linajes a través de ancestros comunes a este, una tarea que requiere entender la historia evolutiva de los organismos y como se relacionan entre si. Esto se define como filogenia, la cual es una disciplina donde interaccionan las matemáticas, la estadística, la informática y la biología, cuyo propósito es inferir y expresar las relaciones de parentesco, ancestría y descendencia, entre un conjunto de genes, de organismos, de especies o de taxa superiores a través de un grafo denominado árbol filogenético (Bansal y Meyer, 2002).

El árbol filogenético describe el patrón de sucesos de ramificación y en algunos casos, data estos sucesos en el tiempo. Este consiste en nodos conectados por ramas, los nodos terminales (OTUs) representan secuencias u organismos; los nodos internos representan a los ancestros hipotéticos y el ancestro de todas las secuencias comprendidas en el árbol. Este registra la secuencia de procesos de especiación, y refleja que taxones se encuentran más o menos estrechamente relacionados. Puesto que se carece de un conocimiento directo de la historia evolutiva, se debe inferir la filogenia indirectamente a partir de los datos (Brinkman y Leipe, 2001).

La filogenética molecular estudia las relaciones evolutivas de los genes y otras macromoléculas biológicas mediante el análisis de mutaciones en diversas posiciones en las secuencias y el desarrollo de hipótesis referente a la relación evolutiva de las biomoléculas. La descripción matemática de los árboles en términos de teoría de gráficas y teoría de probabilidad ha permitido cuantificar la estructura discreta del arreglo de ramas, medir las propiedades topológicas y compararlas con los árboles alternativos para la misma colección de unidades de muestreo (Semple y Steel, 2003).

Sokal y Sneath (1963) fundaron la taxonomía numérica basada en la similitud fenotípica, aplicando algoritmos matemáticos representados en un fenograma. Los métodos principales de análisis fenéticos son el agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) y Neighbour Joining (NJ). Henning (1966) concreta una metodología objetiva para reconstruir filogenias con base a caracteres compartidos entre organismos fósiles y contemporáneos en "Phylogenetic Systematics", surgiendo la disciplina de la filogenia numérica concibiéndola como un problema de inferencia estadística, introdujeron los métodos de parsimonia, verosimilitud y de matrices de distancias para inferir filogenias (Henning *et al.*, 1999).

4.5.6.3.1 Alineación de secuencias

Los ácidos nucleicos y proteínas presentan una secuencia lineal de componentes característicos, cada uno de estos puede ser tratado como un carácter individual. En las secuencias nucleótidas cada carácter puede asumir cuatro estados posibles (A, T, C, o G) en la secuencia nucleotida las

posiciones se denominan en sentido creciente, a partir del valor 1, desde el extremo 5' hacia el extremo 3' de la molécula.

El alineamiento de secuencias consiste en la comparación de dos secuencias para localizar las inserciones, deleciones o cambios puntuales en los nucleótidos que se producen en el proceso de divergencia de ambas desde el ancestro común. Así, cuando dos secuencias quedan alineadas se originan tres tipos de pares de alineamiento: emparejamientos (*match*), no emparejamientos (*smatches*) y huecos (*gaps*). Un *match* se produce cuando un nucleótido ocupa idéntica posición en las dos secuencias. En caso contrario, si el emparejamiento se produce entre nucleótidos diferentes, se producirá un *mismatch*. Finalmente, un *gap* se forma cuando un nucleótido se empareja con una base nula (inexistencia de un nucleótido), debido a que se ha producido una inserción o una deleción (*indel*) en una de las secuencias (Thompson *et al.*, 1994).

Teóricamente los algoritmos de programación usados para alinear pares de secuencias podrían extenderse a cualquier número de ellas (Eddy, 2004), pero la alineación de más de cuatro secuencias se vuelve complicada, por lo que se han desarrollado varias aproximaciones heurísticas. El alineamiento múltiple de secuencias puede ser visto como una generalización del alineamiento de pares de secuencias, donde la complejidad de esta aproximación crece exponencialmente con el número de secuencias que intervienen. La posibilidad de resolver el problema por métodos manuales queda descartada por la enorme complejidad del problema, limitándose este uso a casos con pequeños grupos. Por analogía con la comparación de pares

de secuencias, es posible aplicar la misma técnica de programación dinámica al caso exhaustivo multidimensional, pero el crecimiento exponencial de la complejidad de método limitó la aplicación práctica (Carrillo y Lipman, 1988).

Para realizar alineamientos múltiples se usan los programas MULTIALIGN (Barton y Sternberg, 1987), MULTAL (Taylor, 1988), pero el más empleado es el Clustal X (Thompson *et al.*, 1999) y CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), los cuales usan un algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch (1970).

4.5.6.3.2 Construcción de cladogramas

Las relaciones filogenéticas entre las diferentes cepas se presentan generalmente en forma de árbol. Para la construcción de árboles filogenéticos a partir de datos moleculares, los métodos se clasifican en métodos de distancias, parsimonia y similitud (Nei y Kumar, 2000).

El método de distancia (Análisis cluster) reconstruye el árbol verdadero representando la serie de eventos de divergencia entre las unidades taxonómicas estudiadas en el orden del suceso, si todos los eventos estuvieran adecuadamente representados en las secuencias (Swofford *et al.*, 1996; Brinkman y Leipe, 2001). La ventaja de estos consiste en una menor demanda en cálculo y en comparación con los basados en máxima verosimilitud y apelan a los mismos modelos de evolución molecular, la desventaja es que para fines prácticos los datos reales son desechados (Brinkman y Leipe, 2001b; Lewis, 2001; Morrone, 2000) es decir, la información contenida en la comparación, caracter por caracter se colapsa en una única medida de distancia entre cada par de secuencias. En este grupo se encuentra

el método UPGMA, el cual es un algoritmo de agrupamiento que une ramas en un árbol basándose en el criterio de maximizar la similitud entre pares y entre promedios de pares ya unidos. En sentido estricto, no es un método de distancia evolutiva (Li, 1997). UPGMA puede generar una topología acertada con las longitudes de ramas verdaderas sólo si la divergencia entre secuencias se apega a un reloj molecular (Swofford *et al.*, 1996), condición que raramente se cumple en la práctica.

También en dicho grupo se encuentra el método Neighbor-Joining, el cual conceptualmente se relaciona al análisis de clusters, pero no presupone que las frecuencias evolutivas sean iguales para todos los linajes. Se aplica habitualmente cuando se construyen árboles de distancia, independientemente del criterio de optimización (Brinkman y Leipe, 2001) que, al igual que los métodos de evolución mínima, descubre la filogenia correcta si las secuencias analizadas cumplen con el supuesto de homogeneidad de tasas de divergencia.

La máxima parsimonia es un criterio para seleccionar la mejor hipótesis de relaciones evolutivas entre varias especies igualmente soportadas por los datos. El criterio de simplicidad o parsimonia (De Queiroz y Poe, 2001), consiste en considerar como la mejor topología a aquella que implique el menor número de pasos evolutivos para explicar las diferencias observadas entre las diferentes secuencias analizadas (OTUs), a partir de los cuales se desea inferir una filogenia. La búsqueda del árbol más parsimonioso basada en el uso de datos moleculares difiere de las que usan otro tipo de datos en que no se especifica *a priori*, qué estados de carácter son derivados y cuales

ancestrales y en que los cambios de estados de carácter no se consideran irreversibles. Es importante notar que a menudo existirá más de un árbol con el mismo número mínimo de cambios de estado de carácter por lo que no será posible inferir un único árbol filogenético (Li, 1997). Para encontrar el árbol con la mayor parsimonia es necesario diferenciar entre las distintas posiciones nucleotídicas para detectar cuáles de ellas son las que nos permitirán encontrar dicho árbol. Así, un sitio es invariante si presenta el mismo nucleótido en todas las secuencias y variables, si presenta alguna variación en al menos una de las secuencias comparadas. Pero dentro de estos últimos sólo son interesantes aquellos sitios que sean informativos; es decir, aquellos que produzcan árboles evolutivos que expliquen las diferencias nucleotídicas mediante diferente número de procesos mutacionales (De Queiroz y Poe, 2001).

La máxima verosimilitud es un método estadístico, con algoritmos matemáticos sofisticados, que supone un modelo de proceso evolutivo de parámetros libres, dando como resultado la topología de árbol más “probable” que explique las diferencias de secuencias observadas. En la estimación por máxima verosimilitud se busca el árbol filogenético que maximiza la probabilidad asumiendo el mejor modelo evolutivo. Los criterios de elección de uno u otro algoritmo o modelo matemático que refleje un determinado supuesto evolutivo van a depender del tipo de análisis que se persigue (Lewis, 2001).

4.5.6.3.3 Estima de la confianza de los cladogramas

Los métodos que calculan el soporte individual de los grupos identificados en el análisis filogenético son: 1) Bootstrap, el cual fue adaptado

por Felsenstein (1985) para obtener valores de confianza para hipótesis filogenéticas con la cual se puede estimar una distribución desconocida mediante remuestreo 2) Jackknifing, método de muestreo que a diferencia de bootstrap, las matrices remuestreadas se crean eliminando caracteres al azar. El soporte de un árbol es una medida de la confianza del análisis filogenético que determina los resultados de un análisis cladístico y están influidos por el azar (Kitching *et al.*, 1998).

Una vez obtenido un árbol filogenético, se debe preguntar cuál es el nivel de confianza del mismo, por qué es mejor que otros, o si todas las ramas presentan la misma confianza. Para obtener una respuesta a estas preguntas, Felsenstein (1985) desarrolló la técnica de *bootstrap* para secuencias nucleotídicas. El método está basado en técnicas de remuestreo, de tal forma que de las secuencias originales se generan pseudoreplicados (normalmente entre 500 y 1000).

4.5.6.4 El 16S rDNA, la molécula de elección en estudios de filogenia microbiana

Las relaciones filogenéticas en microorganismos con secuencias genómicas completas aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas, el análisis es difícil porque estas son de tamaño diferente, debido a la duplicación, transferencia, delección y escisión de genes (Woese *et al.*, 2000), por lo que se determinan mediante la comparación de los genes que codifican para la unidad 5S, 16S, 23S rRNA y los espacios intergénicos (Harmsen y Karch, 2004); a pesar de la existencia de cronómetros moleculares alternativos actualmente el gen 16S rDNA es el más utilizado en estudios de

diversidad y estudios de filogenia bacteriana (Woese, 1987; Garrity y Holt, 2001; Harmsen y Karch, 2004, Woo *et al.*, 2008), debido a que un análisis con genoma completo da como resultado, los árboles filogenéticos similares a los elaborados con el 16S rRNA, esto deduce las relaciones evolutivas con confiabilidad (Bansal y Meyer 2002), y predecir la clasificación de un organismo recién descubierto o de organismos poco conocidos.

El gen 16S rRNA también designado rDNA 16S, ambos términos utilizan indistintamente: la política actual de la American Society for Microbiology es hacer uso de "gen 16S rRNA". El gen 16S rRNA se puede comparar entre todas las bacterias (Olse y Woese, 1993).

El gen 16S rRNA, es un polirribonucleótido de una longitud de aproximadamente 1,500 pb, cuya secuencia de nucleótidos es de cadena sencilla, se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla; está compuesto de dos regiones variables y conservadas. El gen 16S rRNA es bastante grande, con suficientes polimorfismos interespecíficos, para obtener mediciones estadísticamente válidas (Clarridge, 2004).

El rRNA 18S en eucariotas es la macromolécula equivalente, debido a que los rRNA 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, los rRNA SSU (Neefs *et al.*, 1990).

Debido a que el 16s rRNA se encuentra altamente conservado, presenta regiones comunes a todos los organismos y las variaciones se concentran en zonas específicas. En el análisis de la secuencia de distintos grupos filogenéticos, se reveló la presencia de una o más secuencias específicas

cortas en miembros de un determinado grupo filogenético y que no están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos, denominados oligonucleótidos firma (Woese *et al.*, 1985). Las partes altamente conservadas de genes del 16S rRNA son ideales para el diseño de iniciadores universales, debido a la complementariedad de las bases nitrogenadas, con las regiones conservadas en el comienzo del gen, en la región 540 bp o al final de la secuencia completa (región 1550 bp). También se pueden diseñar iniciadores para regiones altamente variables del gen 16S rRNA y así amplificar solamente una especie en particular o de un género en una mezcla de microorganismos (Amann *et al.*, 1990).

El gen 16S rRNA es universal en bacterias, se utiliza para estimar relaciones filogenéticas entre estas, la comparación de las secuencias del gen 16S rRNA (máxima identidad) permite la diferenciación entre organismos a nivel de género en todos los principales phyla de bacterias, además de la clasificación de las cepas en múltiples niveles, incluyendo especies y subespecie (Woese *et al.*, 1985). Además, el análisis comparativo de secuencias deduce las relaciones filogenéticas detalladas con base en la evolución. Un mapa de la distancia evolutiva (árboles filogenéticos) generada a partir de datos de la secuencia 16S rRNA de genes, se destacan los principales linajes de *bacterias* y *arqueas* (Figura 1.4), que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando la posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Woese, 1987).

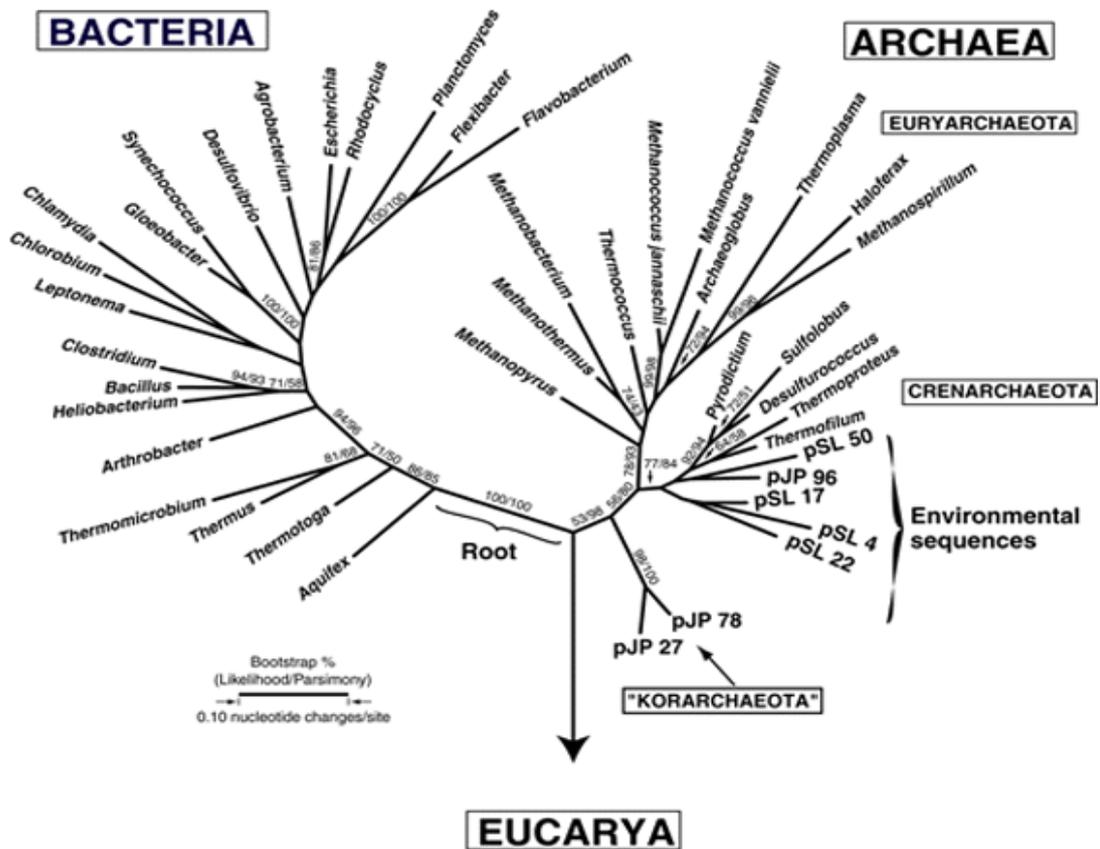


Figura 1.4. Árbol filogenético con los tres dominios de la vida (*Bacteria*, *Archaea* y *Eucarya*) basado en la distancia evolutiva de la molécula 16S rDNA (Barns *et al.*, 1996).

La secuencia directa del producto de la amplificación de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rRNA es un método discriminativo que permite identificar cepas de procariontes con cierta rapidez (Olsen y Woese, 1993; Rodicio y Mendoza, 2004). El RNA ribosómico 16S rRNA es una macromolécula ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía de las especies procariontes (Gevers *et al.*, 2005). La secuencia respectiva se compara en la base de datos del Gen Bank (Centro Nacional para Información de Biotecnología, NCBI) para posteriormente poder establecer relaciones filogenéticas y determinar la especie de manera puntual.

Los resultados de las relaciones filogenéticas de un organismos refieren el parentesco de éste con otros organismos ya secuenciados, así como la naturaleza monofilética de los taxones que se analizan y se expresan en porcentaje de identidad de secuencias y nunca en porcentaje de homología. Así, una especie bacteriana se define como el conjunto de cepas que comparten una identidad del 70 % o más, en reasociación DNA-DNA. Stackebrandt y Göbel (1994) publicaron que cepas con este nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97 % o mayor entre genes 16S rRNA. Así, cepas con menos del 97 % de identidad en las secuencias de sus 16S rDNA es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una identidad inferior al 50 % en experimentos de reasociación, y son clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 100 % a nivel de 16S rDNA, por lo cual, se afirma que la información que contiene este gen es limitada, y no es posible establecer valores numéricos de identidad de secuencias de 16S rRNA como frontera de una especie bacteriana. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación (Stackebrandt *et al.*, 2002).

El análisis del gen del 16S rRNA refleja la filogenia de los microorganismos, al asumir que la tasa de mutación es muy baja, ya que permanece con una fuerte presión conservadora, no indica la trayectoria evolutiva de un organismo, tan sólo la afiliación filogenética de un organismo o la secuencia con respecto a otros (Olsen y Woese, 1993).

5. LITERATURA CITADA

- Alm, R., A., and J. S. Mattick. 1997. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 192:89–98.
- Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Asada, Y., A. Watanabe, Y. Ohtsu, and M. Kuwahara. 1995. Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1339-1341.
- Aurilia, V., J. C. Martin, S. I. McCrae, K. P. Scott, M. T. Rincon, and H. J. Flint. 2000. Three multidomain esterases from the cellulolytic rumen anaerobe *Ruminococcus flavefaciens* 17 that carry divergent dockerin sequences. *Microbiology* 146:1391–1397.
- Bansal, A. K., and T. E. Meyer. 2002. Evolutionary analysis by whole genome comparisons. *J. Bacteriol.* 184(3):2260–2272.
- Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer, and N. R. Pace. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9188-9193.

- Barros, M. E. C., and J. A. Thomson. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a cellulase gene from *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 169:1760-1762.
- Barton, G. J., and J. E. Sternberg. 1987. A strategy for the rapid multiple alignment of protein sequences. Confidence levels from tertiary structure comparisons. J. Mol. Biol. 198:327-337.
- Bayer, E. A., and R. Lamed. 1986. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. J. Bacteriol. 167:828–836.
- Bayer, E. A., E. Morag, and R. Lamed. 1994. The cellulosome a treasure trove for biotechnology. Trends Biotechnol. 12:378–386.
- Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. Curr. Opin. Struct. Biol. 8:548–557.
- Bayer, E. A., P. M. Coutinho, and B. Henrissat. 1999. Cellulosome-like sequences in *Archaeoglobus fulgidus*: an enigmatic vestige of cohesion and dockeri domain. FEBS Lett. 463(3):277-280.
- Béguin P., and J. P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. 13:25-58.
- Berg-Miller, M. E, D. A Antonopoulos, M. T. Rincon, M. Band, A. Bari, T. Akraiko, A. Hernandez, J. Thimmapuram, B. Henrissat, P. M. Coutinho, I. Borovok, S. Jindou, R. Lamed, H. J. Flint, E. A. Bayer, and B. A. White. 2009. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. PLoS ONE 4(8):e6650.

- Brinkman, F. S. L., and D. L. Leipe. 2001. Phylogenetic analysis. En: Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins. A. D. Baxevanis B. F. F. Ouelette. Eds. Wiley-Interscience. Nueva York. 253 p.
- Buxton, D. R., and M. Casler D. 1993. Environmental and genetic effects on cell wall composition and digestibility. *In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy. Madison. pp. 685-714.
- Buxton, D. R., and D. Redfearn D. 1997. Plant limitations to riber digestion and utilization. *J.Nutr.* 127:814S-818S.
- Caramelo, L., M. J Martinez, and A. T. Martinez. 1999. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngi* involving a-keto-thiomethyl butyric acid and lignin model dimers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:916–922.
- Carrillo, H., and D. J. Lipman. 1988. The multiple sequence alignment problem in biology, *SIAM J. Appl. Math.* 48:1073-1082.
- Chen, W., K. Ohmiya, and S. Shimizu. 1986. Protoplast formation and regeneration of dehydrodivanillin degrading strains of *Fusobacterium varium* and *Enterococcus faecium*. *Appl. Env. Microbiol.* 52:612-616.
- Church, D. 1993. El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición: Zaragoza. 641 p.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 17(4):840–862.
- Cocconcelli, P. S., E. Ferrari, F. Rossi, and V. Bottazzi. 1992. Plasmid transformation of *Ruminococcus albus* by means of high-voltage electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 94(Issue 3):203-207.

- Cosloy, S. D., and M. Oishi. 1973 Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. Proc. Nat. Acad. Sci. 70(1):84-87.
- Davin, L. B., and N. G. Lewis. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. Plant Physiol. 123:453-461.
- De Queiroz, K., and S. Poe. 2001. Philosophy and phylogenetic inference: a comparison of likelihood and parsimony methods in the context of Karl Popper's writings on corroboration. Syst. Biol. 50(3):305-321.
- De Vries, R. P., and Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:497-522.
- Delmer, D. P., and Y. Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. Plant cell. 7:987-1000.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiol. Ecol. 58:572–582.
- Devillard, E., D. B. Goodheart, S. K. R. Karnati, E. A. Bayer, R. Lamed, J. Miron J., K. N. Nelson, and M. Morrison. 2004. *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both of which possess a novel modular architecture. J. Bacteriol. 186(1):136–145.
- Ding, S. Y, T. M. Rincon, R. Lamed, C. J. Martin, I. S. Mccrae, V. Aurilia, Y. Shoham, A. E. Bayer, and J. H Flint. 2001. Cellulosomal scaffoldin-like

- proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 183(6):1945-1953.
- Doi, R. H., Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru, and S. O. Han. 2003. Minireview: Cellulosomes from mesophilic bacteria. J. Bacteriol. 185(20):5907-5914.
- Eddy, S. R. 2004. What is dynamic programming? Nature Biotechnol. 22:909-910.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits o phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 38:16-24.
- Forbes, C., D. Hughes, and J. Fox. 2010. High-rate anaerobic degradation of 5 and 6 carbon sugars under thermophilic and mesophilic conditions. Bioresour. Technol. 101:3925–3930.
- Fierobe, H. P., E. A. Bayer, C. Tardif, M. Czjzek, A. Mechaly, A. Belaich, R. Lamed, Y. Shoham, and J. P. Belaich. 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. J. Biol. Chem. 277:49621-49630.
- Fisher, R. A. 1922. On the mathematical foundations of theoretical statistics. Philos. Trans., R. Soc. London A. 222:309-368.
- Flint, J. H., and M. A. Thomson. 1991. The genetic manipulation of rumen bacteria with special reference to fibre digestion. Anim. Feed Sci. Technol. 32:123-129.
- Fung, D. Y. C. 2002. Rapid methods and automation in microbiology. Rev. Sci. Food Safety. 1:3-22.
- Gevers, D., F. M. Coha, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F. L Thompson, and J. Swings. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. Nature Rev. Microbiol. 3:733-739.

- Gupta, S., and M. C. Maiden. 2001. Exploring the evolution of diversity in pathogen populations. *Trends Microbiol.* 9:181–185.
- Garrity, G. M., and J. G. Holt. 2001. The road map to the manual. *In*: G. M. Garrity (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York, N.Y. pp. 119–166.
- Gianfreda, L., F. Xu, and J. M. Bollag, 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.* 3:1-26.
- Goodwin, T. W., and Mercer, E. I. 1983. *Introduction to plant biochemistry*. 2da edition, Pergamon Press, Butterworth, Heineman. 677 p.
- Hanna, S. E., J. C. Connor, and H. H. Wang. 2005. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *J. Food Sci.* 70:49-53.
- Harmsen, D., and H. Karch. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* 70:19–24.
- Hatakka, A. 1994. Lignin modifying enzymes from selected White rot fungi Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:125-135.
- Hatfield, R. H., J. M. Marita, and K. Frost. 2005. Lignin acylation in grasses. *Cell Wall Biosynthesis Meeting*, Paper No.78.
- Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultured microorganisms. *Microb. Ecol.* 35:1-21.
- Hennig, W., D. Davis, and R. Zangerl. 1999. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, 263 p.

- Heredia, A., A. Jiménez, and Guillén R. 1995. Composition of plant cell walls. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.* 200:24-31.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23-63.
- Higuchi, T. 2004. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proceedings of the Japan Academy. Series B* 80(5):204-214.
- Howard, G. T., and B. A. White. 1988. Molecular cloning and expression of cellulase genes from *Ruminococcus albus* 8 in *Escherichia coli* bacteriophage X. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1752-1755.
- Hu, Z., H. Yu, and R. Zhu. 2005. Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 66:2461–2470.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.
- Inseberg, H. D. 1994. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, American Society for Microbiology. 200 p.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. Special section: microbial diversity. *Current Sci.* 89(1):124-135.
- Kanikuma, K., M. Fukusima, and R. Kawaguchi. 2003. Detection and identification of *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* by microarrays using the *gyrB* gene. *Biotechnol. Bioeng.* 83:721-728.

- Kawai, S., H. Honda, T. Tanase, M. Taya, S. Lijima, and T. Kobayashi. 1987. Molecular cloning of *Ruminococcus albus* cellulase gene. Agric. Biol. Chem. 51:59-63.
- Kersten, P. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:2936-2940.
- Kirk, T. K., and R. L. Farrell. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41(1):465-501.
- Kitching, I. J., P. L. Forey, C. J. Humphries, D. M. Williams. 1998. Cladistics: Second edition. Theory and practice of parsimony analysis. Oxford University Press, Oxford New York. Pp. 228.
- Koerner, L. 1999. Linnaeus: Nature and Nation. Harvard University Press .
- Krause, D. O., R. J. Bunch, J. M. Smith, and C. S. McSweeney. 1999. Diversity of *Ruminococcus* strains: a survey of genetic polymorphisms and plant digesting ability. J. Appl. Bacteriol. 86: 487-495.
- Krause, D. O., W. J. Smith M., and Ch. S. Msweeney. 2004. Use of community genome arrays (CGAs) to assess the effects of *Acacia angustissima* on rumen ecology. Microbiology 150:2899-2909.
- Lee, Z., S. Li, and S. Cheng. 2010. Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. Int. J. Hydrogen Energy. 35(24):458–466.
- Leonowicz, A., N. S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, and J. Rogalski. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. Basic. Microbiol. 41:185-227.

- Lewis, P. O. 2001. Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends ecol. Evol.* 16:30-37.
- Li, W. H. 1997. *Molecular evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L, G.J. Olsen, P.J. Waddell y D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. *In*: D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable . Eds. *Molecular systematics*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- 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.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, and D. P. Clark. 2009. *Brock, Biología de los microorganismos*. C. Barranchina, M. Berlanga, M. G. D. Claros, M. F. Gacto, C. L. García, A. Prats, J. A. Ruiz, A. L. Ruiz-Bravo, traductores. 12 ed. Editorial Pearson Addison Wesley. 1259 p.
- Márquez, A. A., T., G. D. Mendoza M., S. S. González M., S. E. Buntinx D., y O. Loera C. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUm1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia.* 32 (11):780-785.
- Martínez, M. J., F. J Ruiz-Dueñas, F. Guillén, and A. T. Martínez. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.*, 237:424-432.
- McGavin, M., J. Lam, and C. W. Forsberg. 1990. Regulation and distribution of *Fibrobacter succinogenes* sub sp. *succinogenes* S85 endoglucanases. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1235.

- Miron, J., J. Jacobovitch, E. A. Bayer, R. Lamed, M. Morrison, and D. Ben-Ghedalia, 2001a. Subcellular distribution of glycanases and related components in *Ruminococcus albus* SY3 and their role in cell adhesion to cellulose. *J. Appl. Microbiol.* 91:677-685.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, and M. Morrison. 2001b. Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *J. Dairy Sci.* 84:1294–1309.
- Mosoni, P., and B. Gaillard-Martinie. 2001. Characterization of a spontaneous adhesion-defective mutant of *Ruminococcus albus* strain 20. *Arch. Microbiol.* 176:52–61.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Béra-Maillet, E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103:2676-2685.
- Morrison, M., and J. Miron. 2000. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins. *FEMS Microbiol. Letters.* 185:109–115.
- Morrone, J. J. 2000. El lenguaje de la cladística. Programa Libro de Texto Universitario, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México, D. F. 109 p.
- Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262(4):56-65.
- Mullis, K., and F. Fuloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Meth. enzymol.* 55:335-350.

- Muñoz-Bellido, J. L., S. Vega C., L. Ferreira, F. J. Sánchez y J. M. González B. 2012. Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30(7):383-93.
- Needleman, S. B., and C. D. Wunsch. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- Neefs, J. M., Y. Van de Peer, L. Hendriks, and R. De Wachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 18:2237-2330.
- Nei, M., and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. Nueva York. Pp. 333.
- Ohara, H., S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2000. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:254-260.
- Ohmiya, K., K. Nagashima, T. Kajino, E. Goto, A. Tsukada, and S. Shimizu. 1988. Cloning of the cellulase gene from *Ruminococcus albus* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1511-1515.
- Ohmiya, K., T. Kajino, A. Kato, and S. Shimizu. 1989. Structure of a *Ruminococcus albus* endo-1,4- β -glucanase. *Gene. J. Bacteriol.* 171(12): 6771-6775.
- Olsen, G. J., and C. R. Woese. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal* 7: 113-123.
- Önnerud, H., L. Zhang, G. Gellerstedt, and G. Henriksson. 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: A new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell.* 14(8):1953–1962.

- Ortega, M. A. E. 1987 Factores que afectan la digestibilidad del alimento en rumiantes. *Revista Veterinaria de México*. UNAM. 18:55-59.
- Pegden, R. S., M. A. Larson, R. J. Grant, and M. Morrison. 1998. Adherence of the gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* to cellulose and identification of a novel form of cellulose-binding protein which belongs to the Pil family of proteins. *J. Bacteriol.* 180:5921–5927.
- Pérez, S., and D. Samain. 2010. Structure and engineering of celluloses. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* (64):25-116.
- Pérez, F., M. A. Barido, J. Henen, y G. Venegoni. 2006. Obtención de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* en un laboratorio de mediana complejidad. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 40(4):521-524.
- Rakotoarivonina, H., G. Jubelin, M. Hebraud, B. Gaillard-Martinie, E. Forano P. Mosoni. 2002. Adhesion to cellulose of the Gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV pili. *Microbiology.* 148(6):1871-1880.
- Rakotoarivonina, H., M. A. Larson, M. Morrison, J. P. Girardeau, B. Gaillard-Martinie, E. Forano, and P. Mosoni. 2005. *Microbiology.* 151:1291-1299.
- Rincon, M. T., S. I. McCrae, J. Kirby, K. P. Scott, and H. J. Flint. 2001. EndB, a multidomain family 44 cellulase from *Ruminococcus flavefaciens* 17, binds to cellulose via a novel cellulose-binding module and to another *R. flavefaciens* protein via a dockerin domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4426-4431.
- Rincon, M. T., S. Y. Ding, S. I. McCrae, J. C. Martin, V. Aurilia, R. Lamed, Y. Shoham, E. A. Bayer, and H. J. Flint. 2003. Novel organization and

- divergent dockerin specificities in the cellulosome system of *Ruminococcus flavefaciens*. J. Bacteriol. 185:703–713.
- Rincón, T. M., J. C. Martin, V. Aurilia, I. S. McCrae, J. G. Rucklidge, D. M. Reid, A. E. Bayer, R. Lamed, and J. H. Flin. 2004. ScaC an adaptor protein carrying a novel cohesin that expands the dockerin-binding repertoire of the *Ruminococcus flavefaciens* 17 cellulosome. J. Bacteriol. 186(9):2576–2585.
- Rincon, T. M., B. Dassa, J. H. Flint, J. A. Travis, S. Jindou, I. Borovok, R. Lamed, E. A Bayer, B. Henrissat, M. P. Coutinho, D. A. Antonopoulos, E. Margret, E. M. Berg-Miller, and B. A. White. 2010. Abundance and diversity of dockerin-containing proteins in the fiber-degrading rumen bacterium, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. PLoS ONE. 5(8): e12476.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22(4):238-245.
- Rodríguez S. P. I. y S. H. A. Barrera. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. VOL. VII, No. 3. 328:315-132.
- Selinger, L. B., C. W. Forsberg, and K. J. Cheng. 1996. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe. 2:263–284.
- Schick, Z L., and M. Tien. 1997. The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. J. Biotechnol. 53:93-102.
- Schwarz, W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:634–649.

- Shinkai, T., and Y. Kobayashi. 2007. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5):1646-1652.
- Shoseyov, O., M. Takagi, M. A. Goldstein, and R. H. Doi. 1992. Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3483–3487.
- Siebert, D. J. 1992. Tree statistics; trees and confidence; consensus trees; alternatives to parsimony; character weighting; character conflict and its resolution. 191 p.
- Smith, C. J. 1993. Carbohydrate chemistry. In: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Lea, P. J., and R. C Leegood. eds. John Wiley and Sons, Ltd, Inglaterra. Pp.74-111.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequencing analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kampf, M. C. J. Maiden, X. Nesme, Rosselló-Mora, and J. Swings. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043–1047.
- Stevenson, D. M., and P. J Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75(1):165-74.

- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J., and Hillis, D. M. 1996. Phylogenetic inference, *In*: Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable. Molecular Systematics. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 407-514 p.
- Suarez, J., and G. J. Martin. 2010, Producción de agroenergía a partir de biomasa en sistemas agroforestales integrados: una alternativa para lograr la seguridad alimentaria y la protección ambiental. *Pastos y Forrajes*. 33(3):1-12.
- Taguchi H., D. Hagiwara, T. Genma, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2004. Cloning of the *Ruminococcus albus* cel5D and cel9A Genes encoding dokerin module-containing endglucanases and expression of cel5D in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(7):1557-1564.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2007. Fisiología Vegetal. Publicaciones de la Universidad Jaume I, traducción de la 3ª Edición en inglés. 1338 p.
- Tajima, K., R. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, and Y. Benno. 2001. Diet-Dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6):2766-2774.
- Taylor, W. R. 1998. Dynamic sequence databank searching with templates and multiple alignment. *J. Mol. Biol.* 280:375-406.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

- Thompson, J. D., F. Plewniak, and O. Poch. 1999. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res.* 27:2682-2690.
- Trinci, A. P. J., D. R. Davies, K. Gull, M. I. Lawrence, B. B. Nielsen, A. Rickers, and M. K. Theodorou. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.* 98:129-152.
- Wallace, R. J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: Progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72:2992- 3003.
- 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.
- Watson, J. D., and F. J. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Wang, A., L. Gao, N. Ren, J. Xu, C. Liu, G. Cao, H. Yu, W. Liu, C. L. Hemme, Z. He, and J. Zhou. 2011. Isolation and characterization of *Shigella flexneri* G3 capable of effective cellulosic saccharification under mesophilic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:517–523.
- Weimer, P. J, R. D Hatfield, and D. R. Buxton. 1993. Inhibition of ruminal cellulose fermentation by extracts of the perennial legume cicer milkvetch (*Astragaluscicer*). *Appl. Environ. Microbiol.* 59:405-409.
- Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose fast. *J. Dairy Sci.* 79:1496-1502.
- Weimer, J. P., P. J. N. Price, O. Kroukamp, L. M. Joubertm, G. M. Wolfaardt, and W. H. Van Zyl. 2006. Studies of the extracellular glycocalyx of the

- anaerobic cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 7. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7559–7566.
- Wells, J. M., and M. H. J. Bennik. 2003. Genomics of food-borne bacterial pathogens. *Nutr. Res. Rev.* 16:21-35.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H., and Yuen, K. Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:908–934.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–271.
- Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke, and G. E. Fox. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:143–151.
- Woese, C. R., G. J. Olsen, M. Ibba, and D. Soll. 2000. Comparisons of complete genome sequences allow the most objective and comprehensive descriptions possible of a lineage's evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:202–236
- Zuckerlandl, E., and L. Pauling. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8:357-66.

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y FILOGENIA DE UNA ESPECIE DE *Shigella* DE RUMEN CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR CELULOSA

Lorena Luna-Rodríguez*, David Hernández-Sanchez*, Hilda V. Silva-Rojas *, Mario A. Cobos-Peralta*, César Cortez-Romero*, Sergio S. González-Muñoz*

*Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, 56230.

RESUMEN

De una muestra de fluido ruminal se aisló y caracterizó una cepa de *Shigella* sp nov. en condiciones anaerobias, y creció en medio selectivo cuya única fuente de carbono fue celulosa y en condiciones óptimas (39 °C y pH 6.8). La bacteria aislada manifestó actividad celulolítica cuando se realizó la tinción con rojo congo en colonias de 10 d. La bacteria se identificó como Gram negativa, en forma de coco bacilo, después de 60 h de incubación. Los resultados filogenéticos indican que la bacteria aislada se ubica en el grupo monofilético perteneciente a *Shigella*, pero con 98 % de identidad con respecto a las demás especies del taxa, con lo cual se considera una especie no reconocida.

Palabras clave: *Shigella*, rumen, celulolítica, monofilético.

2.1 Introducción

El 93 % de la biomasa lignocelulósica es empleada como proveedor de energía primaria en procesos de combustión (Suárez y Martín, 2010). La biomasa puede ser hidrolizada a oligosacáridos por microorganismos anaerobios celulolíticos (Hu *et al.*, 2005). Los anaerobios termófilos (*Clostridium* y *Cellulomonas*) y anaerobios mesófilos (*Fibrobacter* y *Ruminococcus*) (Forbes *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010), utilizan mecanismos de adherencia a la fibra como celulosomas, proteínas del pili y el glicocalix (Weimer *et al.*, 2006), para aprovechar estos oligosacáridos (Weimer *et al.*, 2006), incluyendo celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Schwarz, 2001; Fierobe *et al.*, 2002). En los microorganismos mesófilos como los ruminales, la digestión de la celulosa implica la adherencia del microorganismo a las fibras vegetales. En el caso de *Ruminococcus albus* (Ohara *et al.*, 2000) y *R. flavefaciens* (Ding *et al.*, 2001) se debe a los celulosomas, a las proteínas del Pili (Morrison y Mirón, 2000; Mirón *et al.*, 2001a; Rakotoarivonina *et al.* 2002; Rakotoarivonina *et al.*, 2005) y al glicocalix que contiene las sustancias poliméricas extracelulares (Weimer *et al.*, 2006). Los géneros microorganismos ruminales celulolíticos son *Fibrobacter* y *Ruminococcus*, y Wang *et al.* (2011) reportaron el aislamiento y la caracterización de *Shigella flexneri* G3, desde líquido ruminal, en condiciones mesófilas, manifestando una producción eficiente de azúcares desde celulosa. En el presente estudio, los objetivos fueron aislar e identificar un microorganismo celulolítico de rumen, cultivado en un medio anaerobio cuya única fuente de carbono fue celulosa en incubación a 37 °C.

2.2 Materiales y Métodos

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Ruminal del Postgrado de Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

El presente experimento se desarrolló en dos fases:

- 1) Proceso de aislamiento de un cultivo bacteriano ruminal con potencial para hidrolizar carbohidratos estructurales.
- 2) Identificación y análisis filogenético del cultivo aislado.

2.2.1 Aislamiento de una bacteria ruminal con capacidad para hidrolizar carbohidratos estructurales.

2.2.1.1 Obtención del inóculo ruminal bacteriano

Se empleó líquido ruminal fresco de un bovino (hembra, Holstein de 520 kg de peso vivo) provisto con una cánula ruminal. Se recolectaron 300 mL de líquido ruminal de la parte media ventral del rumen, el cual se utilizó como inóculo inicial de aislamiento (Mateo-Sánchez *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Crecimiento del cultivo en medio líquido selectivo

Se preparó un medio de cultivo líquido (MCL; Cuadro 2.1) anaerobio selectivo en tubos de 18x150 mm de acuerdo con la metodología descrita por Cobos y Yocoyama (1995) para el aislamiento de bacterias que crecen en un medio empleando celulosa (Papel Whatman) o carboximetil celulosa como

única fuente de carbono. En cada tubo se depositaron 9 mL de medio MCL y se incubó a 38 °C por 48 h para comprobar esterilidad.

La inoculación de los tubos con MCL se realizó con 1 mL de líquido ruminal fresco, se agitó en un vortex e incubó a 38 °C por 48 h. Al término de este periodo, se sustrajo el papel Whatman y fue depositado en otro tubo con MCL, se incubó a 37 °C hasta la hidrólisis total. De este crecimiento bacteriano se tomó 0.1 mL y se realizó la inoculación en MCL e incubó a 37 °C, se procedió a observar diariamente y una vez que se visualizó la degradación parcial del papel filtro, éste fue usado como inóculo para un nuevo transvase. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad en una cámara de seguridad biológica marca Labconco, Modelo Purifier Class II y con flujo de CO₂ (5psi) (Hungate, 1969). Después se realizó la siembra en un medio de cultivo sólido (MCS; Cuadro 2.2) anaerobio selectivo.

2.2.1.3 Aislamiento de bacterias en medio sólido

Para el aislamiento de bacterias que crecen en medio empleando carboximetil celulosa como única fuente de carbono se preparó medio carboximetil celulosa sólido (MCS) (Cuadro 2.2). En cada caja de petri se depositó de 20 a 25 mL de MCS, se esperó la solidificación e incubó a 38 °C por 48 h para comprobar esterilidad.

Se realizaron dos tipos de siembra, una por estría cruzada por triplicado y otra con las diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en cajas de Petri con MCS, utilizando un asa bacteriológica estéril e incubando a 38 °C por 72 h.

Cuadro 2.1. Medio de cultivo anaerobio líquido para el aislamiento de bacterias celulolíticas.

Componente	Cantidad 100 mL ⁻¹	Cantidad 100 mL ⁻¹
Agua destilada, mL	52.6	52.6
Líquido ruminal clarificado, mL ⁽¹⁾	30.0	30.0
Solución mineral I, mL ⁽²⁾	5.0	5.0
Solución mineral II, mL ⁽³⁾	5.0	5.0
Resarzurina 0.1 %, mL ⁽⁴⁾	0.1	0.1
Peptona de soya, g	0.2	0.2
Extracto de levadura, g	0.1	0.1
Carbonato de sodio, sol. Al 8 %, mL ⁽⁵⁾	5.0	5.0
Solución de cisteína sulfido de sodio, mL ⁽⁶⁾	2.0	2.0
Celulosa (papel Whatman)	Una tira	
Carboximertil celulosa, mg		0.28

⁽¹⁾Previamente filtrado a través de gasa triple y centrifugado a 23.000 x g, por 15 min tres veces, a 8 °C y esterilizado a 15 psi por 15 min a 121°C.

⁽²⁾Contiene 6 g de K₂ HPO₄, por 1000 mL de H₂O.

⁽³⁾Contiene 6 g KH₂ PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄; y 1.6 g CaCl 2H₂O por 1000 mL de H₂O (Bryant y Robinson, 1961).

⁽⁴⁾ Agregar 0.1 mL de solución 1 % en H₂O y aforar a 100 mL con H₂O destilada.

⁽⁵⁾ 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de H₂O destilada.

⁽⁶⁾ 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2n NaOH), 2.5 g de Na₂S·9H₂O y 0.1 mL de resarzurina en un volumen final de 100 mL.

Cuadro 2.2 Medio carboximetil celulosa sólido (MCS) para el aislamiento de bacterias celulolíticas.

Componente	Cantidad 100 mL ⁻¹
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado, mL ⁽¹⁾	30.0
Solución mineral I, mL ⁽²⁾	5.0
Solución mineral II, mL ⁽³⁾	5.0
Resazurina 0.1 %, mL ⁽⁴⁾	0.1
Peptona de soya, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Carbonato de sodio, sol. al 8 %, mL ⁽⁵⁾	5.0
Solución de cisteína sulfido de sodio, mL ⁽⁶⁾	2.0
Carboximetil celulosa, mg	0.280
Agar bacteriológico, g	1.5

⁽¹⁾Previamente filtrado a través de gasa triple y centrifugado a 23.000 x g, por 15 min tres veces, a 8 °C y esterilizado a 15 psi por 15 min a 121°C.

⁽²⁾Contiene 6 g de K₂ HPO₄, por 1000 mL de H₂O.

⁽³⁾Contiene 6 g KH₂ PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄; y 1.6 g CaCl 2H₂O por 1000 mL de H₂O (Bryant y Robinson, 1961).

⁽⁴⁾ Agregar 0.1 mL de solución 1 % en H₂O y aforar a 100 mL con H₂O destilada.

⁽⁵⁾ 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de H₂O destilada.

⁽⁶⁾ 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2n NaOH), 2.5 g de Na₂S-9H₂O y 0.1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL.

Concluido el tiempo de incubación se seleccionaron cajas de Petri con colonias aisladas y despues, se inoculó con un asa bacteriológica en MCL tomando una colonia, se dejaron crecer durante 48 h, y se volvió a sembrar por estría en medio sólido. Para cada uno de los procedimientos anteriores se realizaron observaciones para corroborar la similitud de los microorganismos aislados, se identificó la morfología de las colonias crecidas en CMS a las 24 h y posteriormente se realizaron preparaciones para observar a estas bacterias con respecto a la morfología microscópica y tipo de tinción (Gram) en un microscopio Zeiss binocular (100X/1.5 oil Ph3). Estos procedimientos se llevaron a cabo hasta obtener un cultivo puro. Una vez logrado el aislamiento de cultivo puro, se procedió a la reproducción masiva en MCL y finalmente se liofilizó.

2.2.2 Actividad enzimática de celulasas

En colonias crecidas por 10 d en medio CMS se realizó una tinción con solución de rojo Congo (1mg mL^{-1}) por 15 min y posteriormente se lavó el colorante con NaCl 0.1 M durante 15 min, logrando visualizar la actividad enzimática de celulasas al evidenciar el halo de degradación de la celulosa.

2.2.3 Identificación y análisis filogenético del cultivo aislado

Se usó el cultivo puro de la bacteria ruminal en la primera fase. Los componentes del medio bacteriológico, reactivos y compuestos químicos fueron de laboratorios comerciales de la más alta calidad. La extracción del material genómico (DNA) y los métodos generales de biología molecular se realizaron según Maniatis *et al.* (1982) y Hatfull (2000).

2.2.3.1 Extracción del material genómico (DNA)

El cultivo puro aislado liofilizado se hidrató en medio CML por 3 h y se tomó 1 mL como inóculo para obtener un cultivo de 24 h en CML y después se usó para sembrar por estría cruzada en medio sólido y obtener colonias aisladas. De las colonias ya crecidas se tomaron con una punta de micropipeta y se colocó el crecimiento bacteriano en 30 μL de amortiguador de lisis (desarrollado por el Laboratorio de Biotecnología de Semillas) contenido en un tubo Eppendorf. Enseguida se incubó a 95 °C por 5 min, después a 4 °C por 5 min y nuevamente a 95°C por 5 min; se centrifugó a 9391 x g por 2 min, el sobrenadante se colocó en un tubo limpio estéril y se cuantificó la concentración de DNA en el espectrofotómetro Nanodrop (Modelo 2000c, Thermo, USA). El DNA se mantuvo a -20 °C hasta ser utilizado (Sambrook *et al.*, 1989; Sielaff y Andreesen, 2005). La extracción del material genómico (DNA) y los métodos generales de biología molecular se realizaron según Maniatis *et al.* (1982), Miller *et al.*(1988) y Hatfull (2000).

2.2.3.2 Amplificación de los fragmentos de DNA

Con el DNA genómico del cultivo bacteriano se amplificó el gen 16S rDNA, el cual es usado para el análisis e identificación de procariotas; con iniciadores universales 8F y 1492R (Cuadro 2.3) a una concentración de 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$, diseñados para alinear regiones conservadas del gen bacteriano 16S rDNA los cuales amplifican aproximadamente 1500 pb.

Cuadro 2.3 Secuencias de los iniciadores para amplificar el gen 16S rDNA

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm	% GC
8F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	20	61.5	50
1492 R	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'	19	53.7	42.1

La amplificación se realizó mediante la PCR (Cuadro 2.5) y se utilizó el DNA mencionado como molde e iniciadores específicos que poseen diferentes sitios de restricción en los extremos 5'. Para la PCR se empleó el kit PCR Master Mix, el cual se fundamenta en la técnica descrita por Kolmodin y Williams (1996), y está optimizado para uso en reacciones de PCR (Cuadro 2.4) y amplificar la plantilla de DNA desde 0.2 a 2 kb.

Cuadro 2.4 Mezcla de reacción para PCR

Componentes	Volumen	Concentración Final
Amortiguador 5X	5.0 μ L	1X
dNTP's, 2.5 mM	2.0 μ L	0.2 mM
Iniciador 8F	2.0 μ L	10 μ M
Iniciador 1492	2.0 μ L	10 μ M
DNA molde 20 ng μ L ⁻¹	5.0 μ L	100 ng
<i>Taq</i> DNA polimerasa, 5U μ L ⁻¹	0.4 μ L	1U
Agua libre de nucleasas	8.6 μ L	N.A

Cuadro 2.5 Programa para el ensayo de la PCR. Gen 16S rDNA

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min (Desnaturalización)
30	95 °C	2 min (Desnaturalización)
	57 °C	1 min (Unión y reconocimiento de la polimerasa)
	72 °C	3 min (Catálisis de la polimerasa)
1	72 °C	durante 5 min (Extensión o polimerización final)
1	4 °C	Conservación por tiempo indefinido

2.2.3.3 Purificación del producto de PCR

Se purificó el producto de PCR amplificado con un sistema basado en la capacidad del DNA para unirse a las membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas, usando el Kit Wizard SV gel and PCR Cleand VP-System (Promega, USA). Después de la amplificación, se ensambló la minicolumna SV dentro del tubo colector y se transfirió la mezcla de una alícuota del producto de PCR (v/v) con la solución amortiguadora de unión a la membrana (isotiocianato de guanidina, 4.5 M; acetato de potasio, 0.5 M, pH 5.0) e incubó 1 min a 28 °C. Después se centrifugó 1 min a 16.000 × g, se separó la minicolumna SV del tubo de colección y descartó el líquido, nuevamente se ensambla la minicolumna SV dentro del tubo colector, se añadieron 700 µL de solución amortiguadora de lavado de la membrana (acetato de potasio 10 mM, pH 5.0; etanol 80 %; EDTA 16.7 µM, pH 8.0), previamente diluido con etanol al

95 % y se centrifugó 1 min a 16.000 x g. Se descartó el contenido del tubo de colección como indica previamente, se instaló el ensamble (minicolumna SV-tubo colector) y se duplicó el lavado con 500 µL de solución buffer de lavado de la membrana y se centrifugó 5 min a 16.000 x g.

Se retiró del ensamble, teniendo cuidado de no humedecer la parte inferior de la columna por el flujo y se transfirió cuidadosamente la minicolumna SV a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio. Se adicionaron 50 µL de agua libre de nucleasas al centro de la columna e incubó 1 min a 21 °C, después se centrifugó 1 min a 16.000 x g. Finalmente se descartó la minicolumna SV y se almacenó el tubo de microcentrífuga que contiene el DNA eluido a 4 °C o -20 °C.

2.2.3.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de la amplificación se visualizaron por medio de una corrida electroforética horizontal, a 110 V, durante 90 min en el equipo de electroforesis Termo EC Maxicell Primo EC 340. 5 µL del producto amplificado por PCR y un marcador escalera de 1 Kb se colocaron en un gel de agarosa de baja electroendósmosis al 1.5 % (p/v) [1.5 g de agarosa 100 mL⁻¹ solución TAE 1X (Tris 40 mM pH 8,0; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM)] (CIMMYT, 2006), usando como amortiguadora de corrida TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989; Poutou *et al.*, 2005). Después las bandas de DNA fueron visualizadas con luz UV con el transiluminador KODAK Gel Logic 100 Imaging System (365 nm) (Daly *et al.*, 2006), las cuales se tiñeron con una solución de SYBR Green ® (invitrogen) en concentración 1:10000.

2.2.3.5 Secuenciación del producto clonado

La secuenciación nucleotídica del segmento de DNA se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de Semillas, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo de México, utilizando el equipo 3130 Genetic Analyzer.

2.2.3.6 Análisis filogenético

La secuenciación nucleotídica del gen 16S rDNA se realizó para cada repetición usando cuatro iniciadores 8F, 1492R, U514F, y 800R, una vez obtenidos los resultados en el programa Sequencing Analysis v5.3.1 se crearon secuencias consenso para cada uno de los aislamientos con el programa BioEdit Sequence Alignment (v.7.0.9.0). Cada una de estas secuencias se compararon con la opción BLAST-Nucleotide (Zhang *et al.*, 2000) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Para la selección de las secuencias que se emplearon para el análisis filogenético, se consideraron las que constan en publicaciones, que pertenezcan a organismos registrados en alguna colección internacional, como la Word Data Center for Microorganism u grupos de investigación reconocidos en el campo de estudio (ATCC, LMG), que confirme la correcta identificación de los microorganismos. La alineación de las secuencias se realizó con el ClustalW incluido en el programa MEGA (v.4.0). Para la construcción del árbol filogenético (Tamura *et al.*, 2007) se usó el método discreto de máxima parsimonia. La confiabilidad de la predicción fue evaluada con 5,000 réplicas al azar de los alineamientos (bootstrap).

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Actividad enzimática de celulasas

La pluralidad de especies que existen en un determinado hábitat es una consecuencia de la relación entre los organismos y el ambiente (Schiraldi *et al.*, 2002); existe una gran variedad de microorganismos con capacidad de degradar materiales lignocelulósicos (Madigan *et al.*, 2000). Una inspección de árboles filogenéticos revela que la capacidad de digerir celulosa está distribuida en géneros del dominio *bacteria* y en los grupos fungi dentro del dominio *Eucaria* (Lynd *et al.*, 2002). *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus* son reportados como microorganismos celulolíticos representativos en rumen (Wanapat y Cherdthong, 2009), con mayor actividad celulolítica (Shinkai y Kobayashi, 2007), estas especies pueden utilizar la celulosa o xilano y productos hidrolíticos como fuentes de energía (Taguchi *et al.*, 2004). Algunos hongos de los géneros *Neurospora*, *Monilia* y *Paecilomyces*, también son reportados con habilidad de fermentar celulosa y las bacterias de los géneros *Clostridium*, *Cellulonomas*, *Bacillus*, *Termomonospora*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces* como productores de celulasas (Singh *et al.*, 1992).

El microorganismo aislado de rumen presenta actividad enzimática celulolítica, el método de tinción con rojo Congo permitió visualizar esta actividad (Figura 2.1), en medio sólido carboximetil celulosa (CMS) evidenciando la actividad β -D-Glucanasas como zonas de degradación ("halos") en el sitio de colonias crecidas durante 10 d (Farrow y Arnold, 2001).

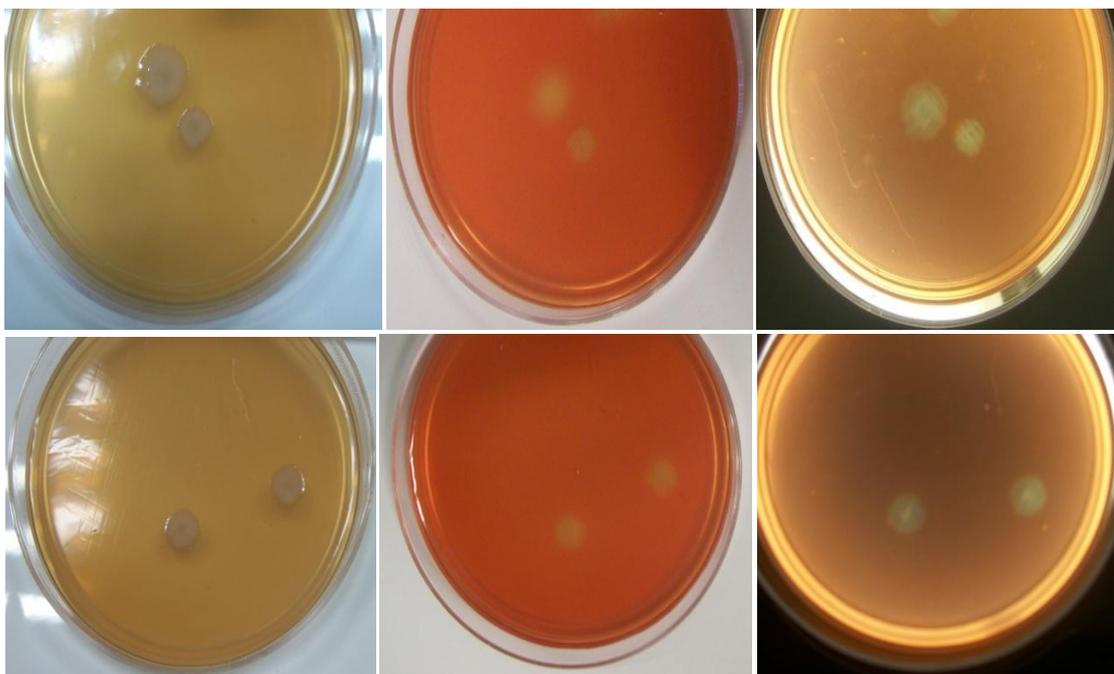


Figura 2.1 Identificación de colonias degradadoras de celulosa tinción de Rojo Congo, en medio de cultivo sólido carboximetil celulosa, crecidas durante 10 d.

2.3.2. Morfología macroscópica y microscópica

La morfología de la cepa bacteriana aislada corresponde a un cocobacilo, Gram negativo (Penatti *et al.*, 2007), contrario a la reportado en *R. flavefaciens* y *R. albus*. En cuanto a la morfología colonial se produjeron colonias de color beige, de forma circular, con bordes lisos y plano convexas.



Figura 2.2 Morfología colonial del microorganismo aislado, crecido en medio de cultivo sólido carboximetil celulosa, durante 48 h.

2.3.3 Filogenia

En la identificación de la microbiota ruminal se han utilizado enfoques moleculares dirigidos al 16S rRNA o 16S rDNA (Denman y McSweeney, 2006; Deng *et al.*, 2007; Mosoni *et al.*, 2007; Stevenson y Weimer, 2007) y los reportes de microorganismos aislados en el rumen involucran a varias especies (Yang *et al.*, 2010) de diversos hábitats (Wanapat y Cherdthong, 2009). En este estudio la secuencia de la región 16S rDNA permitió identificar de manera precisa a la bacteria aislada, comparando las secuencias en el BLAST-Nucleotide del National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. El número de bases correspondiente a la región ribosomal 16S rDNA que se logró amplificar fue de 1500 bp (Figura 2.3). Con respecto a lo reportado, se puede inferir que la longitud del segmento secuenciado es significativo, ya que puede proporcionar información comparable, para distinguir entre los taxones en particular o las cepas. Sacchi *et al.* (2002) menciona que esta longitud es requerida cuando se describe una nueva especie. A pesar de ello, Kattar *et al.* (2001) encontraron que el 66 % de la variabilidad en la secuencia del gen 16S rRNA entre las especies de *Bordetella* estaba en los primeros 500 bp; además, Hall *et al.* (2003) realizaron estudios basándose en una secuencia de esta misma longitud, donde un número limitado de especies no pudieron ser diferenciados, pero es posible la identificación de especies inusuales con precisión, mientras que Bosshard *et al.* (2003) efectuaron identificaciones utilizando secuencias de aproximadamente 400 bp o incluso a menos de 200 bp.

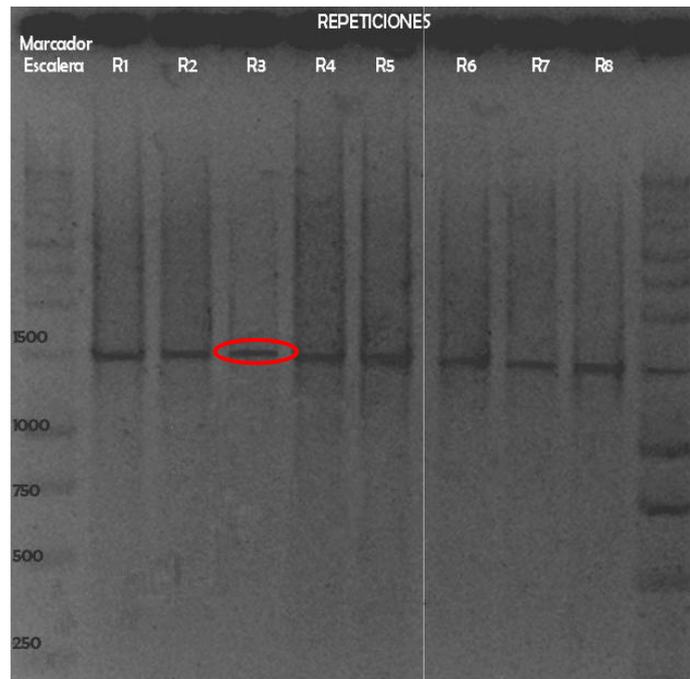


Figura 2.3 Resultados de la amplificación del 16S rDNA visualizados en gel de agarosa por electroforesis. Tamaño del fragmento 1500 bp.

Clarridge (2004) utilizó secuencias de longitudes de 500 y 1,500 bp, procedentes de 1,400 organismos, para generar dendrogramas y determinó que las relaciones de las especies son básicamente las mismas con ambas longitudes, mencionando que la generación de la secuencia de 500 bp es menos costosa.

Con las secuencias de DNA del aislado, se realizó un análisis para conocer la relación filogenética entre este, así como la posición que ocupa con respecto a las especies de *Shigella* y los organismos celulolíticos representativos de rumen.

El resultado de BLAST-Nucleotide, así como el árbol filogenético (Figura 2.4) construido con el método de Máxima Parsimonia, permite afirmar que la bacteria aislada del hábitat ruminal corresponde a una *Shigella*, ubicada en el grupo monofilético perteneciente a la misma con similitud del 98 % con

respecto a las demás especies del taxa, con lo cual podemos considerar que se trata de una especie no reconocida, debido a que cepas con menos del 97 % de identidad en las secuencias del 16S rRNA es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel especie.

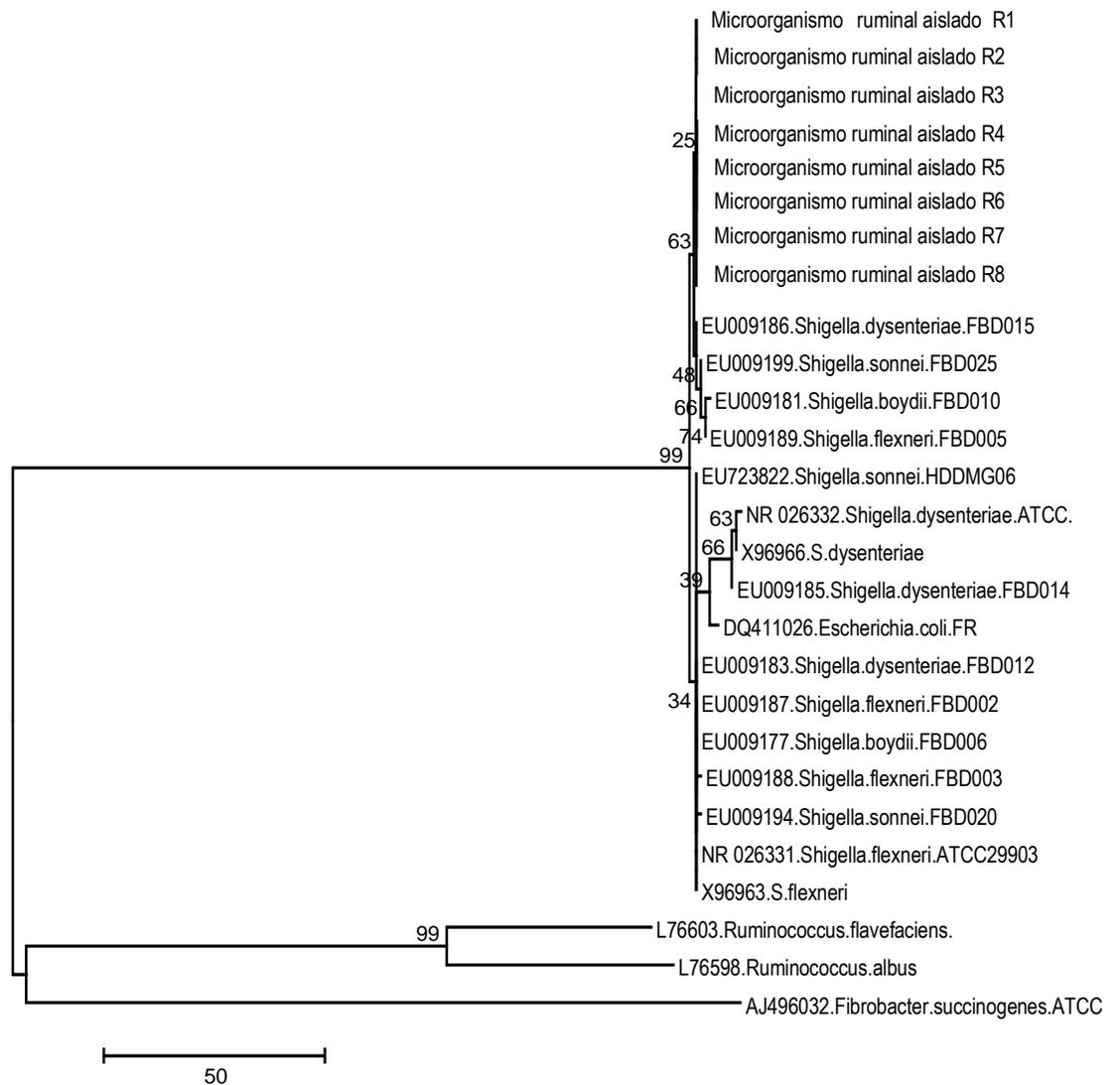


Figura 2.4. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA del microorganismo aislado y cepas de referencia. La construcción del árbol se empleó el método de Máxima Parsimonia, con 5,000 replicas. Los valores *Bootstrap* son mostrados entre las ramas respectivamente.

2.3.3.1. Alineamiento múltiple de secuencias e inferencia filogenética

Diversas regiones genómicas se han utilizado para determinar las relaciones filogenéticas entre las bacterias; pero se ha observado que los árboles concernientes al análisis genómico y los árboles de 16S rRNA de los genes son similares (Bansal y Meyer, 2002). Asimismo, al usar la secuencia del gen rRNA 16S se establece un método robusto, lo anterior indicado por los principales puntos de ramificación del árbol filogenético (Roth *et al.*, 1998).

Las ocho secuencias obtenidas fueron alineadas junto con otras 16 de *Shigella* y como grupo externo tres microorganismos representativos de rumen, secuencias de colecciones ATCC, LMG (Wang *et al.*, 2011).

2.4. Conclusiones

Con base a los estudios de amplificación de la región ribosomal 16S rDNA, se identificó que la bacteria aislada pertenece al género *Shigella*, la cual tiene capacidad para hidrolizar carbohidratos estructurales. El estudio aún es inconcluso, ya que esta bacteria hasta hace poco se reportaba en otros habitats, pero no del rumen. Estudios posteriores tendrán que incluir la cinética enzimática de esta bacteria para elucidar la importancia dentro del rumen.

2.5 Literatura citada

- Bansal, A. K., and T. E. Meyer. 2002. Evolutionary analysis by whole- genome comparisons. *J. Bacteriol.* 184:2260-2272.
- Bosshard, P. P, S. Abels, R. Zbinden, E. C Bottger, and M. Altwegg. 2003. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J. Clin.Microbiol.* 41:4134-4140.
- Bryant, M. P., and I. M. Robinson. 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* 44:1446.
- CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F. CIMMYT. 80 p.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *Ruminantium*: Colonisation and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. *In*: Wallace, R. J. and A. Lahloukassi (eds.). *Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of a Workshop Held at ILRI, Addis Ababa, Ethiopia.* Pp. 151-162.
- Daly, A. K., B. P. King, and Leathart. 2006. Genotyping for cytochrome P450 polymorphisms *In*: *Cytochrome P450 protocols*, edit. From Ian Randall Phillips and Elizabeth Anne Shephard. 2da. Edition. 363p.
- Daly, A. K., B. P. King, and Leathart. 2006. Genotyping for cytochrome P450 polymorphisms *In*: Phillips, I. R. and E. A. Shephard. *Cytochrome P450 Protocols.* Edition 2. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp.193-208.

- Deng, W. D., M. Wanapat, M. Songcheng, J. Chen, D. Xi, T. B. He, Z. Yang, and H. Mao. 2007. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences manifest rumen bacterial diversity in Gayals (*Bos frontalis*) fed fresh bamboo leaves and twigs (*Sinarumdinaria*). *Asian-Aust J Anim Sci* 20:1057–1066.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol.* 58:572–582.
- Ding, S.Y., M. T. Rincon, R. Lamed, C. J. Martin, I. S. McCrae, V. Aurilia, Y. Shoham, A. E. Bayer, and J. H. Flint. 2001. Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* 183(6):1945-1953.
- Fierobe, H. P., E. A. Bayer, C. Tardif, M. Czjzek, A. Mechaly, A. Belaich, R. Lamed, Y Shoham, and J. P. Belaich. 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. *J. Biol. Chem.* 277:49621-49630.
- Farrow, M. F., and F. H. Arnold. 2011. High Throughput screening of fungal endoglucanase activity in *Escherichia coli*. *J. Vis. Exp.* (54):2942-2951.
- Forbes, C., D. Hughes, and J. Fox. 2010. High-rate anaerobic degradation of 5 and 6 carbon sugars under thermophilic and mesophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 101:3925–3930.
- Hall, L., K. A Doerr, L. S. Wohlfiel, and G. D. Roberts. 2003. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1447-53.

- Hatfull, G. F., and R. W. Jacobs. 2000. *Molecular Genetics in Mycobacteria*, American Society for Microbiology, Washington, D. C. U.S.A. 363 p.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In: Methods in Microbiology*. Vol. 3. Norris, J. R and D. W. Ribbons (eds.). Academic Press Inc., New York, USA. Pp.117-132.
- Hu, Z., H. Yu, and R. Zhu. 2005. Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 66:2461–2470.
- Clarridge J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4):840–862.
- Kattar, M. M., J. F. Chavez, A. P. Limalye, S. L. Rassoulian-Barrett, S. L. Yarfitz, L. C. Carlson, Y. Houze, S. Swanzky, B. L. Wood, and B. T. Cookson. 2001. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 38:789-794.
- Kolmodin, L. A., and J. F. Williams. 1996. PCR basic principles and routine practice from: *Methods in molecular biology. PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic Engineering*. vol 67. Edited by B. A White. Humana Press. 490 p.
- Lee, Z. K., S. L. Li, P. C. Kuo, I. C. Chen, Y. M. Tien, Y. J. Huang, C. P. Chuang, S. C. Wong, and S. S. Cheng. 2010. Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *Int. J. Hydrogen Energ.* 35(24):13458–13466.

- 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.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall Inc, New Jersey. 609 p.
- Maniatis, T. F., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Laboratory Press. 545 p.
- Mateo-Sánchez, J. M., M. Cobos-Peralta, A. A. Trinidad-Santos, V. Cetina-Alcalá y J. Vargas-Hernández. 2002. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras del aserrín. *Agrociencia*. 36:523-530.
- Miller, H. J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. 3era Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. 466 p.
- Miron, J., J. Jacobovitch, E. A. Bayer, R. Lamed, M. Morrison, and D. Ben-Ghedalia. 2001. Subcellular distribution of glycanases and related components in *Ruminococcus albus* SY3 and their role in cell adhesion to cellulose. *J. Appl. Microbiol.* 91:677-685.
- Morrison, M., and J. Miron. 2000. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins. *FEMS Microbiol. Letters*. 185:109–115.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Béra-Maillet, and E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103:2676–2685.

- Ohara, H., S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2000. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:254-260.
- Penatti, M. P. A., L. M. Hollanda, G. Nakazato, T. A. Campos, M. Lancellotti, M. Angellini, M. Brocchi, M. M. Rocha, and W. Dias da Silveira. 2007. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in Southeast Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40(2): 249-258.
- Poutou, R. A., M. E. Burbano, S. C. Sierra, K. J. Torres, A. K. Carrascal y M. Mercado. 2005. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR-múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Univ. Sci.* 10:61-78.
- Rakotoarivonina, H., G. M. Jubelin, B. Hebraud, Gaillard-Martinie, E. Forano, and P. Mosoni. 2002. Adhesion to cellulose of the Gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV pili. *Microbiol.* 148(6):1871-1880.
- Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 36:139-147.
- Sacchi, C. T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant, and T. Popovic. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infectar. Dis.* 8:1117-1123.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1659 p.
- Schiraldi, Ch., M. Giuliano, and M. De Rosa. 2002. Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea* 1(2): 75–86.
- Schwarz, W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:634–649.
- Sielaff, B., and Andreesen J. R. 2005. Kinetic and binding studies with purified recombinant proteins ferredoxin reductase, ferredoxin and cytochrome P450 comprising the morpholine mono-oxygenase from *Mycobacterium* sp. strain HE5. *FEBS J.* 272(5):1148-59.
- Shinkai, T., and Y. Kobayashi. 2007. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5):1646-1652.
- Singh, B., H. P. S. Makkar, and S. S Negi. 1992. The kinetics of digestion in ruminants. A review. *Indian J. Dairy Sci.* 46:90-99.
- Stevenson, D. M., and P.J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:165–174.
- Suarez, J. y G. J. Martin. 2010. Producción de agroenergía a partir de biomasa en sistemas agroforestales integrados: una alternativa para lograr la seguridad alimentaria y la protección ambiental. *Pastos y Forrajes.* 33(3):1-12.

- Taguchi, H., D. Hagiwara, T. Genma, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2004. Cloning of the *Ruminococcus albus* cel5D and cel9A Genes encoding dokerin module-containing endglucanases and expression of cel5D in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(7):1557- 1564.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA4) software. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- 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.
- Wang, A., L. Gao, N. Ren, J. Xu, C. Liu, G. Cao, H. Yu, W. Liu, C. L. Hemme, Z. He, and J. Zhou. 2011. Isolation and characterization of *Shigella flexneri* G3 capable of effective cellulosic saccharification under mesophilic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:517–523.
- Weimer, J. P., P. J. N. Price, O. Kroukamp, L. M. Joubertm, G. M. Wolfardt, and W. H. Van Zyl. 2006. Studies of the extracellular glycocalyx of the anaerobic cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 7. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7559–7566.
- Yang, L. Y., J. Chen, X. L. Cheng, D. M. Xi, S. L. Yang, W. D. Deng, and H. M. Mao. 2010. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences reveals rumen bacterial diversity in Yaks (*Bos grunniens*) *Mol. Biol. Rep.* 37:553–562.
- Zhang, Z, S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2):203-14.

CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA ESPECIE DE *Shigella* DE RUMEN CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR CELULOSA

Lorena Luna-Rodríguez*, David Hernández-Sanchez*, Hilda V. Silva-Rojas *, Mario A. Cobos-Peralta*, César Cortez-Romero*, Sergio S. González-Muñoz*

*Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, 56230.

RESUMEN

La activación de un cultivo bacteriano puro, liofilizado de una cepa aislada del rumen con capacidad para degradar celulosa; se realizó en medio líquido carboximetil celulosa (CMC), incubando por 48 h para obtener un crecimiento óptimo, evidenciado por la turbidez. Para la identificación bioquímica del microorganismo se utilizó el Kit API 50 CH y el Software API WEB. Los resultados indican la fermentación de los sustratos glicerol, ribosa, xilosa, sacarosa, galactosa y glucosa. Mediante las pruebas bioquímicas no fue posible identificar la cepa mediante estudios filogenéticos aislada, lo cual concuerda con el resultado de especie no reconocida.

Palabras clave: bacteria ruminal, celulosa, cultivo liofilizado, identificación bioquímica.

3.1 Introducción

Los microorganismos se alimentan a expensas del medio donde se encuentran, en este hábitat ocurren una serie de reacciones de síntesis y descomposición de sustancias orgánicas en una relación intrínseca microorganismo-medio, las cuales reciben el nombre de metabolismo. Desde estas características metabólicas se realizan pruebas bioquímicas para identificar un microorganismo desconocido (Madigan *et al.*, 2004).

La identificación bacteriana se realiza a través de una serie de análisis como el, crecimiento de las cepas en diferentes medios de cultivos y la capacidad para utilizar azúcares y alcoholes, estos procedimientos han permitido ubicar a una cepa bacteriana en un taxón determinado.

Los sistemas miniaturizados API son métodos rápidos para identificación de microorganismos mediante pruebas bioquímicas del metabolismo bacteriano de hidratos de carbono y derivados (polialcoholes, ácidos urónicos y heterósidos). Estos sistemas contienen diferentes medios de cultivo deshidratados variando el sustrato contenido, y las pruebas bioquímicas realizadas son las de fermentación de carbohidratos, la determinación de producción de H₂S (Atlas y Bartha, 1997).

Por lo tanto, se realizó la activación de un cultivo bacteriano puro, liofilizado de una cepa aislada del rumen con capacidad para degradar celulosa, con el objetivo de identificar bioquímicamente la bacteria aislada y cotejar la información con la filogenia molecular de ésta.

3.2. Materiales y Métodos

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Ruminal de la Orientación en de Ganadería del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

En el presente experimento se utilizó un cultivo liofilizado, de una bacteria aislada del rumen con capacidad para hidrolizar carbohidratos estructurales. Para realizar la identificación bioquímica del microorganismo aislado se utilizó el sistema API 50 CH (bioMerieux, Inc., Hazaelwood Missouri, EE.UU.); el cual contiene 49 galerías con sustratos fermentables de carbohidratos.

3.2.1. Activación de la cepa celulolítica aislada

El cultivo puro aislado, preservado en forma de liofilizado, se hidrató en medio líquido con carboximetil celulosa (CML) como única fuente de carbono por 3 h y se tomó 1 mL como inóculo para obtener un cultivo de 24 h. De este cultivo se tomó 1 mL y se colocó en tubos con 9 mL de medio de cultivo líquido (MCL; Cuadro 3.1) anaerobio selectivo estéril, con tres repeticiones y se incubó 48 h a 39 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, y con una turbidez óptima (1×10^8 UFC mL⁻¹), se realizaron los ensayos bioquímicos.

3.2.2. Identificación bioquímica de la cepa celulolítica aislada

El patrón de fermentación de hidratos de carbono fue determinado con la galería enzimática API 50 CH y el software API WEB. Cada test API 50 CH contenía 50 recipientes con sustratos metabolizados mediante diferentes rutas

bioquímicas, y diseñados con una zona anaerobia para el estudio de fermentación.

Cuadro 3.1 Medio carboximetil celulosa líquido (CML) anaerobio

Componente	Cantidad 100 mL ⁻¹
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado, mL ⁽¹⁾	30.0
Solución mineral I, mL ⁽²⁾	5.0
Solución mineral II, mL ⁽³⁾	5.0
Resarzurina 0.1 %, mL ⁽⁴⁾	0.1
Peptona de soya, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Carbonato de sodio, sol. Al 8 %, mL ⁽⁵⁾	5.0
Solución de cisteína sulfido de sodio, mL ⁽⁶⁾	2.0
Carboximertil celulosa, mg	0.28

⁽¹⁾ Previamente filtrado a través de gasa triple y centrifugado a 23.000 x g, por 15 min tres veces, a 8 °C y esterilizado a 15 psi por 15 min a 121 °C.

⁽²⁾ Contiene 6 g de K₂ HPO₄, por 1000 mL de H₂O.

⁽³⁾ Contiene 6 g KH₂ PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄; y 1.6 g CaCl 2H₂O por 1000 mL de H₂O (Bryant y Robinson, 1961).

⁽⁴⁾ Agregar 0.1 mL de solución 1 % en H₂O y aforar a 100 mL con H₂O destilada.

⁽⁵⁾ 8 g de Carbonato de sodio en 100 mL de H₂O destilada.

⁽⁶⁾ 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2n NaOH), 2.5 g de Na₂S·9H₂O y 0.1 mL de resarzurina en un volumen final de 100 mL.

3.2.2.1. Preparación de las galerías API 50 CH

Cada galería estuvo constituida por cinco filas con 10 tubos numerados. Se preparó una cámara de incubación y se rotuló la referencia de la cepa, después se dosificó 10 mL de agua destilada en las cavidades de la base de la cámara para crear una atmósfera húmeda. Después se colocaron cada una de las tiras en filas del 0 a 19, 20 a 29, 30 a 39, 40 a 49 en el fondo de la cámara de incubación.

3.2.2.2 Preparación del inóculo

El cultivo aislado puro y liofilizado se reactivó en medio CML se tomó 1 mL como inóculo para suspenderlo en una ampolleta de medio API 50CHB/E [2 g, sulfato de amónico; 0.5 g, extracto de levadura; 1 g, triptona; 3.22 g, fosfato disódico; 0.12 g, fosfato mono potásico; 10 mL, solución de oligoelementos; 0.17 g, rojo de fenol y 1 L agua desmineralizada (pH 7.4 a 7.8)]. La suspensión fue homogenizada y utilizada de inmediato.

3.2.2.3 Inoculación de las galerías API 50 CH

Para la inoculación la suspensión bacteriana se distribuyó con una pipeta estéril en los 50 tubos de las galerías API. Se consideraron los siguientes criterios: inclinarse ligeramente hacia delante la cámara de incubación, evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula y cuando se inoculó en el tubo no se rebasó el límite superior del mismo con el fin de conservar anaerobiosis. Las galerías se incubaron 24 h a 38 °C y después se interpretaron los resultados de cada prueba.

3.3. Resultados y Discusión

Los microorganismos tienen la capacidad de emplear varias sustancias como fuente de carbono que utilizan en diversos procesos metabólicos, los rasgos metabólicos incluyen datos de crecimiento en distintos sustratos, temperatura y pH. Durante el período de incubación, la fermentación se evidencia en un cambio de color en los microtubos (Figura 3.1), debido a una producción de ácido en anaerobiosis, revelada por el indicador de pH del medio; el primer tubo, sin principio activo sirvió como testigo negativo.



Figura 3.1 Cambio de color en los microtubos API 50 CH durante un período de incubación de 24 h.

En el cuadro 3.2 se muestran las características bioquímicas de la cepa aislada, los cocobacilos gram negativos no fermentan arabinosa, xilosa y celobiosa, pero si glicerol, ribosa, xilosa, sacarosa, galactosa, glucosa entre otras, estas características descritas coinciden con las señaladas por *Wang et al.* (2011) para este mismo género.

Cuadro 3.2 Características bioquímicas de la cepa aislada

Utilización de sustratos	valor
Glicerol (GLY)	+
D- arabinosa (D-ARA9)	-
L- arabinosa (L-ARA)	+
D-ribosa (RIB)	+
D-xilosa (D-XYL)	+
L-xilosa (L-XYL)	-
D- galactosa (GAL)	+
D- glucosa (GLU)	+
D- fructosa (FRU)	+
D-manosa (MNE)	+
D- manitol (MAN)	+
D- sorbitol (SOR)	+
N-acetil glucosamina (NAG)	+
D-celobiosa (CEL)	-
D-saltosa (MAL)	+
Lactosa (LAC)-	+
positivo + negativo -	

La interpretación de los resultados se fundamentó en las coloraciones desarrolladas en cada microtubo y de acuerdo a esta interpretación se establece un resultado positivo (+) o negativo (-), el cual se compara con la base de datos en un software en línea (Apiweb). La información disponible en el intervalo de pruebas bioquímicas relacionadas con la asimilación de diferentes fuentes de carbono, no hace posible identificar inequívocamente dicha cepa. Por lo tanto se define como una cepa atípica y es necesario en el futuro ampliar el estudio porque la identificación y caracterización de bacterias en diversos ecosistemas, consiste en la combinación de metodologías morfológicas y bioquímicas tradicionales con técnicas moleculares soportadas en los desarrollos bioinformáticos (Schmitt *et al.*, 2009; Henrik *et al.*, 2010), realizando estudios con esquemas polifásicos de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas (ICNP).

3.4. Conclusiones

Las pruebas bioquímicas convencionales, determinan la actividad de la bacteria a partir de un sustrato incorporado en un medio de cultivo, el cual la bacteria al crecer es capaz de utilizarlos y transformarlos en compuestos más simples a través de las diferentes vías metabólicas. A partir de las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana, mediante estándares establecidos, no fue posible identificar la cepa aislada. La asignación de un género y especie se establece de la interrelación entre la identificación de organismos con afinidades taxonómicas que se sitúan dentro de un grupo taxonómico, la nomenclatura binomial y la clasificación la cual es una agrupación jerárquica de organismos de acuerdo a sus caracteres y atributos, que se puede

representar en un árbol filogenético, y este último indica un grupo monofilético para el aislado, con similitud del 98 % con respecto a las demás especies del taxa, concordando con el resultado de especie no reconocida.

3.5. Literatura citada

- Atlas, R., and Bartha R. 1997. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Addison Wesley Longman, New York. 694 p.
- Bryant, M. P., and I. M. Robinson. 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. J. Dairy Sci. 44:1446
- Madigan, M. T., J. M. Martingó y J. Parker. 2004. Décima Edición. Brock Biología de los Microorganismos Prentice Hall. 1011 p.
- Henrik, N., U. Martin, and M. Wolfgang. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. Appl. Microbiol. Biot. 87:99-108.
- Schmitt, I., A. Crespo, P. K. Divakar, J. D. Fankhauser, E. Herman-Sackett, K. Kalb, M. P. Nelsen, N. A. Nelson, E. Rivas-Plata, A. D. Shimp, T. Widhelm, and H. T. Lumbsch. 2009. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. Persoonia 23:35–40.
- Wang, A., L. Gao, N. Ren, J. Xu, C. Liu, G. Cao, H. Yu, W. Liu, C. L. Hemme, Z. He, and J. Zhou. 2011. Isolation and characterization of *Shigella flexneri* G3 capable of effective cellulosic saccharification under mesophilic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 77:517–523.