



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE DOS BACTERIAS
ACETOGÉNICAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO (CH₄) EN
COCULTIVOS CON BACTERIAS RUMINALES

IVÁN REYES VÁZQUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.

2015

La presente tesis titulada: **Aislamiento y evaluación *in vitro* de dos bacterias acetogénicas sobre la producción de metano (CH₄) en cocultivos con bacterias ruminales**, realizada por el estudiante: **Iván Reyes Vázquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA.

ASESOR

DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ.

ASESOR

DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO.

ASESOR

DR. JAVIER PILONI MARTINI.

ASESORA

DRA. MA DE L. DE LA ISLA DE BAUER.

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

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE DOS BACTERIAS ACETOGÉNICAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO (CH₄) EN COCULTIVOS CON BACTERIAS RUMINALES.

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

RESUMEN

Mediante un medio de cultivo anaerobio a base de acetato-formato fluido ruminal (AF-FR) se aislaron y conservaron en liofilización dos bacterias ruminales. La primera bacteria ruminal aislada se identificó molecularmente como *Enterococcus casseliflavus* (EC) a una concentración de 6.75×10^8 bacterias mL⁻¹; la segunda bacteria solo se obtuvo el género *Enterococcus* (EN), a una concentración de 3.4×10^7 bacterias mL⁻¹. Se comparó la eficiencia de ambas bacterias en medios de cultivo anaerobios a base de formato fluido ruminal (F-FR); glucosa, celobiosa y almidón fluido ruminal (GCA-FR) y el pasto *Cynodon dactylon* fluido ruminal (B-FR). Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2x3x3, y las medias se compararon con la prueba de Tukey. La interacción medio-inóculo, logró disminuir el CH₄ en 35.51% en medios con F-FR en COC, siendo diferente estadísticamente ($P \leq 0.05$) de inóculo con la bacteria sola y FR. En los medios con GCA-FR no disminuyó la cantidad de CH₄, mientras que los medios con B-FR se disminuyó solo el 9.02%. EC produjo mayor cantidad de acetato sin presentar diferencias significativas ($P \leq 0.05$) comparado con EN. No hay estudios que comprueben que bacterias del género *Enterococcus* disminuyan la producción de CH₄. La bacteria EC es mejor que EN disminuyendo CH₄ y produciendo mayor acetato.

Palabras clave: aislamiento, *Enterococcus*, metano, acetato.

ISOLATION AND EVALUATION *IN VITRO* OF TWO ACETOGENIC BACTERIA ON PRODUCTION METHANE (CH₄) IN COCULTURES WITH RUMINAL BACTERIA.

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

ABSTRACT

Through an anaerobic culture medium based format acetate rumen fluid (AF-FR) they were isolated and conserved in two rumen bacteria lyophilization. The first ruminal bacterium isolated molecularly identified as *Enterococcus casseliflavus* (EC) at a concentration of 6.75×10^8 bacteria mL⁻¹; the second bacterium only was obtained genus *Enterococcus* (EN) at a concentration of 3.4×10^7 bacteria mL⁻¹. The efficiency of both bacteria in culture media anaerobic rumen fluid based format (F-FR) compared; glucose, cellobiose and starch ruminal fluid (GCA-FR) and the grass *Cynodon dactylon* rumen fluid (B-FR). The data were analyzed in a completely randomized design with a factorial arrangement of treatments 2x3x3, and the means were compared with Tukey's test. The medium-inoculum interaction able to reduce CH₄ with 35.51% on average in F-FR COC, being statistically different ($P \leq 0.05$) inoculum on battery power alone and FR. Media with GCA-FR did not decrease the amount of CH₄, while the means B-FR only 9.02% was decreased. EC acetate produced more without significant differences ($P \leq 0.05$) compared with EN. There are no studies that prove bacteria of the genus *Enterococcus* that reduce the production of CH₄. The bacteria EC is better than EN to decreasing CH₄ and producing more acetate.

Key words: Isolation, *Enterococcus*, methane, acetate.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para poder culminar el programa de Doctorado en mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo que me permitió cumplir una de mis más grandes metas en la vida.

Al Dr. Mario Antonio Cobos Peralta, por su apoyo en mi formación académica, me llevo sus enseñanzas, consejos, que algún día utilizaré en mi vida profesional... gracias.

A todo el consejo particular por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación, por las observaciones realizadas en la elaboración de la tesis, sin su aportación no se habría cumplido el objetivo.

A los catedráticos del programa de Ganadería por compartir sus conocimientos y participar en mi formación académica.

Al Dr. Paulino Sánchez Santillán por su colaboración en esta tesis.

Al personal del laboratorio de Microbiología ruminal y Nutrición Animal por su apoyo durante el trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A Dios y mi Virgencita Natividad de María por darme vida y salud para continuar con mis metas en la vida.

Al Sr. Armando Reyes y Sra. Federica Vázquez por ser los mejores padres del mundo, que siempre me enseñaron a luchar por la vida... Gracias por todo... Los amo.

A mi hermana Lucy que siempre ha estado conmigo, gracias por tu apoyo, hemos compartido momentos difíciles, pero gracias a Dios salimos adelante.

A Ethel por ser el amor de mi vida, compañera y esposa incondicional que nunca me ha dejado solo, gracias por permitirme formar una familia contigo, eres una gran mujer... Te amo.

A mi hijo Yahel Armando, inicié con esta meta cuando llegaste al mundo, todo este tiempo has sido mi inspiración, y así será siempre... Te amo enano.

A todos mis amigos y compañeros del Programa de Ganadería por los momentos compartidos.

*Quando se nace pobre, estudiar es el mayor
acto de rebeldía contra el sistema. El
saber rompe las cadenas de la
esclavitud. Tomas Bulat.*

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS.....	vi
CONTENIDO.....	vii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. Objetivos	2
3. Hipótesis	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
4.1 Metano (CH ₄) como gas de efecto invernadero (GEI).....	3
4.2 Producción de metano (CH ₄) en rumen	5
4.3 Alternativas para disminuir metanogénesis.....	9
4.3.1 Alimentos, manejo de la alimentación y la nutrición.....	10
4.3.2 Selección genética del ganado	12
4.3.3 Uso de ácidos grasos	13
4.3.4 Uso de extractos de plantas	14
4.3.5 Defaunación	16
4.3.6 Aditivos.....	17
4.3.7 Acetogénesis reductiva	18
4.4 Sustratos utilizados por bacterias acetogénicas.....	25
4.5 Uso de carbón activado	26
4.6 Literatura citada.....	28
CAPITULO I. AISLAMIENTO DE UNA BACTERIA RUMINAL ACETOGENICA EN MEDIO SELECTIVO A BASE DE ACETATO-FORMATO FLUIDO RUMINAL (AF-FR)	38
1.1 Resumen	38
1.2 Abstract.....	39
1.3 Introducción	40

1.4 Materiales y métodos	41
1.4.1 Elaboración de medios de cultivo	41
1.4.2 Aislamiento y conservación de la bacteria ruminal.....	43
1.4.3 Identificación molecular de la bacteria aislada	44
1.4.4 Diseño y análisis estadístico	47
1.5 Resultados y discusión	48
1.5.1 Características de la bacteria ruminal aislada.....	48
1.5.2 Conservación de la bacteria ruminal aislada	49
1.5.3 Identificación molecular de la bacteria ruminal aislada	52
1.6 Conclusiones	55
1.7 Literatura.....	56
CAPITULO II. DISMINUCIÓN DE METANO (CH₄) <i>IN VITRO</i> EN MEDIOS DE CULTIVO CON FORMATO DE SODIO (F-FR) Y GLUCOSA CELOBIOSA ALMIDÓN (GCA-FR) 59	
2.1 Resumen	59
2.2 Abstract.....	60
2.3 Introducción	61
2.4 Materiales y métodos	62
2.4.1 Elaboración de medios de cultivo	62
2.4.2 Rehidratación de la bacteria liofilizada	63
2.4.3 Producción de gas <i>in vitro</i>	64
2.4.4 Concentración de bacterias totales	66
2.4.5 Nitrógeno amoniacal (NH ₃).....	66
2.4.6 Tratamientos	67
2.4.7 Diseño y análisis estadístico	67
2.5 Resultados y discusión	68
2.5.1 Variables de producción de gas <i>in vitro</i>	68
2.5.2 Medición de amoniaco (NH ₃) en medios con formato de sodio	78
2.6 Conclusiones	81
2.7 Literatura citada.....	82
CAPITULO III. COMPARACION DE DOS BACTERIAS AISLADAS SOBRE LA PRODUCCION DE METANO EN COCULTIVOS CON BACTERIAS RUMINALES87	

3.1 Resumen	87
3.2 Abstract.....	88
3.3 Introducción	89
3.4 Materiales y métodos	90
3.4.1 Elaboración de medios de cultivo para aislar una bacteria ruminal acetogénica	90
3.4.2 Aislamiento y conservación de una bacteria ruminal aislada	91
3.4.3 Identificación molecular de la nueva bacteria ruminal aislada	93
3.4.4 Producción de gas <i>in vitro</i>	95
3.4.6 Concentración de bacterias totales, pH y potencial redox	100
3.4.7 Digestibilidad <i>in vitro</i> de materia seca (MS).....	100
3.4.8 Tratamientos	101
3.5 Diseño y análisis estadístico	101
3.6 Resultados y discusión	102
3.6.1 Características de la nueva bacteria ruminal aislada.....	102
3.6.2 Identificación molecular de la bacteria ruminal aislada	103
3.6.3 Variables de producción de gas <i>in vitro</i>	104
3.7 Conclusiones	120
3.8 Literatura citada.....	121
CONCLUSIONES GENERALES	125

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para aislamiento de una bacteria ruminal acetogénica.	42
Cuadro 2. Mix de reactivos para la reacción en cadena de la	45
Cuadro 3. Componentes del gel de agarosa al 1.5%.	46
Cuadro 4. Concentración de bacterias a 24, 48 y 72 h	50
Cuadro 5. Concentración de DNA extraído de la bacteria aislada.	52
Cuadro 6. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para	63
Cuadro 7. Porcentaje (%) de CH ₄ en medio F-FR y GCA-FR.	70

Cuadro 8. Cantidad (mMol) de AGV, pH en medios de cultivo con F-FR y GCA-FR.	73
Cuadro 9. Medición de NH ₃ en medios con F-FR a 0, 24, 48 y 72 horas.	80
Cuadro 10. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para el aislamiento	91
Cuadro 11. Mix de reactivos para PCR.	94
Cuadro 12. Componentes del gel de agarosa al 1.5%.	95
Cuadro 13. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para	96
Cuadro 14. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para bacterias acetogénicas (Cobos y Yocoyama, 1995).	98
Cuadro 15. Concentración de DNA extraído de la bacteria aislada.	103
Cuadro 16. Comparación de las bacterias EC y EN sobre la producción de	106
Cuadro 17. Producción de AGV y degradación interacción de la bacteria – medio – inóculo.	112
Cuadro 18. Relación de acético/propionico de cada bacteria en la	113
Cuadro 19. Valores de pH, redox y concentración de bacterias de los tratamientos.	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes globales de metano (CH ₄) (Knapp <i>et al.</i> , 2014).....	4
Figura 2. Ruta de la metanogénesis (McAllister <i>et al.</i> , 1996).	7
Figura 3. Ruta de la acetogénesis o vía Wood-Ljungdahl (Müller, 2003).	21
Figura 4. Bacteria ruminal aislada, Gram +.	48
Figura 5. Colonia de la bacteria ruminal aislada.	48
Figura 6. Secuencia de nucleótidos obtenidos de la secuenciación de la bacteria ruminal aislada.....	53
Figura 7. Sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	68
Figura 8. <i>Enterococcus spp.</i> aislado en caja Petri con medio sólido (AFA-FR).	102
Figura 9. Secuencia de nucleótidos obtenidos de la secuenciación de la bacteria ruminal aislada.....	104

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los gases de efecto invernadero (GEI) son los responsables del incremento térmico de la superficie terrestre y de la destrucción de la capa de ozono (Primavesi *et al.*, 2004). Las emisiones de GEI son producto de la industria, medios de transporte, humedales y actividades realizadas por el hombre como la agricultura y la ganadería; en conjunto, estas actividades son esenciales para la economía mundial, a excepción de los humedales. La industria y el uso del transporte aportan el 15 % de metano (CH₄; Knapp *et al.*, 2014), y se da principalmente por el uso de combustibles fósiles. La agricultura y la ganadería generan GEI, siendo el CH₄ uno de los más importantes. La producción de CH₄ por parte de los rumiantes, es responsable del 18 % del fenómeno denominado cambio climático global por actividades antropogénicas (Bridgham *et al.*, 2013; Knapp *et al.*, 2014). En el mundo, cada día se necesitan más productos de los rumiantes (carne y leche) para alimentar la población, por lo cual, el aumento de la producción de CH₄ es constante porque la que la población de rumiantes en el mundo también deberá incrementar para satisfacer la demanda de sus productos, ante esto, la producción de ganado debe ser eficiente.

El CH₄ es producido en el rumiante por bacterias metanogénicas pertenecientes al dominio *Arqueae* (archaebacteria), (Shirohi *et al.*, 2010). Las bacterias metanogénicas son microorganismos anaerobios estrictos (Lettat *et al.*, 2013), que requieren un ambiente libre de oxígeno y potencial de óxido-reducción menor a -330 mV (Kamra, 2005) y un pH de 6 a 8 (Budiyono y Kusworo, 2012), además las bacterias metanogénicas colonizan el rumen en los primeros días de vida antes que la dieta contenga material forrajero, alcanzando la máxima densidad de bacterias (10¹¹

bacterias mL⁻¹) a los 21 días de vida. Un estudio realizado en Nueva Zelanda en corderos recién nacidos identificaron que las bacterias metanogénicas se encuentran desde los tres o cuatro días de vida y al final de la tercera semana de vida las poblaciones bacterianas son similares a las encontradas en corderos adultos (Skillman *et al.*, 2004).

Para CH₄, las bacterias metanogénicas degradan la celulosa ingerida a glucosa, que fermentan a ácido acético y reducen el CO₂ utilizando hidrógeno producido durante la fermentación (Lettat *et al.*, 2013). La emisión de CH₄ representa una energía del 2 al 12% (Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000) que se transforma en GEI; por lo tanto la disminución de CH₄ es una estrategia sobre la eficiencia de la productividad animal (Neely *et al.*, 2009).

La acetogénesis reductiva o vía de Wood-Ljungdahl es una ruta metabólica que se realiza en el rumen por bacterias acetogénicas para producir acetato (Henderson *et al.*, 2010). La acetogénesis, también es una alternativa para disminuir la producción de CH₄ en rumiantes, debido a que las bacterias acetogénicas son capaces de competir con las bacterias metanogénicas por el H₂ como fuente de energía y CO₂ para reducirlo y formar acetato.

2. Objetivos

- Aislar bacterias ruminales acetogénicas en medio de cultivo anaerobio selectivo a base de acetato-formato y fluido ruminal (AF-FR).
- Evaluar la capacidad de las bacterias aisladas para disminuir la producción de CH₄ y aumentar la producción de acetato *in vitro*.

3. Hipótesis

- El uso de inóculos de bacterias ruminales acetogénicas disminuye la producción de CH₄ como GEI al competir por los sustratos (H₂ y CO₂) con las bacterias metanogénicas en el rumen.
- La acetogénesis reductiva favorece la producción de acetato, un ácido graso volátil (AGV) que el rumiante utiliza de manera directa como fuente de energía.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Metano (CH₄) como gas de efecto invernadero (GEI)

El CH₄, dióxido de carbono (CO₂), óxido nitroso (N₂O) y los halocarbonos son GEI que aumentan los efectos de la radiación térmica y solar de la superficie atmosférica incrementando la temperatura (Knapp *et al.*, 2014). La producción anual de CH₄ es de 500 a 600 millones de t (Dlugokencky *et al.*, 2011), generado por las actividades antropogénicas y fenómenos naturales, causando el 18 % (Steinfeld *et al.*, 2006; Miramontes *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2014) de GEI, la agricultura y la ganadería son la mayor fuente de CH₄ antropogénico (Figura 1).

El CH₄ tiene varias fuentes naturales como son las termitas (4 %), humedales (31 %), sedimentos oceánicos (7 %), vida silvestre; también fuentes artificiales como la producción de gas natural y extracción de carbón (15 %), tratamiento de aguas residuales (5 %), rellenos sanitarios, la agricultura (6 %) y la ganadería (18 %) (Lassey, 2008; Knapp *et al.*, 2014). Johnson y Johnson (1995) y Kurihara *et al.* (1999), señalan que las emisiones de CH₄ por los bovinos se estiman en 58 millones año⁻¹, que representa 75% de las 80 millones año⁻¹ producidas por las especies domésticas en

explotación. La reducción de CH₄ implica investigaciones sobre GEI antropogénicos o disminución de la población de rumiantes, sin embargo, esta última no es viable debido a la demanda mundial de carne y leche. La FAO (2010) prevé una población total de 9600 millones de personas en el mundo para 2050, por lo que las necesidades de alimentación se duplicarán para ese año, un aumento en la producción de GEI, principalmente CH₄.

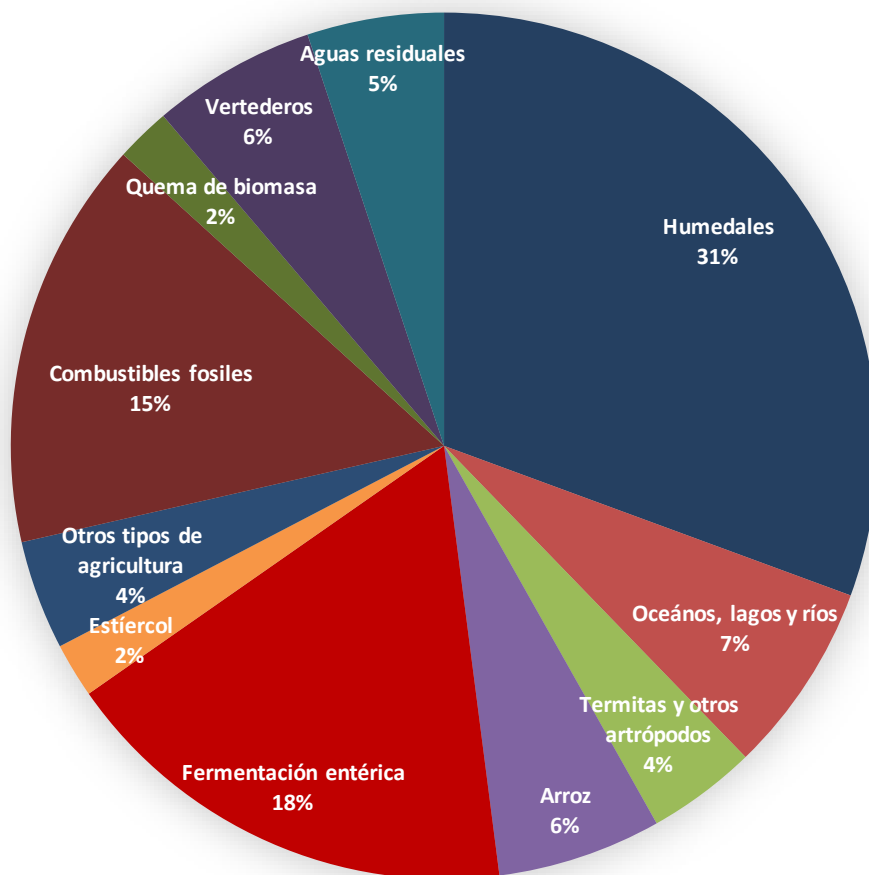


Figura 1. Fuentes globales de metano (CH₄) (Knapp *et al.*, 2014).

El CH₄ tiene un potencial de calentamiento 25 veces mayor al CO₂ (Bridgham *et al.*, 2013) y un tiempo de vida en la atmósfera de 10 años (Vargas *et al.*, 2012). La

cuantificación de las emisiones de GEI se hace tomando como referencia al CO₂, multiplicando así, las emisiones de CH₄ y N₂O, por los factores mencionados, se expresa el potencial de calentamiento de los gases como CO₂ equivalentes (CO₂-e) (Knapp *et al.*, 2014).

4.2 Producción de metano (CH₄) en rumen

El ecosistema ruminal es un ambiente anaeróbico, donde la degradación de carbohidratos ocurre de manera rápida (Knapp *et al.*, 2014) y es fermentado por microorganismos ruminales (Henderson *et al.*, 2010) del dominio *Archaea* llamados metanógenos. Los metanógenos producen CH₄ en el rumen como una ruta metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento (Ramírez *et al.*, 2014). El CH₄ es desechado vía eructo. La producción de CH₄ constituye una energía total (Kurihara, 1999; Bonilla y Lemus, 2012), que puede ser de 2 a 12% (Jhonson y Jhonson, 1995). Así, la disminución de GEI en rumiantes también es una forma de aumentar la productividad animal (Neely *et al.*, 2009).

Las bacterias metanogénicas utilizan principalmente H₂ y CO₂ para la formación de CH₄, mediante una ruta denominada metanogénesis (Figura 2). Actualmente, la utilización de técnicas para la amplificación de secuencias de ADN ha revelado que los metanógenos predominantes en la colonización del rumen pertenecen al orden *Metanobacterial*, mientras que los órdenes *Metanosarcinal*, *Metanomicrobial* y *Metanococcal* están presentes en bajas concentraciones. Existen reportes que en rumiantes los órdenes *Metanosarcinal* y *Metanomicrobial* no son detectados, y que al menos el 3% del ADN recuperado tiene su origen en el orden *Metanosarcinal*. Según el análisis de ARN ribosomal los metanógenos ruminales se dividen en tres grupos:

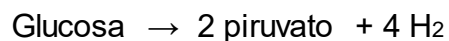
Metanobrevibacter spp., *Metanomicrobium* spp. y un grupo de *Archaea*, no cultivado, denominado rumen clúster C (Ramírez *et al.*, 2014). Janssen y Kirs (2008) encontraron que el 61.6 % de las secuencias genéticas de *Archaea* ruminales están relacionadas con *Metanobrevibacter*, siendo las especies *M. gottschalkii* (33,6%) y *M. ruminantium* (27,3%) las más predominantes. Los microorganismos metanogénos más importantes en rumen, son *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile* que reducen el CO₂ usando H₂ como fuente de energía (Attwood y McSweeney, 2008). La producción de CH₄ en el rumen es de 87 % y el resto en el tubo digestivo posterior, la mayoría de este gas es absorbido por la sangre y llevado a los pulmones en donde es eliminado a través de la boca y los orificios nasales (McCaughey *et al.*, 1999).

La actividad metanogénica contribuye al sostenimiento de la fermentación ruminal, ya que mantiene una baja concentración de H₂ que favorece la oxidación del cofactor reducido de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), producido durante la glucólisis, gracias a una relación sintrópica entre los microorganismos productores de H₂ y los metanógenos (Ramírez *et al.*, 2014). La metanogénesis es la vía de remoción de H₂ (Figura 2). Inicialmente, el CO₂ es activado por la enzima que contiene el metanofurano y es reducido a formilo, el cual se transfiere del metanofurano a una enzima que contiene metanopterina, es deshidratado y reducido en dos pasos distintos a metileno y metilo. Posteriormente el grupo metilo se transfiere de la metanopterina a una enzima que contiene CoM. Finalmente el metil-CoM es reducido a CH₄ por el sistema de la metil reductasa, en el cual, dos coenzimas la F430 y la CoM están implicadas. La coenzima F430 elimina el grupo CH₃ del CH₃-CoM, formando un complejo Ni²⁺ - CH₃;

Johnson y Johnson (1995) indican que hay dos factores responsables de la variación en la producción de CH₄, una es la cantidad de carbohidratos fermentados en el rumen y la tasa de pasaje. Otro mecanismo es la relación de AGV producidos, la cual regula la producción de H₂ y la subsecuente producción de CH₄. Las bacterias ruminales contienen hidrogenasas unidas a la membrana y pueden oxidar y reducir los transportadores de electrones como NADH o ferredoxina para producir H₂ (Bodas *et al.*, 2012). Sin embargo, las hidrogenasas unidas a la membrana son sensibles al H₂ y se inhiben rápido cuando la presión se acumula (Bodas *et al.*, 2012). Por lo tanto, una buena fermentación requiere mantener una baja presión, por lo cuál el H₂ es utilizado rápidamente.

Moss *et al.* (2000) y Knapp *et al.* (2014) explican la estequiometría de las principales rutas de fermentación para formar CH₄:

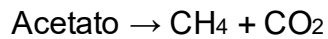
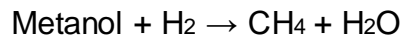
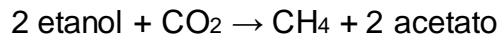
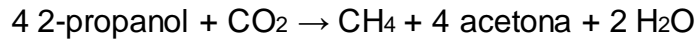
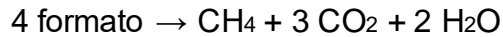
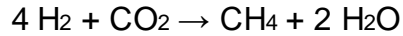
- Reacción productora de H:



- Reacciones que utilizan de H₂:



- Reacciones metanogénicas típicas (Thauer, 1998):



En rumen, la mayor parte de CH₄ se sintetiza a partir de H₂ y CO₂; sin embargo, también se utiliza formato, metilaminas y metanol (derivado de la demetilación de polímeros de plantas) (Mackie *et al.*, 1992; Zinder, 1992). El H₂ producido durante la glucólisis es perjudicial para el proceso fermentativo, porque su acumulación inhibe la enzima NADH+H⁺ ferredoxina oxidorreductasa, impidiendo la regeneración de NAD⁺, lo cual es posible a baja presión de H₂ (Ramírez *et al.*, 2014). El H₂ usado proviene del metabolismo de otros microorganismos anaerobios (bacterias, hongos y protozoos), por lo tanto, la producción de CH₄ representa uno de los mecanismos para que la presión ruminal del H₂ disminuya.

4.3 Alternativas para disminuir metanogénesis

Actualmente, existe interés por desarrollar estrategias que disminuyan las emisiones de CH₄ como GEI emitido por los rumiantes (Machmuller, 2006). La reducción de CH₄ en el rumen puede alcanzarse a través del manejo de la alimentación, el mejoramiento del

desempeño productivo de los animales y la utilización de aditivos (Ramírez *et al.*, 2014); ante esto, se han desarrollado tres líneas de investigación (Knapp *et al.*, 2014):

- a) Manejo de la alimentación y la nutrición: Usar alimentos de alta calidad que mejoran la productividad y la eficiencia alimenticia; ciertos alimentos puede mejorar la producción de propionato o disminuir acetato, disminuyendo la cantidad de H₂ disponible para formar CH₄.
- b) Incremento de la producción animal modificando la genética: eficientizar la utilización de nutrientes con animales genéticamente mejorados para aumentar la productividad, teniendo en cuenta una buena eficiencia alimenticia y la disminución de la producción de CH₄ por unidad de producto (carne o leche). La producción de CH₄ disminuiría si la producción de leche se mantiene constante o aumenta, así se necesitarían menos número de vacas para producir la misma o mayor cantidad de leche.
- c) Modificadores del rumen: alimentar los rumiantes con sustancias específicas para inhibir metanogénesis o usando un control biológico como acetogénesis, defaunación, uso de ácidos grasos, extractos de plantas y aditivos.

4.3.1 Alimentos, manejo de la alimentación y la nutrición

La mitigación de CH₄ de manera nutricional se basa en tres formas: 1) selección de ingredientes para alterar los patrones de producción de AGV; 2) incrementar la frecuencia de paso para alterar las poblaciones microbianas y patrones de producción de AGV, para que la absorción en intestino sea mayor; y 3) utilizar ingredientes de buena calidad para eficientizar la producción de leche por vaca, para disminuir el costo de producción de CH₄ asociado con los requerimientos de energía para mantenimiento

(Knapp *et al.*, 2014). Las proporciones de AGV producidos afectan la cantidad de CH₄, porque la formación de propionato consume equivalentes reductores, mientras que acetato y butirato generan la formación de H₂ para metanogénesis y acetogénesis.

En cuanto a forrajes, Leng (1993) reportó que el 75% de la producción de CH₄ es emitido por rumiantes en pastoreo, por consumir forrajes de mala calidad. La calidad de los forrajes se mejora utilizando forrajes menos maduros y con alto valor digestible, sin omitir un almacenamiento adecuado, como el ensilaje diseñado para conservar la digestibilidad y los nutrientes de los forrajes, además de mejorar la dieta y aumentar la eficiencia de alimentación (Knapp *et al.*, 2014). Los forrajes de calidad, tienen un mayor contenido de carbohidratos no estructurales (CNS) y fibra de detergente neutro (FDN), por lo tanto la FDN será menos lignificada (Moss *et al.*, 2000; Boadi *et al.*, 2004).

Los forrajes se procesan cortando o moliendo, disminuyendo así la digestibilidad en el rumen de la FDN y la producción de CH₄ como resultado del aumento de la tasa de pasaje del alimento (Moss *et al.*, 2000), además disminuye la proporción acetato:propionato (Van Nevel y Demeyer, 1996), este efecto no es evidente con la ingesta restringida, pero altos niveles de consumo disminuyen el CH₄ de 20 a 40% por unidad de materia seca (MS) (Johnson y Johnson, 1995). Los forrajes también se pueden comprimir, y así disminuir la producción de CH₄, pero el efecto de peletización es más práctica para forrajes de baja calidad, además, las reducciones de CH₄ pueden no ser significativos para justificar el gasto de energía extra (Hironaka *et al.*, 1996), sin embargo, la relación de las emisiones de CH₄ depende de la alimentación, la composición de la dieta y el consumo (Knapp *et al.*, 2014).

La selección de plantas durante el pastoreo, las tasas de retención de la digestión ruminal, y las interacciones huésped-microorganismos pueden ser hereditarias y susceptibles a la selección genética de los animales con menores emisiones entéricas de CH₄ día⁻¹ (Clark, 2013; Ross *et al.*, 2013). Se ha realizado selección genética en ganado bovino y ovino, aunque hasta ahora la relación entre la disminución de CH₄ y el crecimiento del animal no ha sido evaluado (Clark, 2013; Pinares-Patiño *et al.*, 2013). Además, se han desarrollado técnicas metagenómicas que pueden acelerar el proceso de selección (Ross *et al.*, 2013), pero aún no existen evidencias viables para el ganado lechero y ovino, aunque es probable que en 10 años se tengan los primeros resultados (Knapp *et al.*, 2014).

4.3.2 Selección genética del ganado

No se conoce con exactitud porque ciertos animales emiten menos CH₄ por unidad de alimento consumido que otros, pero se plantea que se debe a las diferencias genéticas entre razas de rumiantes. Actualmente, la biotecnología podría ayudar a explicar este fenómeno desarrollando herramientas metagenómicas que pueden acelerar el proceso de la selección genética (Knapp *et al.*, 2014) logrando la disminución de CH₄.

De Haas *et al.* (2011) indican que la producción endógena de CH₄ tiene una base genética, con índices de heredabilidad entre 0.35 para la producción de CH₄ endógeno y 0.58 para la producción de CH₄ por contenido de grasa y proteína, con un índice de correlación genética entre la producción de CH₄ entre la primera y la última lactancia de 0.36 (Aguilar-Zanzano y Rojas-Bourrillon, 2014). Por su parte Yan *et al.* (2010) reportan que la selección genética de vacas altas productoras de leche y la eficiencia de utilización de la energía estaría reduciendo la cantidad de CH₄, produciendo la

misma cantidad de leche; en el caso del ganado de carne se esperaría una mayor conversión alimenticia reduciendo los tiempos de engorda. Realizando selección genética, se podría reducir del 11 a 26% la producción de CH₄ en ganado lechero (De Haas *et al.*, 2011) y de 24 a 28% en ganado de carne (Aguilar-Zanzano y Rojas-Bourrillon, 2014).

4.3.3 Uso de ácidos grasos

El uso de ácidos grasos como inhibidor de metanogénesis comenzó a usarse en los años 60's, cuando Blaxter y Czerkawski (1966) observaron que los ácidos grasos de cadena larga y de cadena media podrían reducir las emisiones de CH₄ en borregos. Las investigaciones se han centrado en la utilización de ácidos grasos de cadena larga, por tener un mayor impacto sobre la metanogénesis debido a la biohidrogenación (Van Nevel y Demeyer, 1996); sin embargo, la utilización de altos porcentajes (> al 5%) disminuye la degradación de la fibra (Broudiscou *et al.*, 1990) lo cual se traduce en un efecto negativo sobre la producción animal.

Los aceites, se han evaluado como aditivos en la alimentación para mejorar el metabolismo microbiano en rumen, como degradación de fibra y proteína, para aumentar la eficiencia de degradación y la inhibición de la metanogénesis (Calsamiglia *et al.*, 2007; Patra, 2012). Las grasas se han adicionado a las dietas para incrementar la densidad energética de la dieta, para aumentar la producción en leche o modificar el perfil de ácidos grasos en leche, por lo que su utilización ha sido por mucho tiempo sin conocer los factores secundarios que actúan en rumen. El ácido laúrico (C 12:0) y mirístico (C 14:0) tienen el potencial para disminuir la metanogénesis *in vitro* y reducir el número de metanógenos (Dohme *et al.*, 2001; Panyakaew *et al.*, 2013), aunque el

potencial de mitigación de ácido mirístico disminuye cuando no se combina con ácido láurico (Soliva *et al.*, 2003). El aceite de coco es rico en ácido láurico y mirístico, conteniendo 470 g L⁻¹ y 180 g L⁻¹ respectivamente, y puede disminuir del 26 al 70% de CH₄ en borregos *in vivo* agregando 70 g d⁻¹; en toros de engorda redujo 30% agregando 250 g d⁻¹ (Jordan *et al.*, 2006).

Los alimentos para ganado con altas cantidades de almidones favorecen la disminución de CH₄ en rumen, porque la fermentación de azúcares favorece la producción de propionato a expensas de acetato y disminuye el pH ruminal, por lo que la disponibilidad de H₂ es baja e inhibe la actividad de los metanógenos (Martin *et al.*, 2010; Hook *et al.*, 2011a). La población de protozoos también se ve disminuida por la presencia de almidón en rumen, esto hace que se reduzca la transferencia de hidrógeno de protozoarios a bacterias metanogénicas (Morgavi *et al.*, 2012).

4.3.4 Uso de extractos de plantas

Las plantas como el sorgo (*Sorghum vulgare*), palma africana (*Elaeis guineensis*), etc., contienen productos bio-activos como aceites esenciales, taninos o saponinas (Wallace *et al.*, 2002) con propiedades antimicrobianas que pueden ser utilizadas para reducir la producción de CH₄ en rumiantes. Los metabolitos secundarios o fitoquímicos no son nutritivos para las plantas, pero son esenciales para su protección (contra plagas) (Greathead, 2003; Patra y Saxena, 2009b; Bodas *et al.*, 2012). Los metabolitos secundarios poseen actividad biológica en otros seres vivos, por ejemplo afectan los procesos metabólicos de un rumiante o afectan el crecimiento de ciertos microorganismos (Bodas *et al.*, 2003), por esa razón las compañías de drogas y nutrición examinan compuestos bio-activos de gran variedad de plantas para obtener

nuevos fármacos o aditivos. Los metabolitos secundarios son sustancias que tienen efecto tóxico sobre las bacterias metanogénicas y protozoarios, además se consideran factores antinutricionales porque reducen el consumo de materia seca (MS) y la digestibilidad del alimento (Beauchemin *et al.*, 2008). Los principales compuestos activos de los metabolitos secundarios son compuestos fenólicos (Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004), y actúan entrando a la membrana celular de la bacteria provocando la salida de iones y el efecto depende de la especie de planta consumida y de su composición química. También hay alcoholes, monoterpenos y aldehídos que llegan a inhibir el crecimiento y metabolismo de microorganismos ruminales (Benchaar *et al.*, 2008).

Las saponinas, taninos y algunos aceites esenciales también tienen un efecto negativo sobre los protozoarios del rumen (Makkar *et al.*, 1995; Hristov *et al.*, 2003) y es la causa porque la población de bacterias disminuye (Goel *et al.*, 2008a; Bodas *et al.*, 2012), debido a la asociación que existe entre los protozoarios y los microorganismos ruminales (Cobos *et al.*, 2007). Las saponinas de manera directa parecen tener un mayor efecto sobre bacterias Gram (+) que Gram (-) (Patra y Saxena, 2009a), de acuerdo a sus propiedades membranolíticas (Newbold *et al.*, 1997) las Gram (-) poseen una capa hidrofílica que actúa como barrera impermeable (Nikaido, 1994).

Los extractos de plantas presentan cambios en los productos finales de fermentación como AGV y amoníaco. El amoníaco disminuye (Spanghero *et al.*, 2008; Bodas *et al.*, 2012) y se acompaña de una reducción en la producción de iso-ácidos como consecuencia de la baja degradación de proteínas (Hervás *et al.*, 2000; Alexander *et al.*, 2008), mientras que la reducción de AGV se da por cambio en las proporciones de

ácidos orgánicos (Tan *et al.*, 2011), como aumento de acetato y disminución de propionato (Beauchemin *et al.*, 2007). Los extractos de plantas una vez ingresados al rumen el efecto dura por pocos días y con el paso tiempo los microorganismos ruminales se adaptan a ese ambiente (Busquet *et al.*, 2005).

4.3.5 Defaunación

La defaunación del rumen se considera una alternativa más para mitigar la producción de CH₄, dado que los protozoos son productores de H₂, y existe una importante asociación de bacterias metanogénicas adheridas a protozoos (Cobos *et al.*, 2007; Hook *et al.*, 2010). Se ha detectado la presencia de bacterias metanogénicas sobre la superficie de protozoos ciliados del rumen y como endosimbiontes dentro de los mismos, por lo tanto el uso de aditivos que reduzca la población de protozoarios inhibirá indirectamente la producción de CH₄ (Ramírez *et al.*, 2014). Newbold *et al.* (1995) estimaron que la relación entre bacterias metanogénicas y protozoos ciliados es responsable de 9 al 25% de la metanogénesis en el líquido ruminal, dado que en el rumen no es posible la respiración aeróbica, los protozoos no contienen mitocondria, solo presentan organelos intracelulares denominadas hidrogenosomas donde se libera el H₂ producido durante la oxidación del piruvato o malato. Los protozoos también se eliminan por derivados halogenados y monensina sódica que permiten una inhibición sustancial de CH₄ por los rumiantes, pero el uso de estos productos representa un riesgo para la salud humana. Sin embargo, el hecho de eliminar protozoarios en rumen, no siempre se ve reducida la producción de CH₄ (Morgavi *et al.*, 2012). También se han identificado compuestos secundarios que tienen actividad antiprotozoaria, como el uso

de saponinas, aunque el efecto varía de acuerdo al tipo de saponina (Hess *et al.*, 2003).

4.3.6 Aditivos

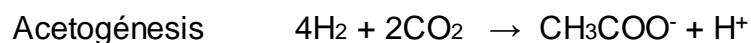
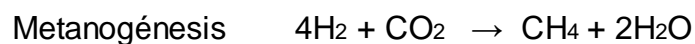
Existen aditivos para reducir CH₄, en su mayoría inhiben la metanogénesis (Weimer, 1998), y su función de acuerdo al tipo de aditivo pueden ser: 1) reducir la producción de CH₄ a favor del propionato para mejorar el balance energético de los animales, 2) disminuir la degradación de las proteínas para incrementar la biodisponibilidad de aminoácidos (AA) en el intestino delgado, 3) reducir la tasa de degradación de los carbohidratos rápidamente fermentables (almidón, sacarosa) y controlar la concentración de ácido láctico, y 4) mejorar la digestión de la fibra. Los antibióticos y los ionóforos cubren la mayoría de estos objetivos en el rumen (Jouany y Morgavi, 2007) y afectan las vías de fermentación en rumiantes (Lascano y Cárdenas, 2010). Los ionóforos más estudiados son la monensina, lasolacida, salinomycin, nigericina y gramicidina. Los ionóforos agregados a la dieta afectan la producción de CH₄ por dos vías: 1) aumenta la eficiencia en la conversión alimenticia, reduciendo la producción de CH₄ por unidad de alimento consumido y 2) se reduce la cantidad de CH₄ por unidad de MS consumida debido a su efecto sobre la fermentación del rumen (Lascano y Cárdenas, 2010). En relación a la conversión alimenticia, los ionóforos reducen el consumo de MS pero mantienen o incrementan la productividad animal; por ejemplo dietas altas en concentrado con ionóforos, el consumo de materia seca se reduce de 5 a 6% y la conversión alimenticia aumenta de 6 a 7% (Van Soest y Demeyer, 1996). El uso de ionóforos en forrajes presenta resultados variables. Según Van Soest y Demeyer (1996) los ionóforos reducen de 0 a 76 % la producción de CH₄ *in vitro* y varía

de acuerdo al tipo de ionóforo empleado y dosis recomendada; en condiciones *in vivo* la disminución de CH₄ es hasta 18 %.

4.3.7 Acetogénesis reductiva

La acetogénesis reductiva es una alternativa para inhibir la producción de CH₄ en rumen. Las bacterias acetogénicas son un grupo de microorganismos anaerobios estrictos capaces de utilizar H₂ como fuente de energía y CO₂ para reducirlo y formar acetato. El acetato es un AGV que utilizan los rumiantes como fuente de energía. Las bacterias acetogénicas son diversas filogenéticamente; a la fecha, se han descrito 20 géneros (Müller, 2003) presentando concentraciones de no más de 10⁸ bacterias mL⁻¹ (LeVan *et al.*, 1998).

En el rumen existen factores que limitan el crecimiento de bacterias acetogénicas (Pinder y Patterson, 2013) como: 1) el pH y la concentración de AGV interfieren en el crecimiento de bacterias acetogénicas; 2) los acetógenos no tienen capacidad de utilizar la concentración de los carbohidratos presentes en el fluido ruminal; 3) los acetógenos no se reproducen en grandes concentraciones competitivas en rumen; y 4) los acetógenos son menos eficientes que los metanógenos en el uso de H₂ y CO₂. La acetogénesis es menos eficiente que la metanogénesis, pero es una alternativa viable para disminuir la producción de CH₄. Nollet *et al.* (2007) establecen que la reacción por la competencia de sustratos entre acetogénesis y metanogénesis se da por la siguiente ecuación:

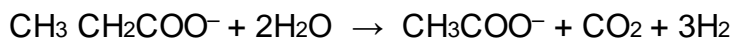


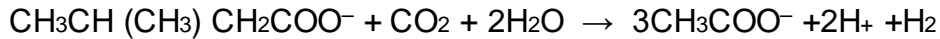
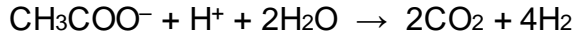
La acetogénesis tiene tres beneficios directos sobre el rumiante y el medio ambiente: 1) disminución de la pérdida de energía del alimento; 2) producción de compuestos energéticos (acetato); y 3) disminución de la síntesis de CH₄ emitida al ambiente como GEI (Parameswaran *et al.*, 2010).

4.3.7.1 Ruta de la acetogénesis o vía Wood-Ljungdahl

Las bacterias acetogénicas producen acetato a partir de H₂ y CO₂ mediante la vía Wood-Ljungdahl (Henderson *et al.*, 2010). La vía Wood-Ljungdahl se conoce así en reconocimiento a los bioquímicos descubridores, que explicaron las características químicas y enzimológicas de la vía usando la bacteria *Clostridium thermoaceticum* como modelo (Ljungdahl, 1986; Drake *et al.*, 2008). El trabajo de Ljungdahl se centró en explicar cómo el CO₂ se reduce a acetato, mientras que Wood descifró cómo el CO₂ se reduce a carbonilo dentro de la vía; ambos estudios se fundieron en la síntesis de la Acetyl-CoA (Drake *et al.*, 2008) para dar origen al acetato. Acetyl-CoA sintasa no solo cataliza la reducción del CO₂ a CO y la síntesis de Acetyl-CoA, también oxida CO a CO₂; esta reacción es la base para referirse a Acetyl-CoA sintasa como CO deshidrogenasa (Diekert *et al.*, 1984) con esto se entiende que la Acetyl-CoA sintasa es capaz de catalizar diferentes reacciones. Acetyl-CoA puede considerarse como el primer producto de fijación autótrofa de CO₂ en acetógenos (Ljungdahl, 1986).

Según Almeida *et al.* (2011) las reacciones que forman acetato a partir de ácidos grasos son:





Los microorganismos capaces de reducir CO_2 a través del Acetyl-Coenzima A se denominaron acetógenos, siendo esta característica metabólica suficiente para diferenciarlos de otros microorganismos (Drake *et al.*, 2008). La producción de acetato juegan un papel importante en el ciclo global del carbono (Müller, 2003). La ruta de la acetogénesis (Figura 3) inicia cuando el CO_2 es reducido a formato por acción del formato dehidrogenasa y es activado y enlazado a la molécula de tetrahidrofolato (THF) produciendo formil-THF. En este paso se libera agua, resultado un grupo metenil que es reducido de metileno-THF a metilo THF. El grupo metilo se transfiere a una proteína que contiene un cofactor carrinoide y grupos de hierro azufre; la proteína carrinoide de hierro azufre (CoFeSP). El grupo metilo se transfiere a la bi-funcional CO-deshidrogenasa/Acetil-CoA sintetasa (CODH/ACS) que desempeña un papel central en la vía. El grupo metilo se condensa sobre la CODH/ACS con monóxido de carbono derivado de otra molécula de CO_2 oxidada por la actividad de la CODH a Acetil-CoA. El acetato se produce de la Acetil-CoA por acción de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato quinasa (Müller, 2003).

4.3.7.2 Bacterias acetogénicas aisladas

Las bacterias acetogénicas u homoacetógenos (solo producen acetato como único producto de fermentación) o acetógeno reductor de CO_2 (Ragsdale y Pierce, 2008) son las encargadas de realizar la acetogénesis en rumen. Por definición, la formación de acetato como producto final no es tan importante, es más importante conocer el

proceso por el cual se forma. Por ejemplo existen bacterias como *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum* y *Caloramator pfennigii*, organismos que por definición se clasifican como acetógenos pero que forman butirato a partir de Acetyl-CoA por esta vía (Diekert *et al.*, 1984; Loubiere *et al.*, 1992). Del mismo modo *Acetobacterium woodii* forma etanol a partir de Acetyl-CoA (Diekert *et al.*, 1984; Buschhorn *et al.*, 1989).

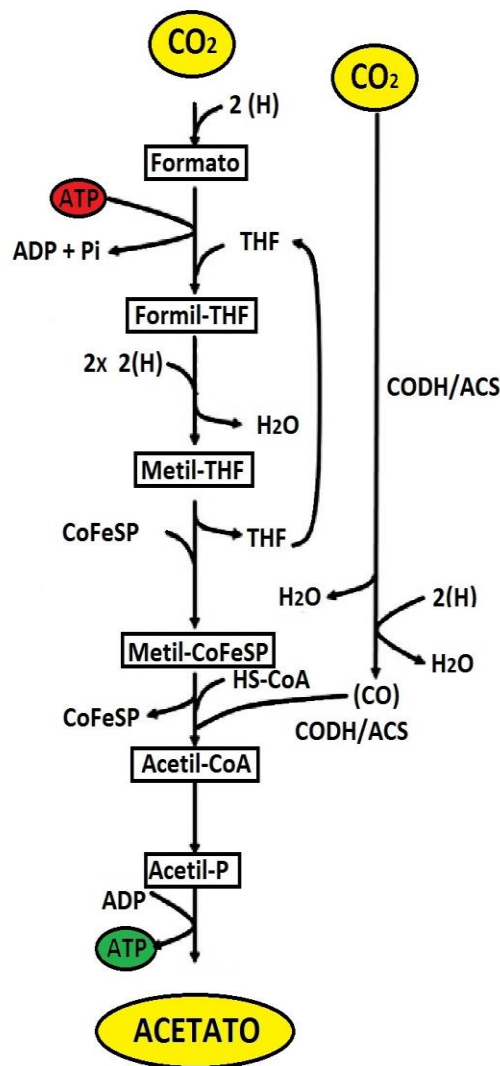
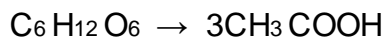


Figura 3. Ruta de la acetogénesis o vía Wood-Ljungdahl (Müller, 2003).

El aislamiento de bacterias acetogénicas comenzó en 1932 cuando se descubrieron microorganismos que convertían el H₂ y CO₂ en ácido acético (Fischer *et al.*, 1932). La primera bacteria acetogénica aislada fue *Clostridium aceticum* por Klass Tammo Wieringa en 1936, en ese tiempo el cultivo se perdió y solo los autores definieron las necesidades nutricionales de la bacteria (Drake *et al.*, 2008). *Clostridium aceticum* se aisló del suelo, y era capaz de convertir el H₂ y CO₂ en ácido acético (Karlsson *et al.*, 1948), es una bacteria mesofílica que forma esporas, capaz de crecer con H₂ y CO₂ de acuerdo con la siguiente fórmula estequiométrica (Wieringa, 1936; Drake *et al.*, 2008). En 1936 esta reacción constituía el único mecanismo reconocido de fijación de CO₂.



Clostridium thermoaceticum fue la segunda bacteria aislada por Francisco Ephraim Fontaine en 1942, compañero de Wiering. El aislamiento de *C. thermoaceticum* se estudió para explicar la enzimología de la vía Acetil-CoA en los laboratorios de Harland GoffWood y Lars Gerhard Ljungdahl (Drake *et al.*, 2008). *C. thermoaceticum* es un microorganismo obligadamente anaerobio y termófilo que puede fermentar 1 mol de glucosa a 3 moles de ácido acético a un pH de 7 (Schwartz y Keller, 1982). Con esta bacteria se catalizó la conversión estequiométrica de glucosa a acetato (Fontaine *et al.*, 1942; Drake *et al.*, 2008):



C. thermoaceticum se aisló de estiércol de caballo (Drake *et al.*, 2008); posteriormente en 1994, fue reclasificada a *Moorella thermoacetica* (Collins *et al.*, 1994; Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012). Existió una tercera bacteria identificada como *Clostridium*

formicoaceticum, aislada de lodos que produjo formato y acetato como resultado de la fermentación de glucosa (El Ghazzawi, 1967; Drake *et al.*, 2008). *Clostridium formicoaceticum* es una bacteria mesofílica formadora de esporas (El Ghazzawi, 1967; Andreessen *et al.*, 1970). *C. formicoaceticum* posee potenciales metabólicos para fijar gas nitrógeno y utilizar el reductor derivado de la oxidación de grupos aldehídos aromáticos para crecimiento y síntesis de acetato (Dorn *et al.*, 1978; Drake *et al.*, 2008); posteriormente las investigaciones para bacterias acetogénicas pararon, y fue hasta la década de los 80's que se continuó con esta línea de investigación.

Genthner *et al.* (1981) aislaron la bacteria ruminal acetogénica *Eubacterium limosum* y utilizaron un medio de cultivo modificado, adicionando Se, Ni, Zn y Fe como solución micromineral y biotina, ácido fólico, hidrocloreuro de piridoxal, ácido lipoico, rivo flavina, pantotenato de calcio, cianocobalamina, ácido paraminobenzoico y ácido nicotínico como solución vitamínica. El uso de vitaminas del complejo B y microminerales son esenciales porque la ruta metabólica del Acetyl-Coenzima A necesita coenzimas y cofactores para la síntesis del acetato. Además, se necesitan inhibidores metanogénicos para evitar la competencia de sustratos durante el aislamiento. Algunos ejemplos de inhibidores son ácido 2-bromoetanosulfónico (BESA) (LeVan *et al.*, 1998; Joblin, 1999) y 9,10-Antraquinona (García *et al.*, 1996), sin embargo, el uso de estos compuestos son tóxicos, una alternativa es el uso del antibiótico cloranfenicol, que inhibe la metanogénesis en medios de cultivo por su acción bacteriostática (Escolar *et al.*, 1998).

Se han aislado alrededor de 100 especies acetogénicas de una variedad de hábitats (suelos, sedimentos, lodos, tracto intestinal de animales incluyendo los seres humanos

y termitas) clasificadas en 22 géneros. Los géneros más importantes son: *Acetobacterium* y *Clostridium* (Almeida *et al.*, 2011) y las especies más estudiadas son: *C. thermoaceticum*; *Acetobacterium woodii*; *C. formicoaceticum*; *C. thermoautotrophicum*; *Peptostreptococcus productus*; *Eubacterium limosum*; *Acetogenium kivui* y *Acetitomaculum ruminis*.

4.3.7.3 Competencia entre bacterias acetogénicas y metanogénicas

Breznak y Kane (1990) reportaron la existencia de factores sobre la competitividad entre bacterias acetogénicas y metanogénicas. La concentración normal de H₂ en el rumen es de 10⁻⁵ a 10⁻⁶ atm (Robinson *et al.*, 1981), los metanógenos tienen mayor afinidad por H₂ que acetógenos (Bocazzi y Patterson, 2013). Los metanógenos tienen una afinidad para H₂ de 1 a 4x10⁻⁶ atm (Greening y Leedle, 1989); y las bacterias acetogénicas tienen una afinidad para H₂ de 10⁻⁴ a 10⁻⁵ atm (Greening *et al.*, 1989; LeVan *et al.*, 1998); se han encontrado metanógenos tener umbrales para H₂ de 10 a 40 veces más bajos que los acetógenos (Greening *et al.*, 1989; Breznak y Blum, 1991).

Las bacterias acetogénicas son tolerantes a pH ácidos, esto es clave en la competitividad por sustratos en ambientes ruminales (Ricke, 2003). Se considera que aproximadamente el 70% del CH₄ generado durante el proceso de digestión anaeróbica es producto de la metabolización de acetato de bacterias metanogénicas (*Methanosarcina*, *Metanosaeta* o *Metanotrix* y *Metanosarcina Barkeri*). La concentración de bacterias acetogénicas es menor que las metanogénicas en rumen, por lo tanto, no pueden competir por el H₂ porque la concentración de H₂ es baja y es utilizado rápidamente por las bacterias metanogénicas, en su caso las bacterias

acetogénicas requieren de altas concentraciones de H₂ para poder competir con las bacterias metanogénicas (Buddle *et al.*, 2011).

Una alternativa en la investigación ruminal, es aumentar la población de bacterias acetogénicas (Martin *et al.*, 2009), sin embargo, para maximizar la actividad acetogénica depende de las interacciones del sustrato (McAllister *et al.*, 1996; Christophersen *et al.*, 2008). La inhibición de la metanogénesis propicia que los iones H⁺ sean utilizados en otras rutas metabólicas para evitar efectos negativos durante la fermentación (Knight *et al.*, 2011). La reducción de CO₂ por H⁺ a acetato es termodinámicamente menos favorable que la reducción de estos sustratos a CH₄ (McAllister y Newbold, 2008).

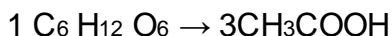
4.4 Sustratos utilizados por bacterias acetogénicas

Las bacterias acetogénicas oxidan CO₂, H₂, carbohidratos, alcoholes, ácidos carboxílicos y dicarboxílicos, aldehídos, además de grupos sustituyentes de varios compuestos aromáticos y ciertos compuestos halogenados, siendo los más importantes las hexosas y pentosas, porque se utilizan para el aislamiento de este tipo de bacterias (Küsel y Drake, 2011). El aislamiento de las bacterias ruminales acetogénicas aisladas en esta investigación, se realizó a base de formato de sodio y acetato como fuente de energía, siendo el formato de sodio el sustrato principal. El formato de sodio es una sal sódica del ácido fórmico, perteneciente al grupo de los aldehídos. El formato de sodio de origen ruminal se forma a partir de la oxidación del CO₂ exclusivamente por bacterias fermentativas y acetogénicas con equivalentes reductores procedentes de la oxidación de etanol o descarboxilación de lactato (Bleicher y Winter; 1994). El formato de sodio también se forma a partir de cultivos puros de bacterias metanogénicas,

incluso se libera una mayor cantidad de formiato de sodio inhibiendo la utilización de H₂ para la producción de CH₄ (Bleicher y Winter; 1994); así el formiato de sodio es utilizado por las bacterias acetogénicas para su metabolismo como fuente de energía. El formiato de sodio presente en el rumen es metabolizado rápidamente por las bacterias metanogénicas, aumentando la metanogénesis, y se representa estequiométricamente de acuerdo a la ecuación (Hungate *et al.*, 1970):



El formiato de sodio es un donador importante de electrones y puede llegar a contribuir con el 18% del CH₄ producido en el rumen (Ramírez *et al.*, 2014). Las hexosas son convertidas exclusivamente en acetato, tal como la muestra la siguiente ecuación (Müller, 2003):



El formiato de sodio se considera como un intermediario de la reducción del CO₂ hacia acetato, siendo la conversión preferencial mediante el grupo de la glucosa, esto se demostró con la bacteria *Clostridium thermoaceticum* (Kerby y Zeikus, 1987).

4.5 Uso de carbón activado

El carbón activado es un término utilizado para un grupo de materiales carbonáceos altamente porosos, preparados artificialmente a través de un proceso de carbonización. El volumen del poro del carbón activado generalmente es definido mayor a 2 mL g⁻¹, y el área de la superficie interna mayor a 400 m² g⁻¹. El diámetro de los poros varía desde 3 a cientos de Amstrongs (Å), por lo tanto, surgió una clasificación de acuerdo al tamaño del mismo: macroporos (500 a 20,000 Å); mesoporos (100 a 500 Å) y

microporos (8 a 100 Å) (McDougall, 1991). Los carbones activados se encuentran disponibles comercialmente en varias formas: granular, polvo, extruidos en forma de varilla, que comúnmente van desde 0.8 a 6 mm de diámetro por 3 a 10 mm de longitud en tamaño.

El carbón activado es utilizado por su capacidad de adsorción y se debe a su gran superficie interna y su distribución en el tamaño de poro, por lo tanto, el área de la superficie externa y la naturaleza de los óxidos superficiales son factores de menor importancia (McDougall, 1991), sin embargo, se ha observado que algunas superficies de carbón activado contienen sitios específicos que favorecen la adherencia y posteriormente el desarrollo de biopelículas bacterianas (Mercier *et al.*, 2013). A nivel de microorganismos, el carbón activado es utilizado como soporte para el crecimiento de bacterias, además para resolver problemas de bioremedación *in situ* en sedimentos acuáticos contaminados (Mercier *et al.*, 2013). El carbón activado también se ha utilizado como lioprotector durante el proceso liofilización, dando una protección a las células al momento de la congelación (Morales-García *et al.*, 2010; Sánchez, 2014). Actualmente el carbón activado también se utiliza para remover color, olor, y sabor de infinidad de productos, incluso remoción de productos tóxicos, que después de ser adsorbidos se producen reacciones químicas que transforman los productos tóxicos en inertes que se desorben y quedan retenidos en la porosidad del carbón.

4.6 Literatura citada

- Aguiar-Zalzano, E., A. Rojas-Bourrillon. 2014. Métodos utilizados para reducir la producción de metano endógeno en rumiantes. ISSN: 2215-3527. Nutr. Anim. Trop. 8(2): 72-90.
- Alexander, G., B. Singh, A. Sahoo, T. Bhat. 2008. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. Anim. Feed Sci. Technol. 145: 229 – 244.
- Almeida, A., E. Nafarrate-Rivera, A. Alvarado, A. Cervantes-Ovalle, M. P. E. Luevanos, R. Oropeza, N. Balagurusamy. 2011. Gene expression in the anaerobic digestion: a step forward in understanding of trophic interactions this biotechnology. AQM 3. 6: 14-34.
- Andreesen, J. R., G. Gottschalk, and H. G. Schlegel. 1970. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. Arch. Microbiol. 72: 154–174.
- Archimède, H., M. Eugène, C. M. Magdeleine, M. Boval, C. Martin, D.P. Morgavi, P. Lecomte, M. Doreau. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. Anim. Feed Sci. Technol. 166–167: 59– 64.
- Attwood, G., and C. McSweeney C. 2008. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H₂ utilization in the rumen. Aust. J. Exp. Agri. 48: 28-37.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Aust. J. Exp. Agric. 48: 21–27.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, T. F. Martinez, T. A. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 85, 1990–1996.
- Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T. A. McAllister, K. A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 209–228.
- Blaxter, K. L., J. Czerkawski. 1966. Modifications of the methane production of the sheep by supplementation of its diet. J. Sci. Food Agric. 17: 417–421.
- Bleicher, K., J. Winter. 1994. Formate production and utilization by methanogens and by sewage sludge consortia-interference with the concept of interspecies formate transfer. Appl Microbiol Biotechnol 40: 910-915.

- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 319–335
- Bocazzi, P., and J. A. Patterson. 2013. Isolation and Initial Characterization of Acetogenic Ruminal Bacteria Resistant to Acidic Conditions. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 3: 129-144.
- Bodas, R., A. R. Mantecón, P. Frutos, S. López, F. J. Giráldez. 2003. Inclusión de pulpa de remolacha y bicarbonato sódico en la ración de corderos en la fase de cebo. *ITEA vol Extra nº 24*: 768-770.
- Bodas, R., N. Prieto, R. García-González, S. Andrés, F. J. Giráldez, S. López. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176: 78– 93.
- Bonilla, C. J. A. y F. C. Lemus. 2012. Enteric methane emission by ruminants and its contribution to global climate change. Review. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(2): 215-246.
- Breznak, J. A., and J. S. Blum. 1991. Mixotrophy in the termite gut acetogen, *Sporomusa termitida*. *Arch. Microbiol.* 156: 105-110.
- Breznak, J. A., and M. D. Kane. 1990. Microbial H₂/CO₂ acetogénesis in animal guts: nature and nutritional significance. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 309-314.
- Bridgham, S. D., H. Cadillo-Quiroz, J. K. Keller, Q. Zhuang. 2013. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Glob. Change Biol.* doi: 10.1111/gcb.12131.
- Broudiscou, L., C. J. Van Nevel, D. I. Demeyer. 1990. Effect of soya oil hydrolysate on rumen digestion in defaunated and refaunated sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30, 51–67.
- Buddle, B. M., M. Denis, T. Graeme, E. Attwood, P. Altermann, H. Janssen, S. R. Ron, C. S. Pinares-Patiño, S. Muetzel, D. Neil. 2011. Review Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *Vet J.* 188 11–17.
- Budiyono, I., y T. D. Kusworo. 2012. Microalgae for stabilizing biogas production from cassava starch wastewater. *J. waste res.* 2: 17-21.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.
- Buschhorn, H., P. Durre, G. Gottschalk. 1989. Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*. *Appl Environ Microbiol* 55: 1835–1840.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. Cardozo, C. Kamel. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88: 2508–2516.

- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90: 2580–2595.
- Christophersen, C. T., A. D. Wright, P. E. Vercoe. 2008. In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *J. Anim. Sci.* 86: 384–389.
- Clark, H. 2013. Nutritional and host effects on methanogenesis in the grazing ruminant. *Animal* 7(1): 41–48.
- Cobos, M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, J. R. Barcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp shell waste and an inoculum of *Streptococcus millierion* rumen bacteria and performance of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132: 324–330.
- Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. E. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 812–826.
- De Haas, Y., J. Windig, M. Calus, J. Dijkstra, M. De Haan, A. Bannink, R. Veerkamp. 2011. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *J. Dairy Sci.* 94: 6122–6134.
- Diekert, G., M. Hansch, and R. Conrad. 1984. Acetate synthesis from 2CO₂ in acetogenic bacteria: is carbon monoxide an intermediate? *Arch. Microbiol.* 138: 224–228.
- Dlugokencky, E. J., E. G. Nisbet, R. Fisher, D. Lowry. 2011. Global atmospheric methane: budget, changes and dangers. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 369: 2058–2072.
- Dohme, F., A. Machmüller, A. Wasserfallen, M. Kreuzer. 2001. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 47–51.
- Dorman, H. J. D., S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308–316.
- Dorn, M., J. R. Andreasen, and G. Gottschalk. 1978. Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* 133: 26–32.
- Drake, H. L., A. S. Goßner, S. L. Daniel. 2008. Old Acetogens, New Light. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125: 100–128.
- ElGhazzawi, E. 1967. Neuisolierung von *Clostridium aceticum* Wieringa und stoffwechsel physiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* 57: 1–19.

- Escolar, J. M., J. R. Aranza, B. Sadaba, y J. Honorato. 1998. Tetraciclina, cloranfenicol y fosfomicina. *Medicine* 7(76): 3524-3532.
- FAO. 2010. Greenhouse gas emissions from the dairy sector. A life cycle assessment. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome 94 pp.
- Fischer, F., R. Lieske, and K. Winzer. 1932. Biologische gasreaktionen. II. Ueber die bildung von essigs ure bei der biologischen umsetzung von kohlenoxyd und kohlens ure mit wasserstoff zu methan, *Biochem. Z.* 245: 2–12.
- Fontaine, F. E., W. H. Peterson, E. McCoy, M. J. Johnson, G. J. Ritter. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 43: 701–715.
- García, L. P. M., L. Jr. Kung, and M. Odon. 1996. In vitro inhibition of microbial methane production by 9, 10-Antraquinona. *J. Anim. Sci.* 74: 2276-2284.
- Genthner, B. R., Davis, C. L., and Bryant, M. P. 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(1): 12–19.
- Goel, G., H. P. S. Makkar, K. Becker. 2008a. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J. Appl. Microbiol.* 105: 770–777.
- Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 279–290.
- Greening, R.C., J.A.Z, Leedle. 1989. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Arch Microbiol* 151: 399- 406.
- Henderson, G., E. G. Naylor, S. C. Leahy, P. H. Janssen. 2010. Presence of Novel, Potentially Homoacetogenic Bacteria in the Rumen as Determined by Analysis of Formyltetrahydrofolate Synthetase Sequences from Ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(7): 2058-2066.
- Hervás, G., P. Frutos, E. Serrano, A. R. Mantecón, F. J. Giráldez. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *J. Agric. Sci.* 135: 305–310.
- Hess, HD., Kreuzer M., Díaz TE., Lascano CE., Carulla JE., Soliva CR., and Machmüller A. 2003 Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109: 79–94.
- Hironaka, R., G. W. Mathison, B. K. Kerrigan, and I. Vlach. 1996. The effect of pelleting of alfalfa hay on methane production and digestibility by steers. *Sci. Total Environ.* 180: 221–227.

- Hook, S. E., A. D. G. Wright, B. W. McBride. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*: 1-11.
- Hook, S. E., M. Steele, K. Northwood, A. D. Wright, and B. McBride. 2011a. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microb. Ecol.* 62: 94–105.
- Hristov, A., M. Ivan, L. Neill, T. A. McAllister, 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 105: 163–184.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York, NY. 533 p.
- Hungate, R. E., W. Smith, T. Bauchop, Ida Yu, J. C. Rabinowitz. 1970. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *J. Bacteriol.* 102(2): 389–397.
- Janssen, P. H., M. Kirs. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ. Microbiol.* 74(12): 3619-3625.
- Johnson, K. A., D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
- Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan, J. Callan, B. Flynn, F. P. O'Mara. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84, 162–170.
- Jouany, J. P., D. P. Morgavi. 2007. Use of natural products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* (1-10): 1443-1466.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 89 (1): 124-135.
- Karlsson, J, L, B. E. Volcani, and Barker H. A. 1948. The Nutritional Requirements of *Clostridium aceticum*. *J Bacteriol.* 56 (6): 781–782.
- Kerby, R., J. G. Zeikus. 1987. Anaerobic catabolism of formate to acetate and CO₂ by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Bacteriol.* 169(5): 2063-2068.
- Kinsman, R., F. D. Sauer, H. A. Jackson, M. S. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J. Dairy. Sci.* 78 (12): 2760-2766.
- Knapp J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, J. M. Tricarico. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97: 3231–3261.
- Knight, T, R. S. Ronimus, D. Dey, C. Tootill, G. Naylor, P. Evans, G. Molano, A. Smith, M. Tavendale, C. S. Pinares-Patino, and H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 101– 112.

- Kurihara, M, T. Magner, H. McCrabb, G. McCrabb G. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *Br. J. Nutr.* 81: 227-234.
- Küsel, K., Drake, L. H. 2011. Acetogens. Joachim Reitner and Volker Thiel (eds.), *Encyclopedia of Geobiology*, DOI 10.1007/978-1-4020-9212-1.
- Lascano, C. E., E. Cárdenas. 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *R. Bras. Zootec.* 39: 175-182.
- Lassey, K. R. 2008. Livestock methane emission and its perspective in the global methane cycle. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 114–118.
- Leng, R. A. 1993. Quantitative ruminant nutrition—A green science. *Aust. J. Agric. Res.* 44: 363–380.
- Lettat, A., F. Hassanat, and C. Benchaar. 2013. Corn silage in dairy cow diets to reduce ruminal methanogenesis: Effects on the rumen metabolically active microbial communities. *J. Dairy Sci.* 96: 5237–5248.
- LeVan, T. D., J. A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle, and D. M. Schaefer. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetivomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3429-3436.
- Ljungdahl, L. G. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 415–450.
- Loubiere, P, E. Gros, V. Paquet, N. D. Lindley. 1992. Kinetics and physiological implications of the growth behaviour of *Eubacterium limosum* on glucose/methanol mixtures. *J. Gen. Microbiol* 138: 979–985.
- Machmuller, A., 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric. Ecosyst. Environ* 112: 107-114.
- Mackie, R. I., B. A. White, and M. P. Bryant. 1992. Methanogenesis, *Biochemistry*. En: *Encyclopedia of Microbiology*. Lederberg, J. Ed. Academia Press, San Diego, p. 97.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker. 2003. *Brock - Biology of Microorganisms*. 10^o edición. Prentice Hall Pearson Education Inc, Upper Saddle River. 1011 pp.
- Makkar, H. P. S., M. Blümmel, K. Becker. 1995. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 69: 481–493.
- Martin, C., D. P. Morgavi, M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351–365.

- McAllister, T. A., E. K. Okine, G. W. Mathison, K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 231- 243.
- McAllister, T. A., Newbold C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aus. J. Exp. Agric.* 48: 7–13.
- Mccaughey, W., K. Wittenberg, D. Corrigan. 1999. Impact of pasture type on methane production by lacting beef cows. *J. Anim. Sci.* 79(2): 221-226.
- McDougall, G. J. 1991. The physical nature and manufacture of activated carbón. *J. S. Afr. Inst. Min. Metal.* vol. 91, no. 4: 109-210.
- McInerney, M., M. Bryant, N. Pfennig. 1979. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Microbiol.* 122: 129–135.
- Mercier, A., G. Wille, C. Michel, J. Harris-Hellal, L. Amalric, C. Morlay, F. Battaglia-Brunet. 2013. Biofilm formation vs. PCB adsorption on granular activated carbon in PCB-contaminated aquatic sediment. *J. Soils. Sediments.* 13: 793–800.
- Miramontes-Carrillo, J. M., R. M. Ramírez, A. J. Ibarra, A. F. J. Ibarra, V. J. M. Miramontes, A. P. B. Brizuela, y G. R. Lezama. 2011. Efecto del sustrato sobre la actividad acetogénica in vitro de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen. *Revista Biociencias* Vol. 1. Núm. 2 Año 2. Páginas: 28 a 41.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez y Terrón, y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología.* 14 (02): 11-29.
- Morgavi D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024–1036.
- Morgavi, D. P., C. Martin, J. P. Jouany, and M. J. Ranilla. 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: Not a simple cause-effect relationship. *Br. J. Nutr.* 107: 388–397.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech* 49: 231–253.
- Müller, V. 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6345-6353.
- Neely, C., S. Bunning, and A. Wilkes. 2009. Review of evidence on dry lands pastoral systems and climate change. Implications and opportunities for mitigation and adaptation. *Land and Water Discussion Paper 8.* FAO. Roma, Italia 38 pp.
- Newbold, C. J., B. Lassalas, J. P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol* 21 (4): 230-234.

- Newbold, C. J., S. M. El Hassan, J. Wang, M. Ortega, R. J. Wallace. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78: 237–249.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382–388.
- Nollet, L., D. Demeyer, and W. Verstraete. 2007. Effect of 2-Bromoethanesulfonic Acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 Addition on Stimulation of Reductive Acetogenesis in the Ruminant Ecosystem by Selective Inhibition of Methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol* 63: 194-200.
- Panyakaewa, P., G. Goela, M. Lourenc, C. Yuangklang, V. Fievez. 2013. Medium-chain fatty acids from coconut or krabok oil inhibit in vitro rumen methanogenesis and conversion of non-conjugated dienoic biohydrogenation intermediates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 180: 18– 25.
- Parameswaran, P., C. L. Torres, L. Hyung-Sool, B. E. Rittmann, R. Krajmalnik-Brown. 2010. Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): The role of homo-acetogenic bacteria. *Bioresource Technol.* 103: 513-523.
- Patra, A. K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environ. Monitor. Assess.* 184: 1929 –1952.
- Patra, A. K., J. Saxena. 2009a. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr. Res. Rev.* 22: 204–219.
- Patra, A. K., J. Saxena. 2009b. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. Van Leeuwen.* 96: 363–375.
- Pinares-Patiño, C. S., S. M. Hickey, E. A. Young, K. G. Dodds, S. MacLean, G. Molano, E. Sandoval, H. Kjestrup, R. Harland, C. Hunt, N. K. Pickering, and J. C. McEwan. 2013. Heritability estimates of methane emissions from sheep. *Animal* 7(2): 316–321.
- Pinder, R. S., and J. A. Patterson. 2013. Growth of acetogenic bacteria in response to varying pH, acetate or carbohydrate concentration. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 3: 6-16.
- Primavesi, O., R. T. Shiraishi, M. Dos Santos, M. Aparecida, T. Teresinha, P. Franklin P. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesq. Agropec. Bras.* 39 (3): 277-283.
- Ragsdale, S. W., and Pierce. 2008. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica Et. Biophys. Acta* 1784: 1873–1898.

- Ramírez, J.F., O. S. Posada, R. Noguera. 2014. Ruminant methanogenesis and mitigation strategies. ISSN 1900-9607. Revista CES Med. Vet. Zootec. Vol 9. No 2: 307-323.
- Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Sci. 82: 632-639.
- Robinson, J. A., J. M. Strayer, and J. M. Tiedje. 1981. Method for measuring dissolved hydrogen in anaerobic ecosystems: application to the rumen. Appl. Environ. Microbiol. 41: 545-548.
- Ross, E. M., P. J. Moate, L. Marett, B. G. Cocks, B. J. Hayes. 2013. Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing. J. Dairy Sci. 96: 6030–6046.
- Sánchez, S. P. 2014. Aislamiento de una bacteria rumial celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 94 p.
- Schwartz, R. D., and F. A. Keller. 1982. Acetic Acid Production by *Clostridium thermoaceticum* in pH Controlled Batch Fermentations at Acidic pH. Appl. Environ. Microbiol. 43 (6): 1385-1392.
- Shirohi, S. K., N. Pandey, B. Singh, A. K. Puniya. 2010. Rumen methanogens: a review. Indian J. Microbiol. 50: 253–262.
- Skillman, L. C., P. N. Evans, G. E. Naylor, B. Morvan, G. N. Jarvis, K. N. Joblin. 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. Anaerobe 10 (5): 277-285.
- Soliva, C.R., I. K. Hindrichsen, L. Meile, M. Kreuzer, A. Machmüller. 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. Lett. Appl. Microbiol. 37: 35–39.
- Spanghero, M., C. Zanfi, E. Fabbro, N. Scicutella, C. Camellini. 2008. Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 145: 364–374.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, C. DeHaan. 2006. Livestock's Long Shadow; Environ. Issues and options. FAO. 390 p.
- Tan, H.Y., C. C. Sieo, N. Abdullah, J. B. Liang, X. D. Huang, Y. W. Ho. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 169: 185–193.
- Thauer, K. R. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Sthepenson. SGM Microbiol. 144: 2377-2406.

- Van Nevel, C. J., D. I. Demeyer. 1996. Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42: 73–97.
- Vargas, J., E. Cárdenas, M. Pabón, y J. Carulla. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Arch. Zootec.* 61 (R): 51-66.
- Wallace, R.J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Austral. J. Anim.* 15, 1458–1468.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114–3122.
- Wieringa, K. T. 1936. Over het verdwijnen van waterstofen koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie Van Leeuwenhoek* 3: 263-271.
- Yan, T., C. Mayne, F. Gordon, M. Porter, R. Agnew, D. Patterson, C. Ferris, D. Kilpatrick. 2010. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 2630–2638.
- Zinder, S. H. 1992. Methanogenesis. En: *Encyclopedia of Microbiology*, Lederberg, J. Ed. Academic Press, San Diego 3: 81 p.

CAPITULO I. AISLAMIENTO DE UNA BACTERIA RUMINAL ACETOGÉNICA EN MEDIO SELECTIVO A BASE DE ACETATO-FORMATO FLUIDO RUMINAL (AF-FR)

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

1.1 Resumen

Mediante un medio de cultivo anaerobio a base de acetato-formato fluido ruminal (AF-FR) se aisló y conservó en liofilización una bacteria ruminal. La bacteria ruminal aislada, se trató de un coco Gram (+), encontrándose sola o formando pares de cocos (bicocos) hasta cadenas de 9 cocos, a una concentración de 6.75×10^8 bacterias mL⁻¹. La colonia bacteriana en medio sólido es de superficie lisa y elevación convexa, de consistencia suave, color crema y de circunferencia irregular. Durante la liofilización se agregó carbón activado como lioprotector. La identificación molecular se hizo extrayendo el DNA mediante la técnica de CTAB, posteriormente se realizó la amplificación por medio de PCR. El producto de PCR se utilizó para secuenciar la bacteria ruminal aislada. La bacteria ruminal aislada se identificó como *Enterococcus casseliflavus* AJ301826, Y18161 en el GenBank, y puede encontrarse en el tracto gastrointestinal de animales mamíferos; sin embargo hasta ahora no hay estudios que comprueben que *Enterococcus casseliflavus* disminuya la producción de CH₄.

Palabras clave: aislamiento, acetogenicas, anaerobias, rumen, liofilización.

ISOLATION OF AN ACETOGENIC RUMEN BACTERIA IN SELECTIVE MEDIUM BASED ACETATE-FORMATE FLUIDE RUMINAL (AF-FR)

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

1.2 Abstract

Through an anaerobic culture medium based format acetate rumen fluid (AF-FR) he was isolated and preserved in lyophilization with rumen bacteria. Isolated rumen bacteria, it was a Gram (+) coconut, being alone or as pairs of cocci (bicocos) until coconut chains 9 at a concentration of $6.75 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ bacteria. The bacterial colonies on solid media is smooth and convex surface elevation, soft consistency, cream color and irregular circumference. During liofiizacion activated carbon is added as lyoprotectant. The molecular identification was made by extracting the DNA using the technique of CTAB, then amplification was performed by PCR. The PCR product was used to sequence the isolated rumen bacteria. Rumen bacterium isolated was identified as *Enterococcus casseliflavus* AJ301826, Y18161 in GenBank, and can be found in the gastrointestinal tract of mammals; but so far no studies that prove that *Enterococcus casseliflavus* decrease CH_4 production.

Key words: isolated, acetogenic, anaerobe, rumen, lyophiization.

1.3 Introducción

Las bacterias acetogénicas pueden ser aisladas desde el tracto intestinal de mamíferos, termitas, aguas residuales y termales hasta suelos, sedimentos marinos y de agua dulce (Drake, 1993; Jiang *et al.*, 1995; Rieu-Lesme *et al.*, 1998). Las bacterias acetogénicas son microorganismos anaerobios estrictos que catalizan la formación de acetato a partir de unidades de un carbono (C1) en su metabolismo energético (Rieu-Lesme *et al.*, 1998). Los acetógenos anaerobios utilizan la ruta de Wood–Ljungdahl para sintetizar Acetyl-CoA por la reducción de CO ó CO₂ + H₂ como una forma de conservar energía y asimilar el CO₂ por la síntesis de carbón celular (Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012), aunque hasta ahora la energía de conservación sobre la ruta Wood–Ljungdahl no se entiende por completo. Para el aislamiento de bacterias acetogénicas se recomienda el uso de vitaminas del complejo B y microminerales, porque la ruta metabólica del Acetyl-Coenzima A necesita coenzimas y cofactores para la síntesis del acetato. El aislamiento de bacterias acetogénicas comenzó en 1932 cuando se descubrieron microorganismos que convertían el H₂ y CO₂ en ácido acético. *Clostridium aceticum* fue el primer acetógeno aislado y caracterizado (Wieringa, 1940), posteriormente se aisló *Clostridium thermoaceticum* (Fontaine *et al.*, 1942), y sirvió de modelo para descubrir la ruta de Wood–Ljungdahl. Hasta ahora, se han aislado más de 100 bacterias acetogénicas siendo los géneros *Acetobacterium* y *Clostridium* los mejor caracterizados entre más de 22 géneros conocidos (Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012). Los productos naturales generados por bacterias acetogénicas resultado de su metabolismo son: acetato, butirato, etanol, butanol y 2,3-butanodiol (Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012), siendo el acetato el más importante en la producción animal por ser

utilizado como fuente de energía. Las bacterias acetogénicas compiten contra las metanogénicas por los sustratos H₂ y CO₂ para formar acetato y CH₄ respectivamente; con la acetogénesis reductiva se logra reducir 2 mol de CO₂ para formar acetato por la oxidación de H₂ mediante la reacción: $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$ (Tricia *et al.*, 1998). Por lo tanto, la energía que se pierde mediante el eructo en forma de CH₄ se puede utilizar en forma de acetato, lo que mejoraría la eficiencia energética de los rumiantes y reduciría las emisiones de CH₄ (Tricia *et al.*, 1998). El objetivo de esta investigación fue aislar una bacteria ruminal acetogénica en cultivo puro y conservarla en liofilización, para evaluarla en cocultivo (COC) de bacterias ruminales para disminuir la producción de CH₄ *in vitro*.

1.4 Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana perteneciente al Programa de Ganadería. La identificación molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas IREGED del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México.

1.4.1 Elaboración de medios de cultivo

Los medios anaerobios selectivos para aislar una bacteria ruminal acetogénica (BRA) a base de acetato-formato (AF-FR) se prepararon de acuerdo con la técnica que describe Hungate (1966) modificada por Bryant (1972) y recomendada por Cobos y Yocoyama (1995; Cuadro 1). Los medios de cultivo se prepararon con flujo constante de CO₂ para conservar anaerobiosis, y se incubaron por 48 h a 39 °C (incubadora Felisa FE-133A) para comprobar su esterilidad. El proceso de esterilización de los medios de cultivo fue por 15 min en una autoclave Tuttnauer 2540F a 121 °C y 15 PSI. La solución vitamínica

y antibiótica se adicionó al momento de utilizar los medios de cultivo para inocularlo debido a las características bioquímicas de dichas soluciones.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para aislamiento de una bacteria ruminal acetogénica.

Componente (100 mL)	AF-FR	AFA-FR
Agua destilada (mL)	48.5	48.5
Líquido ruminal clarificado ¹ (mL)	30.0	30.0
Solución mineral I ² (mL)	5.0	5.0
Solución mineral II ³ (mL)	5.0	5.0
Solución vitamínica ⁴ (mL)	1.0	1.0
Resazurina 0.1% ⁵ (mL)	0.1	0.1
Extracto de levadura (g)	0.2	0.2
Peptona de Soya (g)	0.1	0.1
Cisteína-sulfido ⁶ (mL)	2.0	2.0
Carbonato de sodio, sol. al 8% ⁷ (mL)	5.0	5.0
Acetato de sodio (g)	0.1	0.1
Formato de sodio (g)	1.0	1.0
Cloranfenicol ^{®8} (mL)	0.1	0.1
Agar (g)	--	2.0

¹ El líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, centrifugado a 23,000 xg (unidades de gravedad relativa) por 15 min y esterilizada a 12°C por 15 min a 15 PSI.

² Contiene (1000 mL) K₂HPO₄, 6 g.

³ Contiene (1000 mL) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl₂·2H₂O, 1.6g.

⁴ Contiene 100 mg de Clorhidrato de Tiamina; 100 mg de Clorhidrato de Piridoxina; 1000 mcg de Cianocobalamina en 100 mL de solución.

⁵ Contiene 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, se aforó a 100 mL.

⁶ Contiene 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH), más 2.5 g de Na₂S·9H₂O; se aforó a 100 mL con agua destilada.

⁷ Contiene 8 g de Na₂CO₃ por cada 100 mL de agua destilada.

⁸ Contiene 250 mg en 10 mL de solución.

1.4.2 Aislamiento y conservación de la bacteria ruminal

En tubos de cultivo de 18x150 mm estériles, se adicionaron 9 mL de medio AF-FR estéril. El aislamiento se inició de líquido ruminal fresco (LRF) de una vaca Jersey fistulada. El LRF rápidamente se filtró en manta de cielo, se centrifugó a $1,157 \times g$ 3 min^{-1} (centrifuga Eppendorf 5810-R) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; el sobrenadante se utilizó como inóculo A (inicial). Los tubos de cultivo se inocularon con 1 mL inóculo inicial A por triplicado, se incubaron a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta presentar turbidez. El tubo que presentó mayor turbidez se seleccionó y se usó como un inóculo nuevo en medios AF-FR. Después de presentar la turbidez, se tomó una muestra del medio de cultivo y se observó en un microscopio de fases de contraste Olympus BX51 para observar las morfologías bacterianas. El proceso se repitió hasta obtener un solo tipo morfológico bacteriano.

En tubos de cultivo de 18x150 mm estériles, se adicionaron 9 mL de medio con base en acetato-formato-agar-fluido ruminal (AFA-FR) estéril y se inclinaron 15° (aproximadamente) hasta su solidificación, como variante de la técnica de tubo rodado (Hungate, 1969). El medio AF-FR seleccionado con un solo tipo de morfología bacteriana se utilizó como inóculo, se usó una asa bacteriológica para inocular mediante la técnica de estriado, el tubo se incubó a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h para obtener colonias de la bacteria ruminal aislada. Las colonias de la bacteria aislada se caracterizaron morfológicamente. Un tubo con medio AF-FR se inoculó con una colonia de la bacteria aislada y se incubó $39 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h para utilizarlo como inóculo B en el proceso de conservación de la misma; se tomó una muestra para la prueba de fluorescencia y Tinción Gram.

Para conservar la bacteria ruminal aislada, en un vial serológico (100 mL) estéril se vertieron 45 mL de medio AF-FR estéril. El vial se inoculó con 5 mL de inóculo B, se incubaron por 48 h a 39 °C y se observaron en un microscopio de contraste de fases para asegurar el aislamiento. El vial serológico se dejó a temperatura ambiente por 2 h, se congeló a -38 °C en un congelador de rodillo Freezer Labconco Shell por 50 min hasta alcanzar una temperatura de -38 °C, posteriormente se liofilizó en un equipo Labconco FreeZone 4.5 L a una temperatura de -45°C y una presión de -0.030 mBar por 24 h (Figura 6).

1.4.2.1 Uso de carbón activado

Adicionalmente, durante la conservación de la bacteria aislada, se trabajó por separado un tratamiento con repetición para liofilizar (con y sin carbón activado), agregando 0.5 g de carbón activado justamente después de las 48 h de incubación a 39 °C. El vial serológico se dejó a temperatura ambiente por 2 h, agitando cada 20 min para homogenizar el carbón; posteriormente, se congeló a -38 °C en un congelador de rodillo Freezer Labconco Shell por 50 min hasta alcanzar una temperatura de -38 °C, por último se liofilizó en un equipo Labconco FreeZone 4.5 L a una temperatura de -45°C y una presión de -0.030 mBar por 24 h.

1.4.3 Identificación molecular de la bacteria aislada

1.4.3.1 Rehidratación de la bacteria aislada

La bacteria aislada se reactivó en medio de cultivo AFA-FR agregando 0.2 g de glucosa por cada 100 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo se vertió en cajas Petri, se dejaron enfriar y posteriormente se guardaron en jarras de anaerobiosis con un sobre de Gas Pack para evitar la oxidación. El sembrado de la bacteria se llevó a cabo en una

campana de flujo laminar vertical mediante la técnica de estriado con una asa bacteriológica. Se incubaron a 39°C por 96 h, posteriormente se guardaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de hacer la extracción de DNA.

1.4.3.2 Extracción de DNA por método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB).

La extracción de DNA se hizo por el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) citado por Doyle y Doyle (1990).

1.4.3.3 Amplificación del DNAr 16S

La amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S ribosomal se realizó usando Primer's universales para bacterias (8F y 1492R Promega®). Se hizo un mix tal como se muestran los componentes Cuadro 2.

Cuadro 2. Mix de reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Componente	Unidades μL
Buffer	3.0
Dntps	0.6
Primer F8	0.18
Primer R1492	0.18
Taq polimerasa	0.18
Agua	7.86
DNA	3.0

De acuerdo al protocolo de PCR Promega®

Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas de acuerdo con las recomendaciones de los Primer's: 3 min a 95 °C de pre-desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 2 min, 1 min a 59°C de acoplamiento y 1.5 min a 72 °C de elongación, por último un ciclo más post-elongación de 5 min a 72 °C.

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% para verificar la amplificación de la PCR, con los siguientes componentes (Cuadro 3), dejándose solidificar a temperatura ambiente por 20 min, se introdujo en la cámara de electroforesis y se retiraron los peines. Se agregó buffer de corrida TAE 1X en la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel de agarosa.

Cuadro 3. Componentes del gel de agarosa al 1.5%.

Componente	Unidades por cada 200 mL
Agarosa	3.0 g
TAE 1x	200 mL
Red Gel	4 µL

De acuerdo al protocolo de PCR Promega®

Se depositaron 3 µL de marcador molecular, y 3 µL de muestra de DNA mezclado con 1,5 µL de buffer de carga con una micropipeta; posteriormente, se hizo la corrida de la muestra a 110 V 90 min⁻¹, al término se extrajo el gel de la cámara de electroforesis, se limpió el exceso de buffer y colocó dentro de un tras-iluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX para visualizar el producto de PCR.

1.4.3.4 Análisis de secuencia

La secuenciación del fragmento amplificado se realizó mediante el equipo GeneticAnalyzer 3130. Las secuencias generadas se ensamblaron y editaron en el

programa BioEdit Sequence Alignment Editor V 7.1.3.0 generando una secuencia consenso. La secuencia de nucleótidos fue comparada con las secuencias del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.4.4 Diseño y análisis estadístico

La información de la concentración de bacterias totales fue analizada como medidas repetidas en el tiempo en un diseño completamente al azar usando el procedimiento Mixed de SAS (2011). Las medias fueron ajustadas por mínimos cuadrados y compradas usando la prueba de Tukey ajustada.

1.5 Resultados y discusión

1.5.1 Características de la bacteria ruminal aislada

La bacteria ruminal aislada es caracterizada como una bacteria Gram + (Figura 4) en forma de coco, encontrándose sola o formando pares de cocos, en ocasiones se forman cadenas de hasta 9 cocos, con resultado negativo a la prueba de fluorescencia.

La colonia bacteriana en medio sólido es de superficie lisa y elevación convexa, de consistencia suave, color crema y de circunferencia irregular (Figura 5).

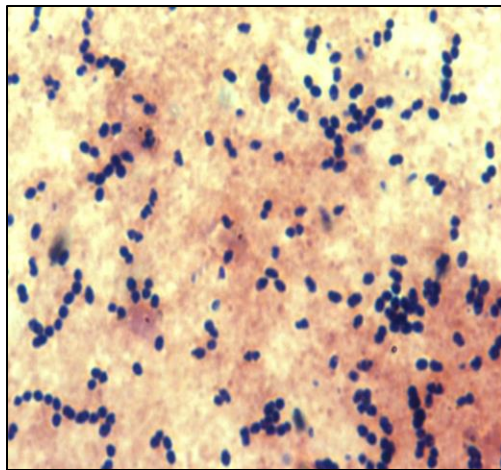


Figura 4. Bacteria ruminal aislada, Gram +.

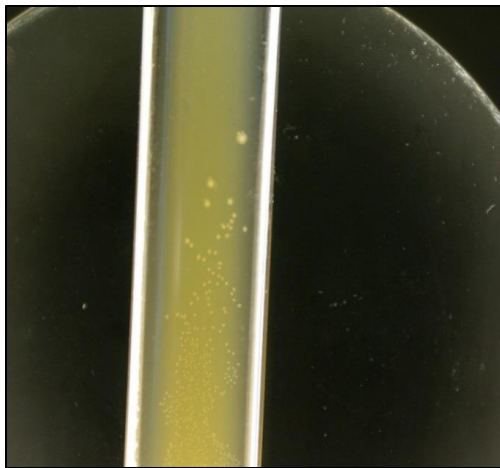


Figura 5. Colonia de la bacteria ruminal aislada.

La concentración de bacterias acetogénicas aisladas en condiciones *in vitro* no sobrepasan una concentración de 10^8 ; tal como lo mencionan Bocazzi y Patterson (2013) al obtener una concentración de bacterias en 5×10^8 UFC mL⁻¹ y 3×10^8 UFC mL⁻¹ en dos aislamientos respectivamente. Tricia *et al.* (1998) obtuvieron una concentración de 4.1×10^8 bacterias mL⁻¹ de *Acetitomaculum ruminis*; y Rodríguez (2009) aisló una bacteria ruminal acetogénica en medio selectivo a base de formato de sodio a una concentración de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹. Por su parte, la bacteria aislada tiene una concentración de 6.75×10^8 bacterias mL⁻¹, una concentración similar de otros aislamientos reportados para el mismo tipo de bacterias.

1.5.2 Conservación de la bacteria ruminal aislada

La conservación de la bacteria aislada se hizo mediante el proceso de liofilización; este método es el más utilizado para conservar bacterias y sobre todo transportar grandes colecciones de cepas bacterianas (Morales-García *et al.*, 2010). De acuerdo a la literatura consultada, las cepas bacterianas conservadas en liofilización pueden conservarse de 10 hasta 25 años (Morales-García *et al.*, 2010; Burguet-Lago *et al.*, 2012) manteniendo sus características originales, sin contaminarse, conservándose viable y sin modificarse genéticamente (García y Uruburu, 2000), por lo tanto la bacteria aislada podría mantener viable para realizar pruebas sobre la disminución de CH₄ hasta 2040. Sin embargo, la liofilización tiene desventajas. Se ha observado que la liofilización daña los microorganismos conservados; las células bacterianas pueden mutar en el proceso de congelación y perder características importantes, por ejemplo la capacidad de fijar nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae* (Stoycheva *et al.*, 2007), en esta investigación solo se cuantificó la concentración de bacterias antes y después de

liofilización y la población bacteriana no disminuyó, por que se contabilizaron casi al momento, seria conveniente rehidratar el liofilizado en 10 años y comprobar su viabilidad. Sánchez (2014) recomiendan usar lioprotectores durante el proceso de liofilización para conservar las características de las bacterias, sin embargo hasta ahora no existe un crioprotector universal, algunos protectores utilizados son: disacáridos (Leslie *et al.*, 1995; Palmfeldt *et al.*, 2003; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006) polialcoholes, lactosa, trehalosa (Pehkonen *et al.*, 2008).

1.5.2.1 Carbón activado

El Cuadro 4 muestra el efecto de la adición del carbón activado como lioprotector en la conservación del consorcio de bacterias celulolíticas durante el proceso de liofilización.

Cuadro 4. Concentración de bacterias a 24, 48 y 72 h de incubación adicionando carbón activado.

Tratamiento h	Estimador 10 ⁸	EEM
C 24	6.58	0.19
C 48	6.75	0.19
C 72	6.67	0.19
S 24	6.25	0.19
S 48	6.42	0.19
S 72	6.33	0.19

No se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$). C = Con carbón Activado. S = Sin carbón activado. EEM = Error estándar de la media.

De acuerdo al análisis estadístico, no existió interacción entre el factor tiempo y la concentración de bacterias totales. Por lo tanto, el factor tiempo no afectó el resultado

de los tratamientos sobre la concentración de bacterias totales. Las bacterias totales mantuvieron su población constante a 24, 48 y 72 h de incubación, incluso el hecho de haber repetido el experimento no varió el comportamiento de la población bacteriana ($P \leq 0.05$). Sánchez (2014) reporta que adicionando 0.1 g de carbón activado a bacterias celulolíticas, se aumenta la degradabilidad de papel Whatman, y hay un incremento en la concentración de bacterias en 3.28×10^8 bacterias mL^{-1} respecto al tratamiento sin carbón, lo que indica que el carbón activado funciona como lioprotector, sin embargo el carbón activado en esta investigación mantuvo constante la concentración de bacterias. Malik (1990) describe al carbón activado como el mejor lioprotector para bacterias, sin aumentar la concentración de microorganismos, tal como sucede con la concentración de bacterias en esta investigación. Además, se ha observado que durante la reactivación de bacterias existe una mayor supervivencia de los mismos en cultivos estables y pueden mantenerse vivos por más tiempo en comparación con cultivos sin carbón activado. El carbón activado, tiene propiedades para reducir el medio de cultivo donde se encuentre, además sirve como adsorbente para diversos radicales perjudiciales como sulfitos, superóxidos y otros radicales libres creados por varios donantes de electrones en la reacción con O_2 , y regula los cambios bruscos de pH (Malik, 1990), lo cual es importante porque estas reacciones se presentaron durante el uso del carbón activado, recalando que las bacterias anaerobias ruminales son sensibles a cambios de pH afectando la población microbiana.

1.5.3 Identificación molecular de la bacteria ruminal aislada

1.5.3.1 Concentración de DNA extraído

La extracción de DNA por la técnica del bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) consiste en utilizar buffers y solventes orgánicos como el fenol y cloroformo, sin embargo, existen Kits comerciales de extracción de DNA genómico total (Lickfeldt *et al.*, 2002) que facilitan el procedimiento pero no ofrecen resultados confiables. La extracción de DNA de la bacteria aislada se presenta en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Concentración de DNA extraído de la bacteria aislada.

Muestras	Concentración ng/μl	260/280	260/230
1	218.9	2.00	2.21
2	490.3	2.03	2.22

Resultados obtenidos del Nanodrop 2000c Thermo USA.

Las concentraciones de DNA obtenidas presentaron pureza y calidad para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La pureza (calidad) del DNA se determina por la medida de absorbancia 260/280 y para la absorbancia a 260/230 determina la presencia de fenoles, carbohidratos y algunos compuestos aromáticos (Page, 2000).

El producto de la extracción de DNA fue utilizado para la amplificación del gen ADNr 16S mediante PCR. Derivado de la amplificación de la PCR y de la secuenciación del gen ADNr 16S se obtuvieron 1180 pb. La secuencia obtenida se comparó con las secuencias guardadas del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La bacteria ruminal aislada fue 100% similar a *Enterococcus casseliflavus* AJ301826, Y18161 (Figura 6).

```
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTTTCTTTACCGG
AGCTTGCTCCACCGAAAGAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAA
CACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTTCGCTCACT
GATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG
GACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAAC
AAGGATGAGAGTAAAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGCATGTTGGA
GCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGA
GGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGC
ACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCA
GTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT
GGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGG
```

Figura 6. Secuencia de nucleótidos obtenidos de la secuenciación de la bacteria ruminal aislada.

Los microorganismos del género *Enterococcus* son bacterias Gram (+) que habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, incluyendo al hombre y animales de sangre caliente. Los *Enterococcus* son excretados en sus heces, de ahí que su presencia en el ambiente indica contaminación de origen fecal y el riesgo de aparición de gérmenes patógenos. *Enterococcus* se encuentran dentro del grupo de microorganismos indicadores de la inocuidad de los alimentos, su amplia distribución pueden encontrarse en estos productos, especialmente en los de origen animal (Manual® Bergey's of Systematic bacteriology, 2009). Los *Enterococcus* son células esféricas u ovoides, de tamaño 0.6-2.0 × 0.6-2.5 µm, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas, no son motiles, con excepción de las especie *Enterococcus casseliflavus* que es la que se aisló; son anaerobios facultativos, quimiorganotrófos, con metabolismo fermentativo. Los *Enterococcus*

fermentan un amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de L (+)-ácido láctico, pero no de gas, y producen un pH final de 4.2-4.6. Son negativos a la prueba de catalasa. Crecen usualmente en un caldo de cultivo desde 10 °C hasta 45 °C, aunque el crecimiento óptimo es a 37 °C (Manual® Bergey's of Systematic bacteriology, 2009); de acuerdo a las características de *Enterococcus* antes descritas, son las que presentó la bacteria aislada durante el proceso de aislamiento.

La especie de la bacteria *Enterococcus casseliflavus* presenta un crecimiento a pH de 9.6, además, las cepas sobreviven al calentamiento a 60 ° C durante 30 min, presentando resultado negativo a la prueba de Tirosina descarboxilación; esta característica de pH difiere de la bacteria aislada porque los medios de cultivo para el aislamiento tenían un pH cercano a 7. Los ácidos hexadecanoico y octadecenoico son los principales ácidos grasos de cadena larga que produce y no son hidroxilados. Generalmente, la especie se considera móvil y pigmentada aunque se han registrado en clínica humana cepas no móviles y no pigmentadas, y puede ser aislada de materiales clínicos en humanos y veterinarios, desde alimentos, el medio ambiente, y puede estar asociado a plantas (Manual® Bergey's of Systematic bacteriology, 2009). Hasta ahora no existen reportes que la bacteria *Enterococcus casseliflavus* disminuya la producción de CH₄. Las características según la especie, no concuerdan del todo con las que ha presentado la bacteria ruminal aislada, por lo que se recomienda caracterizar nuevamente la bacteria aislada y repetir la identificación molecular para asegurar la identificación molecular.

1.6 Conclusiones

- Se logró aislar una bacteria ruminal medio de cultivo anaerobio selectivo a base de formato-fluido ruminal.
- La bacteria aislada presentó una concentración de 6.75×10^8 bacterias mL^{-1} a 48 h de incubación a 39 °C.
- La identificación molecular de la bacteria aislada fue *Enterococcus casseliflavus*, la cual no coincide con la bacteria esperada.
- El carbón activado no aumentó la concentración de bacterias.

1.7 Literatura

- Bocazzi, P., and J. A. Patterson. 2013. Isolation and Initial Characterization of Acetogenic Ruminant Bacteria Resistant to Acidic Conditions. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 3: 129-144.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1324-1328.
- Burguet-Lago, N., N. Sierra-Prado, L.C. Brito-Godoy. 2012. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 43, No. 3: 1-4.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In: *Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp 151-161.
- De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey. K. Schleifer and, W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Vol. 3. The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 1422 p.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* Vol. 12, no. 1, p. 13-15.
- Drake, H. L. 1993. Acetogenesis and acetogenic bacteria. In: Lederberg J (ed) *Encyclopedia of microbiology*, vol. 1. New York: Academic Press, Inc., pp 1-15.
- Fontaine, F. E., W. H. Peterson, E. McCoy, M. J. Johnson, G. J. Ritter. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 43: 701-715.
- García, L. M. D., y F. F. Uruburu. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM.* 30: 12-16.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York, NY. 533 pp.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*, J. R. Norris and D.W. Ribbons (eds). Vol. 3. Academic Press, New York. pp 117-132.
- Jiang, W. H., J. A. Patterson, L. R. Steenson. 1995. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from a ruminal acetogen. *Current microbiology* Vol. 31: 336-339.

- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, and L. M. Crowe. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3592-3597.
- Lickfeldt, D. W., N. E. Hofmann, J. D. Jones, A. M. Hamblin, and T. B. Voigt. 2002. Comparing three DNA extraction procedures for cost, efficiency, and DNA yield. *Hort. Science* 37: 822-825.
- Malik, K. A. 1990. Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. *Journal of Microbiological Methods* 12: 117-124.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez y Terrón, y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología.* 14(02): 11-29.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, J. L. Ramos. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): 472-477.
- Page, A. F. 2000. Detection and avoidance of polysaccharides in plant nucleic acid extraction. Thermo Scientific. In: <http://www.nanodrop.com/Library/T111-Detection-and-Avoidance-of-Polysaccharides-in-Plant-Nucleic-Acid-Extractions.pdf>. Consultada en Marzo de 2015.
- Palmfeldt, J., P. Radström, and B. Hahn-Hägerdal. 2003. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* 47: 21-29.
- Pehkonen, K. S., Y. H. Roos, S. Miao, R. P. Ross, and C. Stanton. 2008. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GC. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1732-1743.
- Rieu-Lesme, F., C. Dauga, G. Fonty, and J. Dore. 1998. Isolation from the Rumen of a New Acetogenic Bacterium Phylogenetically Closely Related to *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 4: 89-94.
- Rodríguez, C. J. A. 2009. Aislamiento y caracterización in vitro de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 98 p.
- Sánchez, S. P. 2014. Aislamiento de una bacteria ruminal celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación in vitro de sustratos celulolíticos. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 94 p.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schiel-Bengelsdorf B., y P. Dürre. 2012. Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters* 586: 2191-2198.

- Stoycheva, T., P. Venkov, and Ts Tsvetkov. 2007. Mutagenic effect of freezing on mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* 54: 243-250.
- Tricia, D., J. A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle, D.M. Schaefer. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *acetitomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3429-3436.
- Wieringa, K. T. 1940. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 6, 251–262.

CAPITULO II. DISMINUCIÓN DE METANO (CH₄) *IN VITRO* EN MEDIOS DE CULTIVO CON FORMATO DE SODIO (F-FR) Y GLUCOSA CELOBIOSA ALMIDÓN (GCA-FR)

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

2.1 Resumen

Se realizaron medios de cultivo anaerobio a base de formato de sodio (F-FR) y una combinación de glucosa, celobiosa y almidón (GCA-FR). Los tratamientos fueron tres por cada tipo de medio de cultivo con cinco repeticiones: 1) *Enterococcus casseliflavus* (sola); 2) Co-cultivo (COC) (combinación de *Enterococcus casseliflavus* y fluido ruminal (FR) en 50% cada uno); 3) fluido ruminal (FR; se extrajo de una vaca Jersey fistulada en rumen). Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3. Las medias se compararon por el método de Tukey, utilizando el procedimiento GLM. La concentración de CH₄ en los medios con F-FR no disminuyó en COC (simula el rumen) comparado con el tratamiento en FR (testigo), sin presentar diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Los medios GCA-FR en COC aumentó la cantidad de CH₄ comparado con FR, presentando diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$). La producción del ácido acético solo aumentó en medios con GCA-FR en 11.89% y fue diferente ($P \leq 0.05$) al resto de tratamientos; este incremento se traduce como energía de producción en el rumiante. Se concluye que *Enterococcus casseliflavus* no disminuyó la producción de CH₄ *in vitro*.

Palabras clave: *Enterococcus casseliflavus*, metano, ácido grasos volátiles.

DECREASE METHANE (CH₄) *IN VITRO* IN MEDIUM CULTURE WITH FORMATE (F-FR) AND GLUCOSE CELLOBIOSE AND STARCH (GCA-FR)

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

2.2 Abstract

Anaerobic culture media were made based sodium formate (F-FR) and a combination of glucose, cellobiose, and starch (GCA-FR). Treatments were three for each type of culture medium with five repetitions: 1) *Enterococcus casseliflavus* (alone); 2) Co-cultivation (COC) (combination of *Enterococcus casseliflavus* and ruminal fluid (FR) in 50% each); 3) ruminal fluid (FR, was extracted from a Jersey cow rumen cannulae). The data were analyzed in a completely randomized design with 2x3 factorial arrangement. Means were compared by the Tukey method, using the GLM procedure. The concentration of CH₄ in the media with F-FR unabated in COC (simulates the rumen) compared to treatment in FR (control), without significant differences ($P \leq 0.05$). The GCA-FR media COC increased the amount of CH₄ compared to FR, presenting statistical differences ($P \leq 0.05$). The production of acetic acid only increased by means GCA-FR 11.89 % and was different ($P \leq 0.05$) to other treatments; this translates to increased energy production in the ruminant. It is concluded that *Enterococcus casseliflavus* not decreased CH₄ production *in vitro*.

Keywords: *Enterococcus casseliflavus*, methane, volatile fatty acid.

2.3 Introducción

El metano (CH₄) es un gas de efecto invernadero (GEI; Zhou *et al.*, 2011) producido en los rumiantes por bacterias metanogénicas durante la fermentación anaeróbica de carbohidratos presentes en los alimentos y, representa una pérdida de energía de 2 a 12 % (Jhonson y Jhonson, 1995). Las bacterias metanogénicas para formar CH₄ utilizan CO₂ como aceptor de electrones e H₂ como donador de electrones en la respiración anaerobia (Bonilla y Lemus, 2012). Las bacterias acetogénicas son microorganismos anaerobios estrictos capaces de utilizar H₂ como fuente de energía y CO₂ para reducirlo y formar acetato; también pueden utilizar sustratos como: productos de la biodegradación de polímeros naturales, azúcares, alcoholes y componentes aromáticos (Ragsdale, 2008). El producto final de la fermentación de bacterias acetogénicas es el acetato, un ácido graso volátil (AGV) que el rumiante utiliza como fuente de energía y es producido mediante la ruta Wood-Ljungdahl (Henderson *et al.*, 2010) o del Acetyl-CoA. Los sustratos para formar acetato y CH₄ son los mismos, por tanto se genera competencia entre bacterias acetogénicas y metanogénicas; sin embargo las bacterias metanogénicas también utilizan como sustrato: formato de sodio, metilaminas y metanol (Zinder, 1992; Mackie *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 2006) para formar CH₄. Nollet *et al.*, (2007) describen la estequiometría de la reacción general por competencia de sustratos: Acetogénesis $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$; Metanogénesis $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$. Pocas bacterias acetogénicas aisladas de el rumen han sido reportadas que tengan un impacto mayor sobre la disminución de CH₄; si esto se lograra realizar, la acetogénesis tendría tres beneficios directos sobre el huésped y el medio ambiente: 1) una disminución en la pérdida de energía del alimento, 2) mayor

producción de compuestos energéticos (acetato) y, 3) una disminución en la contaminación por CH₄ al ambiente (Parameswaran *et al.*, 2010). Por otro lado, la bacteria aislada fue identificada molecularmente como *Enterococcus casseliflavus* (EC), sin embargo, hasta ahora no existen evidencias de que esta bacteria origine una disminución de CH₄ y aumento de acetato; por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de *Enterococcus casseliflavus* para disminuir la concentración de CH₄ en pruebas *in vitro*, mediante medios de cultivo usando como fuente de carbono formato de sodio (F-FR) y una combinación de glucosa, celobiosa y almidón (GCA-FR).

2.4 Materiales y métodos

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

2.4.1 Elaboración de medios de cultivo

Medios de cultivo anaerobios fueron obtenidos utilizando como sustrato formato de sodio (F-FR) y una combinación de glucosa, celobiosa y almidón (GCA-FR); se prepararon de acuerdo con la técnica que describe Hungate (1966) modificada por Bryant (1972) y recomendada por Cobos y Yocoyama (1995). Los medios de cultivo (Cuadro 6) se hicieron con flujo constante de CO₂ para conservar anaerobiosis, y se incubaron por 48 h a 39 °C (incubadora Felisa FE-133A) para comprobar esterilidad. El proceso de esterilización de los medios de cultivo fue por 15 min en una autoclave Tuttnauer 2540F a 121 °C y 15 PSI.

Cuadro 6. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para bacterias acetogénicas.

Componente (100 mL)	F-FR	GCA-FR
Agua destilada (mL)	52.6	52.6
Líquido ruminal clarificado ¹ (mL)	30.0	30.0
Solución mineral I ² (mL)	5.0	5.0
Solución mineral II ³ (mL)	5.0	5.0
Resazurina 0.1% ⁴ (mL)	0.1	0.1
Extracto de levadura (g)	0.1	0.1
Peptona de Soya (g)	0.2	0.2
Cisteína-sulfido ⁵ (mL)	2.0	2.0
Carbonato de sodio, sol. al 8% ⁶ (mL)	5.0	5.0
Formato de sodio (g)	1.0	--
Glucosa	--	0.06
Celobiosa	--	0.06
Almidón	--	0.06

¹ El líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, centrifugado a 23,000 xg (unidades de gravedad relativa) por 15 min y esterilizada a 12°C por 15 min a 15 PSI.

² Contiene (1000 mL) K₂HPO₄, 6 g.

³ Contiene (1000 mL) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl-2H₂O, 1.6g.

⁴ Contiene 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, se aforó a 100 mL.

⁵ Contiene 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH), más 2.5 g de Na₂S-9H₂O; se aforó a 100 mL con agua destilada.

⁶ Contiene 8 g de Na₂CO₃ por cada 100 mL de agua destilada.

2.4.2 Rehidratación de la bacteria liofilizada

Enterococcus casseliflavus (EC) se rehidrató colocando aproximadamente 0.05 g de liofilizado en un tubo de cultivo con medio F-FR, se incubó a 39 °C por 72 h. A las 24, 48 y 72 h se obtuvo la concentración de bacterias por medio de una cámara Petroff-

Hausser (área de 0.0025 mm² y profundidad de 0.02 mm) y un microscopio de contraste de fases.

La concentración de bacterias se determinó con la fórmula:

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

Donde:

[B] = Concentración de bacterias por mL.

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

FD = Factor de dilución de la muestra.

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

2.4.3 Producción de gas *in vitro*

En viales serológicos de 100 mL estériles se adicionaron 72 mL de medio de cultivo anaerobio F-FR y GCA-FR estéril. Los viales serológicos se utilizaron como biodigestores, los cuales se colocaron en baño María a 39 °C (Termo Scientific 2862). Se utilizó el sistema de producción de gas descrito por Cobos y Yocoyama (1995) con trampa solución salina; que consistió en preparar una solución salina saturada con 380 g de NaCl L⁻¹ de agua destilada, se ajustó el pH a 2 y se agregaron 5 mL de naranja de metilo al 0.1% como indicador de acidez. La solución-salina se depositó en viales serológicos de 50 mL llenos (sin dejar espacio) y fueron sellados con tapones de hule y casquillos de aluminio. Los biodigestores y viales trampa se conectaron con mangueras de Tygon® (2.38 mm Ø interno y 40 cm de longitud) con agujas hipodérmicas en los

extremos. El vial trampa solución-salina se le insertó una aguja hipodérmica como válvula de salida; y se colocó de manera inversa en una probeta de 50 mL modificada que sirvió como colector de la solución salina saturada desplazada por el gas producido durante la incubación a determinado tiempo. Se midió el desplazamiento del gas en los viales trampa solución-salina a las 24, 48 y 72 h de incubación.

El CH₄ y CO₂ se tomó directamente del biodigestor (espacio de cabeza) cuando no hubo desplazamiento de la solución salina. La concentración se determinó en un cromatógrafo de gases Claurus 500 Perkin Elmer y una columna PE 6'x1/8 ODSS: Porapak 080/100. Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura de la trampa en el horno de inicio 28°C min⁻¹, rampa 2.5°C min⁻¹, temperatura final 35°C; temperatura del inyector TCD 130°C; volumen de inyección 0.3 mL de forma manual; flujo de gas acarreador (Helio) 23.5 mL min⁻¹ y tiempo de retención de CH₄ 0.73 min ± 0.05 y CO₂ 1.05 min ± 0.05.

Para medir la producción de AGV se adicionaron 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25% en viales Ependorff de 2 mL y se extrajo 1 mL de medio de cultivo de los biodigestores inoculados a 72 horas de incubación, se guardaron bajo refrigeración (4 °C). Las muestras se centrifugaron a 18, 800 x g 10 min⁻¹ (Ilettich EBA21) y el sobrenadante se depositó en viales para cromatografía (Perkin Elmer) de 1.5 mL. La determinación de AGV fue de acuerdo con la técnica que describen Erwin *et al.*, (1961), y se usó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Modelo Claurus 500 con columna capilar Elite FFAP. El gas acarreador fue hidrógeno con flujo 5.5 ml por minuto. Se inyectó 1 µl de muestra en modo automático, con temperatura de inyector y detector de 250 °C por minuto hasta una temperatura final de 140 °C. Se obtuvieron tres picos en

un tiempo de retención de 1.30, 1.60 y 2.15 min para acético, propiónico y butírico respectivamente, con un tiempo total de cada corrida de 5.05 minutos.

2.4.4 Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales se determinó obteniendo 1 mL de medio de los biodigestores y se depositó en un tubo de cultivo 13x100 junto con 0.25 mL de formaldehído al 10%, se guardaron bajo refrigeración (4 °C) hasta realizar el conteo. La cuantificación de bacterias totales se hizo a 72 h de incubación con una cámara Petroff-Hauser, tal como se describió anteriormente.

El pH se midió directamente con un potenciómetro Orión modelo 720A+, calibrado a pH 4.0 y 7.0. El potencial de óxido-reducción se determinó con un potenciómetro Orión modelo 710A; ambas mediciones se realizaron al mismo tiempo del muestreo.

2.4.5 Nitrógeno amoniacal (NH₃)

En los medios con F-FR se midió la producción de NH₃ para explicar el aumento de pH en los tratamientos en COC y FR. Se tomaron muestras para AGV a 0, 24, 48 y 72 horas de incubación. El NH₃ se cuantificó con la técnica descrita por McCullough (1967). Las muestras se centrifugaron a 18, 800 x g 10 min⁻¹ (Ilettich EBA21), del sobrenadante se colectaron 20 µL y se depositaron en tubos de ensaye (10 mL) adicionando 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de sodio. Las muestras se incubaron 30 min en baño maría a 37 °C y se adicionaron 5 mL de agua destilada para su dilución, se agitaron en un Vortex (Genie2 VWR Scientific Products). La lectura de absorbancia se midió en un espectrofotómetro Perkin Elmer® a una longitud de onda de 630 nm.

2.4.6 Tratamientos

Los tratamientos fueron: 1) *Enterococcus casseliflavus* (EC; sola); 2) Co-cultivo (COC); 3) fluido ruminal (FR); para medios de F-FR y GCA-FR con cinco repeticiones. El inóculo fue LRF que se extrajo de una vaca Jersey fistulada en rumen, se centrifugó a $1,157 \times g$ 3 min^{-1} (centrifuga Eppendorf 5810-R) y se mantuvo a $39 \text{ }^\circ\text{C}$, se preparó bajo flujo constante de CO_2 en una campana de flujo laminar vertical Labconco Class II Type A2. La concentración de bacterias se calculó con cámara Petroff-Hauser y se igualó la concentración de bacterias a 10^8 bacterias mL^{-1} . Las diluciones del FR se hicieron en medio de cultivo de acuerdo a cada tratamiento. Los biodigestores fueron inoculados con 8 mL de LRF y el COC fue la combinación de ambos inóculos en 50% cada uno.

2.4.7 Diseño y análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variables iniciales de CH_4 , CO_2 , AGV, acetato, propionato, butirato, potencial de oxido-reducción, pH y concentración de bacterias totales se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×3 (dos medios de cultivo x tres tratamientos) con cinco repeticiones por tratamiento. Las medias se compararon por el método de Tukey, utilizando el procedimiento GLM de SAS (2011). Las variables NH_3 y pH se analizaron bajo una prueba de regresión simple tomando como variable dependiente la producción de pH (Y) y variable independiente NH_3 (X) de SAS (2011).

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Variables de producción de gas *in vitro*

La prueba de producción de gas *in vitro* (Figura 7) se terminó a 72 horas de incubación a 39 °C; no existió producción de gas en los medios inoculados con *Enterococcus casseliflavus* (EC) sola, tal como lo reporta Rodríguez (2009) utilizando como sustrato una dieta integral para ovinos inoculados con una bacteria ruminal acetogénica (BRA) pura; solo existió desplazamiento de las trampas solución salina en tratamientos con GCA-FR inoculados en COC y FR. Al no existir producción de gas indica una baja digestibilidad *in vitro* de los sustratos utilizados. Existen diversos factores que influyen sobre la producción de biogás y de CH₄ en particular, como el tipo de sustrato, presencia de antibióticos, concentración de AGV, concentración de amoníaco (NH₃), relación carbono:nitrógeno (C:N), temperatura, pH, potencial de óxido-reducción, concentración de sólidos totales y la misma población bacteriana (Shi *et al.*, 2011; Domínguez, 2014).



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

Los medios de cultivo tenían como sustrato formato de sodio (F-FR) y una combinación de glucosa, celobiosa y almidón (GCA-FR). El tratamiento inoculado con la bacteria aislada sola, tuvo una interacción bacteriana mínima en comparación con los tratamientos inoculados en COC y FR siendo mayor la cinética de fermentación y los sustratos fueron utilizados para el metabolismo de las bacterias, además la producción de gas es una manera indirecta de medir la degradación de los sustratos, principalmente los carbohidratos (Lara *et al.*, 2009) tal como sucede con el tratamiento con medios de cultivo GCA-FR que es donde se produce una mayor fermentación y degradación de sustratos por el tipo de bacterias inoculadas.

2.5.1.1 Metano (CH₄)

De acuerdo con el análisis estadístico, existe interacción significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamiento e inóculo, por lo tanto, la producción de CH₄ está influenciada por el tipo de medio de cultivo y el tipo de inóculo. Los medios de cultivo F-FR y GCA-FR inoculados con la EC sola no presentaron concentración de CH₄ comparando los medios en COC y FR. El porcentaje de CH₄ producido fue 0.0 % para medios con F-FR y GCA-FR (Cuadro 7), esto asegura que EC aislada es una bacteria que no produce CH₄. El tratamiento en F-FR COC semeja a las condiciones de un rumen, como si un rumiante fuese inoculado con bacterias ruminales en forma de prebiótico logrando disminuir la concentración de CH₄ en un 6.89%, aunque estadísticamente ($P \leq 0.05$) no se presentaron diferencias significativas. Cabe mencionar, que en estas condiciones se realiza la competencia de la acetogénesis vs metanogénesis por los sustratos de los medios de cultivo.

Cuadro 7. Porcentaje (%) de CH₄ en medio F-FR y GCA-FR.

Tratamientos	Inóculo	% CH ₄	% CO ₂	REDOX	Bacterias 10 ⁹
F-FR	EC	0.00 ^a	100.00 ^a	-180.18 ^a	0.55 ^d
	COC	52.15 ^b	47.84 ^b	-360.88 ^b	4.00 ^a
	FR	56.01 ^b	43.99 ^b	-366.50 ^b	2.00 ^b
GCA-FR	EC	0.00 ^a	100.00 ^a	-132.94 ^c	0.58 ^d
	COC	17.49 ^c	82.51 ^c	-282.82 ^d	1.25 ^c
	FR	10.82 ^d	89.18 ^c	-288.40 ^d	1.00 ^c
EEM	--	0.22	0.22	7.40	0.02
		Valor P			
Tratamiento		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Inóculo		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Tratamiento*Inóculo		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,b,c,d}, Medias con literales diferentes difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). pH inicial del medio de cultivo 7.17. F-FR = Medios con formato de sodio. GCA-FR = Medios con glucosa, celobiosa y almidón. EC = *Enterococcus casseliflavus*. COC = Cocultivo (bacterias acetogénicas + líquido ruminal. FR= Fluido ruminal. EEM = Error estándar de la media. REDOX = Potencial de óxido-reducción.

Los medios con GCA-FR presentaron una mayor producción de CH₄ en el tratamiento en COC, existiendo diferencias ($P \leq 0.05$) contra FR. La producción de CH₄ en GCA-COC aumentó, esto indica una interacción de EC con las bacterias ruminales, lo cual confirma que las bacterias metanogénicas son más eficientes que las acetogénicas, y se forma más CH₄ y menos acetato (Bocazzi y Patterson, 2013). Breznak y Kane (1990) mencionan que existen factores que influyen en la competitividad entre acetógenos y metanógenos: la metanogénesis tiene un rendimiento energético mayor que la acetogénesis (Breznak y Blum, 1991); los metanógenos tienen una mayor afinidad por H₂ que los acetógenos (Bocazzi y Patterson, 2013), y el H₂ producido es utilizado rápidamente para formar CH₄, tal como sucede en los medios donde se inoculó bacterias en COC y FR, que es donde se produjo mayor cantidad de CH₄. A nivel de rumen, la concentración de bacterias metanogénicas es mayor, este factor influye de

manera directa sobre la producción de CH₄ porque el líquido ruminal se utilizó fresco tal como se obtuvo de la vaca fistulada. Otras investigaciones buscan aumentar la población de bacterias acetogénicas (Martin *et al.*, 2009) para contrarrestar la población de bacterias metanogénicas, sin embargo se sabe que para maximizar la actividad acetogénica, esta depende del tipo de sustrato que exista en el rumen (McAllister *et al.*, 1996).

El porcentaje sobre la disminución de CH₄ por bacterias acetogénicas fue mínimo y no ha tenido un impacto importante. López *et al.* (1999), solo disminuyeron 5% la producción de CH₄ con la bacteria *Eubacterium limosum* ATCC 8486 a 24 h de incubación utilizando como sustrato una dieta integral, este porcentaje sobre la disminución de CH₄ es similar a lo obtenido por la bacteria *E. casseliflavus* en esta investigación. Por su parte Nollet *et al.* (1997) no disminuyeron la producción de CH₄ *in vitro* con *Ruminococcus productus* en incubación en cultivo mixto con bacterias ruminales, tal como sucede en esta investigación. Joblin (1999), recomienda inhibir la metanogénesis en rumen, para que las bacterias acetogénicas puedan aprovechar el H₂ existente. Por lo tanto, como el CH₄ es un producto final de la degradación del alimento en rumen, las estrategias viables para reducir sus emisiones implican, alterar los patrones de fermentación, reduciendo la producción de H₂ y formato de sodio, principales precursores para la metanogénesis en el rumen (Ramirez *et al.*, 2014). Rodriguez (2009) logró aislar una bacteria ruminal acetogénica eficiente que se identificó como *Clostridium paraputrificum* la cual disminuía en 66% la producción de CH₄ en cocultivo con bacterias ruminales utilizando como sustrato una dieta integral para ovinos, el impacto que presenta sobre la disminución de CH₄ es alto en

comparación con *E. casseliflavus*, sin embargo con esta bacteria solo se realizó un experimento y se dio por perdida.

2.5.1.2 Ácidos grasos volátiles (AGV)

La producción total de AGV es menor en los tratamientos F-FR EC y GCA-FR EC debido a que solo se inoculó con EC aislada, por tanto la producción total de ácidos orgánicos es menor ($P \leq 0.05$) que en tratamientos mixtos inoculados en COC y FR para ambos tipos de medio (Cuadro 8). Según el análisis estadístico existe una interacción significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamiento e inóculo, por lo tanto, la producción de AGV está influenciada por el tipo de medio de cultivo y el tipo de inóculo. También se ha relacionado la producción de AGV con CH_4 , y debe mantenerse un balance fermentativo en todo momento, debido a que el CH_4 y el propionato funcionan como captadores del exceso de equivalentes reductores que se producen a nivel ruminal (Rodríguez y Llamas, 1990).

El acetato es el AGV de mayor interés. El acetato total producido por EC aislada fue 79.39 y 81.38 mMol en medios con F-FR EC y GCA-FR EC respectivamente, existiendo diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre ambos tratamientos; la producción de acetato en los medios con F-FR es menor comparado con GCA-FR, por lo que los medios de cultivo con GCA-FR producirán mayor cantidad de energía para un rumiante. Dentro del tratamiento F-FR el tratamiento de EC es menor y diferente estadísticamente ($P \leq 0.05$) del resto de los tratamientos.

Cuadro 8. Cantidad (mMol) de AGV, pH en medios de cultivo con F-FR y GCA-FR.

Tratamientos	Inóculo	AGV total (mMol)	Acetato (mMol)	Propionato (mMol)	Butirato (mMol)	pH
F-FR	EC	22.80 ^a	79.47 ^a	12.53 ^a	8.00 ^{ab}	7.46 ^a
	COC	68.08 ^b	85.64 ^b	8.39 ^b	5.97 ^c	9.09 ^b
	FR	67.66 ^b	84.95 ^b	9.28 ^c	5.78 ^c	9.04 ^b
GCA-FR	EC	27.08 ^a	81.38 ^c	11.17 ^d	7.45 ^b	7.22 ^a
	COC	43.11 ^c	71.70 ^d	19.69 ^e	8.61 ^a	7.24 ^a
	FR	48.68 ^d	66.08 ^e	25.96 ^f	7.96 ^{ab}	7.17 ^a
EEM	--	0.36	0.17	0.09	0.07	0.01
Valor P						
Tratamiento		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Inóculo		<0.001	<0.001	<0.001	0.0023	<0.001
Tratamiento*Inóculo		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,b,c,d,e,f} Medias con literales diferentes difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). pH inicial del medio de cultivo 7.17. F-FR = Medios con formato de sodio. GCA-FR = Medios con glucosa, celobiosa y almidón. EC = *Enterococcus caseliflavus*; COC = Cocultivo (bacterias acetogénicas + líquido ruminal; FR = Fluido ruminal. AGV = Ácido graso volátil. pH = Potencial de Hidrógeno. EEM = Error estándar de la media. *mM por 100 mL producidos.

Los medios de cultivo GCA-FR presentan diferencias estadísticas en los tres tratamientos ($P \leq 0.05$) en la cantidad de acetato producido, siendo mayor el inoculado con EC seguido del COC y el que presenta menor producción el FR. Bocazzi y Patterson (2013) a 72 horas de incubación en medio selectivo con 0.35 g de alfalfa como sustrato, obtuvieron 39 mMol de acetato con la bacteria *Acetobacterium woodii*, lo que indica que EC aislada produce mayor cantidad de este AGV. Pinder y Patterson (2012) obtuvieron entre 60 y 70 mMol de acetato en medios enriquecidos con 5.5 mMol de glucosa como sustrato a 90 horas de incubación a 37°C. La glucosa no aumenta la concentración de bacterias acetogénicas, aunque sirve como fuente de energía para su metabolismo (Pinder y Patterson, 2012). Miramontes *et al.* (2011) determinaron la producción de acetato utilizando como sustrato maíz, sorgo y alfalfa (100 mg de cada uno) en medios anaerobios inoculados con *Ruminococcus schinkii* en cultivo mixto con

hongos ruminales a 39 °C por 72 h obteniendo 56.8, 58.2 y 54.3 mMol respectivamente, valores similares a los obtenidos en esta investigación por EC.

Los AGV se producen por la fermentación de la materia orgánica, predominando acético, propiónico y butírico; y pequeñas cantidades de isobutírico, valérico, entre otros (Dijkstra, 1994); por tanto la proporción relativa de producción de AGV están influenciada por la composición y disponibilidad del sustrato, por la tasa de despolimerización y por las especies de bacterias presentes. Por ello dependiendo del tipo de sustrato utilizado será la proporción relativa de AGV.

El formato de sodio es un sustrato de rápida fermentación que es utilizado en la ruta de acetogénesis dando como producto final acetato (LeVan *et al.*, 1998) y también puede ser utilizado en la ruta de la metanogénesis para formar CH₄. El formato de sodio adicionado a bacterias ruminales lo convierten rápidamente en H₂ y CO₂ (Hungate *et al.*, 1970). El acetato y CH₄ se forman principalmente por H₂ y CO₂, aunque el primero también utiliza sustratos como: glucosa, celobiosa, fructosa, maltosa, manosa, arabinosa, ramnosa. *Acetivomaculum ruminis* produce acetato por dos vías utilizando diferentes sustratos; por la vía heterotrófica utiliza glucosa y ácido ferúlico, mientras que por la vía autotrófica utiliza formato, monóxido de carbono (CO), H₂ y CO₂ (Leedle *et al.*, 1988; Tricia *et al.*, 1998).

El propionato en los medios con F-FR EC disminuyó y es diferente estadísticamente (P≤0.05) respecto a COC y FR; al considerar los medios con GCA-FR EC el propionato fue menor comparado con F-FR EC. Los medios con GCA-FR presentaron diferencias estadísticas (P≤0.05) comparado con COC y FR. Una mayor producción de propionato

en el rumen se traduce en una mayor eficiencia energética y reducción en la pérdida de calor metabólico, disminución de aminoácidos (AA) para gluconeogénesis e incremento en la síntesis de proteína corporal (Arcos-García *et al.*, 2007) tal como sucede con los medios de cultivo GCA-FR, por lo tanto este tratamiento aumentaría la eficiencia del rumiante.

El butirato en los medios con F-FR EC es menor comparado con los medios con GCA-FR. El butirato dentro del mismo tratamiento es diferente ($P \leq 0.05$) de COC y FR. Los medios GCA-FR EC el propionato fue mayor, siendo diferente estadísticamente ($P \leq 0.05$) de COC y FR, aunque COC y FR no presentan diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$). Durante la absorción de AGV a través de pared ruminal, el butirato se absorbe a mayor velocidad que propionato, siendo el acetato el de más lento transporte sin sufrir cambios aparentes; mientras que el propionato se transforma en lactato y el butirato en cuerpos cetónicos (Arcos-García *et al.*, 2007).

2.5.1.3 Potencial de óxido-reducción (REDOX)

En cuanto al potencial redox, existe interacción significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamiento e inóculo, por lo tanto, esta variable está influenciada por el tipo de medio de cultivo y el tipo de inóculo. El redox es un indicador de la anaerobiosis (reducción del medio) siendo diferentes ($P \leq 0.05$) en los tratamientos con EC comparadas en COC y FR. El potencial redox mayor se presentó en los tratamientos en COC y FR, debido a la mayor interacción de bacterias totales ruminales. Un potencial redox positivo y de alta magnitud es indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de oxidación, y uno negativo y de baja magnitud es de un ambiente reductor, es por eso que el potencial redox afecta la actividad metabólica de los microorganismos. El potencial redox

negativo es el responsable de que los hidratos de carbono solo se descompongan hasta AGV y no hasta CO₂ y agua, de manera que la energía de los AGV queda disponible para el rumiante (Contreras y Noro, 2010). La digestión anaerobia es un proceso que requiere condiciones libres de oxígeno de manera estricta y va depender de la actividad coordinada de un grupo de microorganismos para transformar los sustratos en CH₄ y CO₂ principalmente (Appels *et al.*, 2008). Los microorganismos anaerobios degradan los sustratos en donde se encuentran cuando el potencial redox del ambiente esta entre -200 y -400 mV con la mínima cantidad de oxígeno, de lo contrario el potencial redox afecta la actividad anaerobia incluyendo la hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis (Gerardi, 2003; Domínguez, 2014).

2.5.1.4 Potencial de hidrógeno (pH)

El pH esta influenciado por el tratamiento e inóculo, presentando una interacción significativa ($P \leq 0.05$). El pH se basificó en los tratamientos F-FR COC y F-FR FR con valores de 9.09 y 9.04 respectivamente, siendo diferente estadísticamente ($P \leq 0.05$) del resto de tratamientos, los cuales se mantuvieron en un rango óptimo de crecimiento para bacterias acetogénicas en condiciones normales de animales sanos (6.8-7.2) (Rieu-Lesme *et al.*, 1998; Tricia *et al.*, 1998); por ejemplo *Acetitomaculum ruminis* y *Eubacterium limosum* se desarrollan en ese rango de pH. El pH en los medios con F-FR desde un inicio el promedio era de 7.26, lo que originó que el pH tendiera a basificarse. No se encontraron reportes que el pH sea alcalino en medios con formato de sodio, es por eso que se determinó la cantidad de amoniaco (NH₃).

En los rumiantes el pH se mantiene entre 5.5 y 7, dependiendo del tipo de alimentación y de la capacidad amortiguadora de carbonatos y fosfatos que existen en la saliva

(Yokoyama y Johnson, 1988); en el rumen cuando el pH aumenta (> a 7), la tasa de absorción de AGV disminuye como resultado del incremento en el flujo de salida de líquido ruminal hacia el omaso y no por las modificaciones de la capacidad de absorción (Bergman, 1990). Se ha observado que esta variación es baja para un pH superior a 7.0 porque la mayoría de los AGV se encuentran en forma disociada (Doreau *et al.*, 1997), por lo tanto la absorción es menor al 75% del total de AGV producidos (Bergman, 1990). La estabilización del pH depende en su mayoría de la capacidad de absorción de la mucosa del rumen para AGV, sin embargo, en un sistema *in vitro* (cerrado) el pH tiende a bajar debido a la concentración de ácidos orgánicos acumulados, tal como ocurre en el tratamiento GCA-FR FR. El pH cambia de acuerdo al tipo de fermentación que se lleve a cabo; por ejemplo, en sustratos con alto contenido de carbohidratos estructurales se incrementa la producción de hidrógeno que hace que el pH disminuya, lo mismo sucede si existen sustratos con alto contenido de carbohidratos solubles (Poulsen *et al.*, 2012). En contraparte, se ha observado en experimentos *in vitro* al tener un pH menor a 6.0 disminuye la producción de CH₄ y NH₃ (Lana *et al.*, 1998), situación que no se presentó en esta investigación debido a que el pH de los medios de cultivo es mayor, el cual oscila en un rango normal (6.8-7.2) para el crecimiento de microorganismos.

2.5.1.5 Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales está determinada por la interacción significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamiento e inóculo. La concentración de EC mantuvo su concentración en (10^8) en ambos tratamientos no presentando diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$). Sin embargo, en los tratamientos en COC y FR para ambos tipos de medio

de cultivo a 72 h de incubación a 39 °C tuvieron una concentración de 10^9 siendo diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$) en ambos tratamientos. La mayor concentración bacteriana se presentó a las 48 h de incubación a 39 °C. Estos resultados indican que la interacción de EC y el consorcio de bacterias ruminales no afectan negativamente la concentración total de bacterias, tal como lo reporta Rodríguez (2009). El objetivo de inocular bacterias de interés es para aumentar la población de las mismas y se tenga un efecto benéfico; en este caso el objetivo es buscar una bacteria ruminal acetogénica eficiente y al ser inoculada en cocultivo con bacterias ruminales aumente su población, para que al competir con las bacterias metanogénicas por los sustratos disminuyan la producción de CH_4 como GEI; sin embargo existe un mecanismo de comunicación entre bacterias dado por señales moleculares, denominado “quorum sensing” (QS). El sistema QS sirve para controlar la expresión de genes dependiendo de la densidad celular, y la información se utiliza para regular la expresión génica, que permite determinar el tamaño de la población bacteriana (Moghaddam *et al.*, 2014; Davis *et al.*, 2015), es por eso que es difícil modificar el ambiente natural de la concentración de bacterias de sistemas vivos como el rumen. Es decir, las mismas poblaciones se autoregulan para no modificar su ambiente y objetivo de producción. Por lo tanto, esto explica porque no se obtuvo una significativa disminución de CH_4 .

2.5.2 Medición de amoníaco (NH_3) en medios con formato de sodio

La concentración de NH_3 aumenta a medida que transcurre el tiempo de incubación en los medios con F-FR (Cuadro 9). En la hora inicial (0 h) la concentración de NH_3 es similar, sin embargo, a partir de las 48 h de incubación el NH_3 aumenta en los tratamientos en COC y FR. De acuerdo al análisis de regresión se observa que el pH

(Y) varía directamente con la concentración del NH_3 (X) ($P \leq 0.05$), por lo tanto los coeficientes de la ecuación de predicción pueden obtenerse ajustando un modelo que considere solo una variable, aunque solo explica el 57% (coeficiente de determinación) de la variabilidad del pH, de tal manera que a mayor concentración de NH_3 el pH aumenta, afectando las condiciones de fermentación, y el 43% restante ($1 - R^2$) no tiene explicación, pudiendo deberse a la variación aleatoria de los datos o que el modelo requiere de más variables para explicar la variación.

A la hora inicial (0 h) después de inocular, la concentración de NH_3 no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$). El pH comienza a alcalinizarse a partir de las 48 h de incubación en los medios con F- FR en COC y LR presentando diferencias ($P \leq 0.05$) marcadas para ambos tratamientos. A las 72 h los medios en COC y LR la alcalinización es mayor.

La concentración óptima de NH_3 en rumen, es aquella que resulta de la máxima tasa de fermentación o la máxima tasa de producción de proteína microbiana por unidad de sustrato fermentado (Mehrez *et al.*, 1977), en estudios realizados *in vitro*, se encontró que la concentración de NH_3 requerida para la máxima síntesis de proteína de origen microbiana por unidad de sustrato fermentado, es de 5 a 6 mg/dL en rumen, y en estudios *in vivo* se presentó una variación de 8.8 a 28.9 mg/dL de NH_3 en el líquido ruminal.

La concentración de nitrógeno amoniacal ruminal puede variar de 0.8 a 56.1 mg/dL de fluido ruminal, incrementándose con el porcentaje de proteína degradable. Con estos resultados se concluye que el NH_3 que se produjo en los medios con F-FR *in vitro* es

alta en comparación con los valores anteriormente mencionados debido a la cantidad de proteína microbiana, por ello es que el pH aumentó considerablemente siendo significativo ($P \leq 0.05$) y correlacionándose directamente.

Cuadro 9. Medición de NH_3 en medios con F-FR a 0, 24, 48 y 72 horas.

Tiempo h	Tratamiento	Amoniaco mg/dL	pH
0	F-FR EC	9.69	7.33
	F-FR COC	9.80	7.30
	F-FR FR	9.48	7.24
24	F-FR EC	10.81	7.21
	F-FR COC	24.57	7.29
	F-FR FR	26.33	7.22
48	F-FR EC	11.29	7.19
	F-FR COC	31.87	8.03
	F-FR FR	31.39	8.07
72	F-FR EC	10.91	7.33
	F-FR COC	41.51	8.77
	F-FR FR	32.70	8.87
	Blanco	--	7.26

EC = *Enterococcus casseliflavus*; COC = Cocultivo (bacterias acetogénicas + líquido ruminal); FR = Fluido ruminal.

El NH_3 es un producto metabólico del rumen resultado de la degradación microbiana de compuestos nitrogenados como proteínas, péptidos, aminoácidos y ácidos nucleicos (Duinkerken *et al.*, 2005; Abdoun *et al.*, 2006). Si los niveles de proteína degradable en el rumen son altos se absorben a través de la pared ruminal y son convertidos en urea por el hígado (Hof *et al.*, 1997; Duinkerken *et al.*, 2005). Un sistema de fermentación *in vitro* (cerrado), no permite simular la absorción a través de las paredes del rumen por lo

tanto se acumula. La acumulación de NH_3 incrementa los valores de pH (Yang *et al.*, 2014) en el rumen (afectando la absorción de Na y Cl en rumen; Abdoun *et al.*, 2006) y en sistemas de fermentación *in vitro* debido a la nitrificación (transformación del nitrógeno a nitratos (NO_3^- ; Kponblekau-A y Killorn, 1996). La nitrificación en el rumen produce problemas metabólicos como toxicidad. Microbiológicamente existen bacterias en el rumen que generan NH_3 , como el caso de *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminatum*, y *Megasphaera elsdenii* y otras que aún no han sido identificadas (Steven, 1998), por lo tanto este gas también se produce de manera natural en el rumen gracias al metabolismo de algunas especies bacterianas; incluso los protozoarios también proveen de NH_3 para la fermentación, pero su efecto es mínimo; aunque se ha observado que la función del NH_3 en el control del pH ruminal dependía fundamentalmente de la liberación de iones carbonato en el proceso de desaminación (Sauvant *et al.*, 1999).

2.6 Conclusiones

- Se comprobó que la bacteria *Enterococcus casseliflavus* sola y en cultivo puro no produce metano.
- Se logró disminuir la producción de CH_4 en porcentaje, sin presentar diferencias significativas.
- Se observó un aumento de 11.89 % de acetato en medios de cultivo con glucosa, celobiosa y almidón-fluido ruminal, no así en medios de cultivo con formato de sodio.
- Se recomienda evaluar si *Enterococcus casseliflavus* puede utilizarse como prebiótico e incluirse en la dieta de los rumiantes (*in vivo*).

2.7 Literatura citada

- Abdoun, K., K. Wolf, H. Martens. 2006. Interaction between ammonia, sodium and chloride transport across the rumen epithelium in sheep. *Small Ruminant Res.* 63: 91–99.
- Appels, L., J. Baeyens, J. Degréve, and R. Dewil. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progr. Energ. Combust.* 34: 755-781.
- Arcos-García, J. L., R. López-Pozos, H. A. Bernabé, J. Hoffman. 2007. La actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia y Tecnología* Vol. 11. No. 32: 51-62.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70: 567-590.
- Bocazzi, P., and J. A. Patterson. 2013. Isolation and Initial Characterization of Acetogenic Ruminal Bacteria Resistant to Acidic Conditions. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 3: 129-144.
- Bonilla, C. J. A., y Lemus F. C. 2012. Enteric methane emission by ruminants and its contribution to global climate change. *Review. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(2): 215-246.
- Breznak, J. A., and J. S. Blum. 1991. Mixotrophy in the termite gut acetogen, *Sporomusa termitida*. *Arch. Microbiol.* 156: 105-110.
- Breznak, J. A., and M. D. Kane. 1990. Microbial H₂/CO₂ acetogénesis in animal guts: nature and nutritional significance. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 309-314.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In: *Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp 151-161.
- Contreras, P. A., M. Noro. 2010. Rumen, morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3ra ed. Valdivia. America. 135 p.
- Davis, RM., Muller RY., Hayne KA. 2015. Can the natural diversity of quorum-sensing advance synthetic biology? *Bioengineering and Biotechnology* Vol. 3 Art 30: 1 – 10.
- Dijkstra, J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livest. Prod. Sci.* 39: 61-69.

- Domínguez, O. M. G. 2014. Caracterización fermentativa de biodigestores de cerdaza y aislamiento de una arqueobacteria metanogénica. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 90 p.
- Doreau, M, E. Ferchal, Y. Beckers. 1997. Effects of level the of intake and of available volatile fatty acids on absorptive capacity of sheep rumen. *Small Ruminant Research* 25: 99-105.
- Duinkerken, G. V. G, G. Andre, M. C. J. Smits, G. J. Monteny, and L. B. J. Sebek. Effect of Rumen-Degradable Protein Balance and Forage Type on Bulk Milk Urea Concentration and Emission of Ammonia from Dairy Cow Houses. *J. Dairy Sci.* 88: 1099–1112.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
- Gerardi, H. M. 2003. The microbiology of anaerobic digesters. A John Wiley and Sons, Inc., Publication, pp 177.
- Henderson, G, E. G. Naylor, S. C. Leahy, and P. H. Janssen. 2010. Presence of Novel, Potentially Homoacetogenic Bacteria in the Rumen as Determined by Analysis of Formyltetrahydrofolate Synthetase Sequences from Ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(7): 2058-2066.
- Hof, G., M. D. Vervoorn, P. J. Lenaers, and S. Tamminga. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 3333–3340.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York, N.Y. 533 pp.
- Hungate, R. E., 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press Inc., New York, USA, pp. 117–132.
- Hungate, R. E., W. Smith, T. Bauchop, I. Yu, J. C. Rabinowitz. 1970. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *J. Bacteriol.* 102 (2): 389 – 397.
- Joblin, K. N. 1999. Ruminant acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1307–1313.
- Johnson, K. A., and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483–2492.
- Kpombrekai, A. K., y R. Killorn. 1996. Nitrification of ammonium nitrogen in soils treated with XDE-474. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60: 1482-1489.
- Lana, R. P., J. B. Russell and M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76: 2190-2196.

- Lara, P. E., M. C. Canché, H. Magaña, E. Aguilar, J. R. Sanginés. 2009. Producción de gas in vitro y cinética de degradación de harina de forraje de morera (*Morus alba*) mezclada con maíz. *Rev. Cub. Ciencia Agrícola* 43(3): 273-279.
- Leedle, J. A. Z., and R. C. Greening. 1988. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 502–506.
- LeVan, T. D., J. A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle, and D. M. Schaefer. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and *Acetivomaculum ruminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3429-3436.
- López, S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 1-9.
- Mackie, R. I., B. A. White, and M. P. Bryant. 1992. Methanogenesis, Biochemistry. En: *Encyclopedia of Microbiology*. Lederberg, J. Ed. Academia Press, San Diego, p. 97.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4:3: 351-365.
- McAllister, T.A., E. K. Okine, W. G. Mathison, K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 231–243.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* Volume 17, Issue 2: 297-304.
- Mehrez, A. Z., E. R. Orskov, Y. Mcdonal. 1977 Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38: 437-443.
- Miramontes-Carrillo, J. M., R. M. Ramírez, A. J. Ibarra, A. F. J. Ibarra, V. J. M. Miramontes, A. P. B. Brizuela, y G. R. Lezama. 2011. Efecto del sustrato sobre la actividad acetogénica in vitro de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen. *Revista Biociencias* Vol. 1. Núm. 2 Año 2. Páginas: 28 a 41.
- Moghaddam, M. M., S. Khodi, A. Mirhosseini. 2014. Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbial* 3: 156. doi:10.4172/2327-5073.1000156.
- Nollet, L., D. Demeyer, and W. Verstraete. 1997. Effect of 2-Bromoethanesulfonic Acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 Addition on Stimulation of Reductive Acetogenesis in the Ruminal Ecosystem by Selective Inhibition of Methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol* 63: 194-200.

- Parameswaran, P., C. L. Torres, L. Hyung-Sool, B. E. Rittmann, R. Krajmalnik-Brown. 2010. Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): The role of homo-acetogenic bacteria. *Bioresource Technology*.
- Pinder, R. S., and J. A. Patterson. 2013. Growth of acetogenic bacteria in response to varying pH, acetate or carbohydrate concentration. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 3: 6-16.
- Poulsen, M., B. B. Jensen, R. M. Engberg. 2012. The effect of pectin, corn and wheat starch, inulin and pH on in vitro production of methane, short chain fatty acids and on the microbial community composition in rumen fluid. *Anaerobe* 18: 83-90.
- Ragsdale S. W. 2008. Enzymology of the Wood-Ljungdahl Pathway of acetogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125: 129-136.
- Ramírez, J.F., O. S. Posada, R. Noguera. 2014. Ruminal methanogenesis and mitigation strategies. ISSN 1900-9607. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Vol 9. No 2.
- Rieu-Lesme, F., C. Dauga, G. Fonty, and J. Dore. 1998. Isolation from the Rumen of a New Acetogenic Bacterium Phylogenetically Closely Related to *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 4: 89–94.
- Rodríguez, C. J. A. 2009. Aislamiento y caracterización in vitro de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 98 p.
- Rodríguez, G. F., L. G. Llamas. 1990 Digestibilidad, balance de nutrimentos y patrones de fermentación ruminal. In: R. A. Castellanos, L. G. Llamas y S. A. Shima, Eds. *Manual de técnicas de investigación en ruminología*. México, D.F. pp. 95-126.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sauvant, D., F. Meschy, D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA. Prod. Anim.* 12: 49-60.
- Shi, J. C., X. D. Liao, Y. B. Wu, and J. B. Liang. 2011. Effect on antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 457-463.
- Tricia, D., J. A. Robinson, J. Ralph, R. C. Greening, W. J. Smolenski, J. A. Z. Leedle, D.M. Schaefer. 1998. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and acetitomaculum ruminis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3429-3436.
- Wright, A. G., A. F. Toovey, C. L. Pimm. 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 12: 134-139.

- Yang, L. X. Wang, T. L. Funk. 2014. Strong influence of medium pH condition on gas-phase biofilter ammonia removal, nitrous oxide generation and microbial communities. *Bioresource Technology* 152: 74–79.
- Yokoyama, M. T. y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. In: El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (Ed.). Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.
- Zhou, Y. Y., H. L. Mao, F. Jiang, J. K. Wang, J. X. Liu, C. S. McSweeney. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 93–100.
- Zinder, S. H. 1992. Methanogenesis. En: *Encyclopedia of Microbiology*, Lederberg, J. Ed. Academic Press, San Diego 3, p. 81.

CAPITULO III. COMPARACION DE DOS BACTERIAS AISLADAS SOBRE LA PRODUCCION DE METANO EN COCULTIVOS CON BACTERIAS RUMINALES

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

3.1 Resumen

El objetivo de esta investigación fue aislar una bacteria ruminal en un medio de cultivo a base de acetato-formato fluido ruminal (AF-FR) y comparar su eficiencia vs *Enterococcus casseliflavus* (EC) para disminuir la producción de CH₄ *in vitro*. Se aisló una segunda bacteria ruminal Gram (+) en forma de coco, a una concentración de 3.4x10⁷ bacterias mL⁻¹. Se utilizaron tres tipos de medios de cultivo anaerobio a base de F-FR, GCA-FR y con pasto bermuda (*Cynodon dactylon*; B-FR) como sustrato. Los tratamientos fueron tres por cada medio de cultivo: 1) sola; 2) Co-cultivo (COC); y 3) fluido ruminal (FR). Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2x3x3, y las medias se compararon con la prueba de Tukey. Solo se presentó interacción medio-inóculo, logrando disminuir el CH₄ en 35.51% en medios con F-FR en COC, siendo diferente estadísticamente (P≤0.05) de inóculo con la bacteria sola y FR. En los medios con GCA-FR no disminuyó la cantidad de CH₄, mientras que los medios con B-FR se disminuyó solo el 9.02%. EC produjo mayor cantidad de acetato sin presentar diferencias significativas (P≤0.05) comparado con EN. Se concluyó que la bacteria EC es mejor que EN disminuyendo CH₄ y produciendo mayor cantidad de acetato.

Palabras clave: *Enterococcus casseliflavus*, metano, acetate.

COMPARISON OF TWO BACTERIA ISOLATED ON PRODUCTION OF METHANE IN COCULTURES WITH RUMINAL BACTERIA.

Iván Reyes Vázquez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

3.2 Abstract

The objective of this investigation was to isolate a ruminal bacteria in a culture medium based format acetate rumen fluid (AF-FR) and compare their efficiency vs *Enterococcus casseliflavus* (EC) to decrease *in vitro* production of CH₄. A second ruminal bacteria Gram (+) was isolated as coconut, at a concentration of 3.4x10⁷ mL⁻¹ bacteria. As substrate, three types of anaerobic growth media based F-FR, GCA-FR and bermudagrass (*Cynodon dactylon* FR-B) were used. Treatments were three for each medium: 1) alone; 2) Co-cultivation (COC); and 3) ruminal fluid (FR). The data were analyzed in a completely randomized design with a factorial arrangement of treatments 2x3x3, and the means were compared with Tukey's test. Only medium-inoculum interaction, appeared achieving lower CH₄ with 35.51% on average in F-FR COC, being statistically different (P≤0.05) inoculum on battery power alone and FR. Media with GCA-FR did not decrease the amount of CH₄, while the means B-FR only 9.02% was decreased. EC acetate produced more without significant differences (P≤0.05) compared with EN. It was concluded that the EC bacterium is better than EN decreasing CH₄ and producing more acetate.

Keywords: *Enterococcus casseliflavus*, methane, acetate.

3.3 Introducción

La creciente demanda de la población de rumiantes a nivel mundial para la alimentación humana, se refleja en el aumento constante de la producción de CH₄ como GEI, contribuyendo con el 18% a nivel mundial (Knapp *et al.*, 2014); resultando perjudicial por tener un potencial de impacto de 21 veces más que el CO₂ (IPCC, 2007; Liu *et al.*, 2011). La emisión de CH₄ por los rumiantes varía dependiendo de la ubicación geográfica (FAO, 2010), composición, calidad y cantidad de alimento consumido y raza del rumiante (Hook *et al.*, 2010). La alimentación constituye uno de los principales factores que regula la producción de CH₄ en rumiantes (Clark *et al.*, 2011). La producción de CH₄ en rumiantes está altamente relacionada con la degradación de la fibra (Kirchgessner *et al.*, 1995) y la calidad de los forrajes; además, en el último siglo las emisiones de este gas por parte de los rumiantes se han quintuplicado (Meale *et al.*, 2012).

La comparación por la producción de CH₄ entre forrajes nativos y mejorados (introducidos) principalmente en las zonas tropicales y subtropicales indican que los primeros producen mayor cantidad de CH₄ resultado de sus características de composición (Vargas *et al.*, 2012). Particularmente Australia, donde los consumos de fibra por parte de los rumiantes es mayor, produce 1 t de CH₄ por t de ganancia en peso vivo, por lo que buscan estrategias para mejorar la calidad del forraje, a través de la suplementación alternativa con leguminosas y arbustos que tengan el potencial de reducir las emisiones de CH₄ por kg de carne producido como resultado de una mayor digestibilidad (Meale *et al.*, 2012). El pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) es un pasto perenne distribuido en todo el mundo, particularmente de las regiones tropicales y

templadas; es una planta rica en metabolitos como proteínas, carbohidratos, minerales, flavonoides, carotenoides, alcaloides, glucósidos y triterpenoides (Ashokkumar *et al.*, 2013). Por lo tanto, debido a su composición química puede utilizarse como fuente de carbono para producción de gas *in vitro*.

El objetivo de este estudio es aislar una segunda bacteria ruminal con medio selectivo para bacterias acetogénicas y comparar su eficiencia para disminuir la producción de CH₄ vs *Enterococcus casseliflavus*, utilizando como como fuente de carbono formato de sodio (F-FR); una combinación de glucosa, celobiosa y almidón (GCA-FR) y el pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) teniendo como tratamientos la bacteria aislada sola, en cocutivo (COC) con bacterias ruminales y líquido ruminal fresco (FR).

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Elaboración de medios de cultivo para aislar una bacteria ruminal acetogénica

Los medios anaerobios selectivos para aislar una bacteria ruminal acetogénica (BRA) a base de acetato formato (AF-FR) se prepararon de acuerdo con la técnica que describe Hungate (1966) modificada por Bryant (1972) y recomendada por Cobos y Yocoyama (1995; Cuadro 10). Los medios de cultivo se prepararon con flujo constante de CO₂ para conservar anaerobiosis, y se incubaron por 48 h a 39 °C (incubadora Felisa FE-133A) para comprobar esterilidad. El proceso de esterilización de los medios de cultivo fue por 15 min en una autoclave Tuttnauer 2540F a 121 °C y 15 PSI. La solución vitamínica y antibiótica se adicionó al momento de utilizar los medios de cultivo para inocularlo debido a las características bioquímicas de dichas soluciones.

Cuadro 10. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para el aislamiento de una bacteria ruminal acetogénica (Cobos y Yocoyama, 1995).

Componente (100 mL)	AF-FR	AFA-FR
Agua destilada (mL)	48.5	48.5
Líquido ruminal clarificado ¹ (mL)	30.0	30.0
Solución mineral I ² (mL)	5.0	5.0
Solución mineral II ³ (mL)	5.0	5.0
Solución vitamínica ⁴ (mL)	1.0	1.0
Resazurina 0.1% ⁵ (mL)	0.1	0.1
Extracto de levadura (g)	0.2	0.2
Peptona de Soya (g)	0.1	0.1
Cisteína-sulfido ⁶ (mL)	2.0	2.0
Carbonato de sodio, sol. al 8% ⁷ (mL)	5.0	5.0
Acetato de sodio (g)	0.1	0.1
Formato de sodio (g)	1.0	1.0
Cloranfenicol ^{®8} (mL)	0.1	0.1
Agar (g)	--	2.0

¹ El líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, centrifugado a 23,000 xg (unidades de gravedad relativa) por 15 min y esterilizada a 12°C por 15 min a 15 PSI.

² Contiene (1000 mL) K₂HPO₄, 6 g.

³ Contiene (1000 mL) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl-2H₂O, 1.6g.

⁴ Contiene 100 mg de Clorhidrato de Tiamina; 100 mg de Clorhidrato de Piridoxina; 1000 mcg de Cianocobalamina en 100 mL de solución.

⁵ Contiene 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, se aforó a 100 mL.

⁶ Contiene 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH), más 2.5 g de Na₂S-9H₂O; se aforó a 100 mL con agua destilada.

⁷ Contiene 8 g de Na₂CO₃ por cada 100 mL de agua destilada.

⁸ Contiene 250 mg en 10 mL de solución.

3.4.2 Aislamiento y conservación de una bacteria ruminal aislada

En tubos de cultivo de 18x150 mm estériles, se adicionaron 9 mL de medio AF-FR estéril. El aislamiento se inició de líquido ruminal fresco (LRF) de un borrego Suffolk

fistulado. El LRF se filtró con manta de cielo, se centrifugó a $1,157 \times g$ 3 min^{-1} en una centrifuga Eppendorf 5810-R a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; el sobrenadante se tomó y se utilizó como inóculo A (inicial).

Los tubos de cultivo se inocularon con 1 mL inóculo inicial A por triplicado, se incubaron a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta presentar turbidez (48 h). El tubo con mayor turbidez se seleccionó y se usó como un inóculo nuevo en medios AF-FR. Después de presentar la turbidez, se tomó una muestra del medio de cultivo y fue observado en un microscopio de fases de contraste (Olympus BX51) para observar las morfologías bacterianas. El proceso se repitió hasta obtener un solo tipo morfológico bacteriano.

En tubos de cultivo de 18x150 mm estériles se adicionaron 9 mL de medio con base en acetato formato agar fluido ruminal (AFA-FR) estéril y se inclinó 15° (aproximadamente) hasta su solidificación, variante de la técnica de tubo rodado (Hungate, 1969). El medio AF-FR seleccionado con un solo tipo de morfología bacteriana se utilizó como inóculo, se usó un asa bacteriológica para inocular mediante la técnica de estriado, y el tubo se incubó a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h para obtener colonias de la nueva bacteria ruminal aislada. Las colonias de la bacteria ruminal aislada se caracterizaron morfológicamente. Un tubo con medio AF-FR se inoculó con una colonia de la bacteria aislada y se incubó $39 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h para utilizarlo como inóculo B en el proceso de conservación de la misma; se tomó una muestra para prueba de fluorescencia y Tinción Gram.

Para conservar la bacteria ruminal aislada, se vertieron 45 mL de medio AF-FR estéril en un vial serológico (100 mL) estéril. El vial se inoculó con 5 mL de inóculo B, se incubó por 48 h a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ y se observó en un microscopio de contraste de fases para

asegurar el aislamiento. El vial se dejó a temperatura ambiente 2 h, se congeló a -38 °C en un congelador de rodillo Freezer Labconco Shell por 50 min hasta alcanzar una temperatura de -38 °C, posteriormente se liofilizó en un equipo Labconco FreeZone 4.5 L a una temperatura de -45°C y una presión de -0.030 mBar por 24 h.

3.4.3 Identificación molecular de la nueva bacteria ruminal aislada

3.4.3.1 Rehidratación de la bacteria nueva aislada

La bacteria aislada se reactivó en medio AFA-FR agregando 0.2 g de glucosa por cada 100 mL de medio de cultivo. El medio se vertió en cajas Petri guardándose en jarras de anaerobiosis con un sobre de Gas Pack para evitar la oxidación. El sembrado de la bacteria se realizó en una campana de flujo laminar vertical mediante la técnica de estriado con una asa bacteriológica. Se incubaron a 39 °C por 96 h, posteriormente se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de hacer la extracción de DNA.

3.4.3.2 Extracción de DNA por método CTAB.

La extracción de DNA se hizo por el método de CTAB, tal como se describe a continuación de acuerdo a la técnica de Doyle y Doyle (1990).

3.4.3.3 Amplificación del DNAr 16 S

La amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S ribosomal se realizó usando Primer's universales para bacterias (8F y 1492R Promega®). Se hizo un mix con los siguientes componentes (Cuadro 11). Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas de acuerdo con las recomendaciones de los Primer's y se llevaron a cabo de la siguiente forma: 3 min a 95 °C de pre-desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C

por 2 min, 1 min a 59 °C de acoplamiento y 1.5 min a 72 °C de elongación, por último un ciclo más post-elongación de 5 min a 72 °C.

Cuadro 11. Mix de reactivos para PCR.

Componente	Unidades μL
Buffer	3.0
Dntps	0.6
Primer F8	0.18
Primer R1492	0.18
Taq polimerasa	0.18
Agua	7.86
DNA	3

De acuerdo al protocolo de PCR Promega®

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% para verificar la existencia del producto de PCR, con los siguientes componentes (Cuadro 12), dejándose solidificar a temperatura ambiente, se acomodó dentro de la cámara de electroforesis y se retiraron los peines. Se agregó buffer de corrida TAE 1X en la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel de agarosa. Se depositaron 3 μL de marcador molecular, y 3 μL de muestra de DNA mezclado con 1,5 μL de buffer de carga con una micropipeta, posteriormente se corrió a 110 V/90 min, al término se extrajo el gel de la cámara de electroforesis, se limpió el exceso de buffer y colocó dentro de un tras-iluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX para visualizar el producto de PCR.

3.4.3.4 Análisis de secuencia

La secuenciación del fragmento amplificado se realizó mediante un equipo 3130 GeneticAnalyzer. Las secuencias generadas se ensamblaron y editaron en el programa

BioEdit Sequence Alignment Editor V 7.1.3.0 generando una secuencia consenso. La secuencia de nucleótidos fue comparada con las secuencias del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Cuadro 12. Componentes del gel de agarosa al 1.5%.

Componente	Unidades por cada 200 mL
Agarosa	3.0 g
TAE 1x	200 mL
Red Gel	4 µL

De acuerdo al protocolo de PCR Promega®

3.4.4 Producción de gas *in vitro*

3.4.4.1 Rehidratación de las bacterias aisladas para producción de gas

Las bacterias aisladas se rehidrataron colocando 0.1 g de liofilizado en un vial serológico con 72 mL de medio de cultivo F-FR (Cuadro 13), se incubaron a 39 °C por 24 h. A las 24 h se obtuvo la concentración de bacterias por medio de una cámara Petroff-Hausser (área de 0.0025 mm² y profundidad de 0.02 mm) y un microscopio de contraste de fases. La concentración de bacterias se determinó con la fórmula:

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

Donde:

[B] = Concentración de bacterias por mL

\bar{X} = Media del conteo de bacterias

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

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

El contenido del vial sirvió como inóculo C para la prueba de producción de gas *in vitro*.

Cuadro 13. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para bacterias acetogénicas (Cobos y Yocoyama, 1995).

Componente (100 mL)	F-FR
Agua destilada (mL)	52.6
Líquido ruminal clarificado ¹ (mL)	30.0
Solución mineral I ² (mL)	5.0
Solución mineral II ³ (mL)	5.0
Resazurina 0.1% ⁴ (mL)	0.1
Extracto de levadura (g)	0.1
Peptona de Soya (g)	0.2
Cisteína-sulfido ⁵ (mL)	2.0
Carbonato de sodio, sol. al 8% ⁶ (mL)	5.0
Formato de sodio (g)	1.0

¹ El líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, centrifugado a 23,000 x g (unidades de gravedad relativa) por 15 min y esterilizada a 12°C por 15 min a 15 PSI.

² Contiene (1000 mL) K₂HPO₄, 6 g.

³ Contiene (1000 mL) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl₂·2H₂O, 1.6g.

⁴ Contiene 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, se aforó a 100 mL.

⁵ Contiene 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH), más 2.5 g de Na₂S·9H₂O; se aforó a 100 mL con agua destilada.

⁶ Contiene 8 g de Na₂CO₃ por cada 100 mL de agua destilada.

3.4.4.2 Medios de cultivo para producción de gas

Se realizaron medios de cultivo anaerobios de acuerdo con la técnica que describe Hungate (1966) modificada por Bryant (1972) y recomendada por Cobos y Yocoyama (1995; Cuadro 14). Los medios de cultivo se prepararon con flujo constante de CO₂ para conservar anaerobiosis, y se incubaron por 48 h a 39 °C (incubadora Felisa FE-133A) para comprobar esterilidad. El proceso de esterilización de los medios de cultivo fue por 15 min en una autoclave Tuttnauer 2540F a 121 °C y 15 PSI.

El pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) previamente molido a 1 mm (molino Willey) se secó por 48 h en una estufa Riossa[®] a 60 °C y se pesó en una balanza AND HR-60 a peso constante; posteriormente se agregó 1 g de pasto bermuda aproximadamente a un biodigestor y se esterilizó agregándoles 0.5 mL de agua destilada. El manejo del pasto bermuda se hizo en un desecador Pyrex[®] para mantener su peso constante. En viales serológicos de 100 mL estériles se adicionaron 45 mL de medios anaerobios F-FR, GCA-FR y B-FR estéril, mismos que se utilizaron como biodigestores. Los biodigestores fueron inoculados con 5 mL del inóculo C y se colocaron en baño María a 39 °C (Termo Scientific 2862).

Se utilizó el sistema de producción de gas descrito por Cobos y Yocoyama (1995) con trampa solución salina; que consistió en preparar una solución salina saturada con 380 g de NaCl L⁻¹ de agua destilada, se ajustó el pH a 2 y se agregaron 5 mL de naranja de metilo al 0.1% como indicador de acidez. La solución-salina se depositó en viales serológicos de 50 mL llenos (sin dejar espacio) y fueron sellados con tapones de hule y casquillos de aluminio. Los biodigestores y viales trampa se conectaron con mangueras

de Tygon® (2.38 mm Ø interno y 40 cm de longitud) con agujas hipodérmicas en los extremos.

Cuadro 14. Composición de los medios de cultivo anaerobios, para bacterias acetogénicas (Cobos y Yocoyama, 1995).

Componente (100 mL)	F-FR	GCA-FR	B-FR
Agua destilada (mL)	52.6	52.6	52.6
Líquido ruminal clarificado ¹ (mL)	30.0	30.0	30.0
Solución mineral I ² (mL)	5.0	5.0	5.0
Solución mineral II ³ (mL)	5.0	5.0	5.0
Resazurina 0.1% ⁴ (mL)	0.1	0.1	0.1
Extracto de levadura (g)	0.1	0.1	0.1
Peptona de Soya (g)	0.2	0.2	0.2
Cisteína-sulfido ⁵ (mL)	2.0	2.0	2.0
Carbonato de sodio, sol. al 8% ⁶ (mL)	5.0	5.0	5.0
Formato de sodio (g)	1.0	--	--
Glucosa	--	0.12	--
Celobiosa	--	0.12	--
Almidón	--	0.12	--
Pasto Bermuda (<i>Cynodon dactylon</i>) (g)	--	--	1.0

¹ El líquido ruminal fresco, se filtró con manta de cielo, centrifugado a 23,000 xg (unidades de gravedad relativa) por 15 min y esterilizada a 12°C por 15 min a 15 PSI.

² Contiene (1000 mL) K₂HPO₄, 6 g.

³ Contiene (1000 mL) KH₂PO₄, 6 g; (NH₄)₂SO₄, 6 g; NaCl, 12 g; MgSO₄, 2.45 g; CaCl₂·2H₂O, 1.6g.

⁴ Contiene 0.1 mL de solución (1%) en agua destilada, se aforó a 100 mL.

⁵ Contiene 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH), más 2.5 g de Na₂S·9H₂O; se aforó a 100 mL con agua destilada.

⁶ Contiene 8 g de Na₂CO₃ por cada 100 mL de agua destilada.

El vial trampa solución-salina se le insertó una aguja hipodérmica como válvula de salida; y se colocó de manera inversa en una probeta de 50 mL modificada que sirvió

como colector de la solución salina saturada desplazada por el gas producido durante la incubación a determinado tiempo. Se midió el desplazamiento del gas en los viales trampa solución-salina a 24, 48 y 72 h de incubación.

El CH₄ y CO₂ se tomó directamente del vial trampa solución-salina con una jeringa de 1 mL y aguja hipodérmica, en los tratamientos donde no existió desplazamiento se tomó la muestra directamente de los biodigestores. La concentración se determinó en un cromatógrafo de gases Claurus 500 Perkin Elmer y una columna PE 6'x1/8 ODSS: Porapak 080/100. Las condiciones fueron: temperatura de la rampa en el horno de inicio 28 °C min⁻¹, rampa 2.5 °C min⁻¹, temperatura final 35 °C; temperatura del inyector TCD 130 °C; volumen de inyección 0.3 mL de forma manual; flujo de gas acarreador (Helio) 23.5 mL min⁻¹ y tiempo de retención de CH₄ 0.73 min ± 0.05 y CO₂ 1.05 min ± 0.05.

Para medir AGV se adicionaron 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25% en viales Ependorff de 2 mL y se extrajo 1 mL de medio de los biodigestores inoculados a 72 horas de incubación, se guardaron bajo refrigeración (4 °C). Las muestras se centrifugaron a 18, 800 x g 10 min⁻¹ (Ilettich EBA21), el sobrenadante se depositó en viales para cromatografía (Perkin Elmer). La determinación de AGV fue de acuerdo a la técnica que describen Erwin *et al.*, (1961), y se usó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Modelo Claurus 500 con columna capilar Elite FFAP se utilizó para determinar los AGV. El gas acarreador fue hidrógeno con flujo 5.5 ml por minuto. Se inyectó 1 µl de muestra en modo automático, con temperatura de inyector y detector de 250 °C por minuto hasta una temperatura final de 140 °C. Se obtuvieron tres picos en un tiempo de

retención de 1.30, 1.60 y 2.15 min para acético, propiónico y butírico respectivamente, con un tiempo total de cada corrida de 5.05 minutos.

3.4.6 Concentración de bacterias totales, pH y potencial redox

La concentración de bacterias totales se determinó obteniendo 1 mL de medio de los biodigestores y se depositó en un tubo de cultivo 13x100 junto con 0.25 mL de formaldehído al 10%, se guardaron bajo refrigeración (4 °C) hasta realizar el conteo. La cuantificación de bacterias totales se hizo después de 72 h de incubación con una cámara Petroff-Hauser. El pH se midió directamente con un potenciómetro Orión modelo 720A+, calibrado a pH 4.0 y 7.0. El potencial de óxido-reducción se determinó con un potenciómetro Orión modelo 710A; ambas mediciones se realizaron al mismo tiempo del muestreo.

3.4.7 Digestibilidad *in vitro* de materia seca (MS)

Para determinar el porcentaje de degradación del tratamiento con pasto bermuda se utilizó el residuo de los viales serológicos se filtró con una bomba de vacío con papel Whatman No. 42. El cálculo del porcentaje de degradación de la MS (% DIVMS) se realizó con la fórmula:

$$\% \text{ DIVMS} = \frac{\text{g MS}_i - \text{g MS}_n}{\text{g MS}_i} \times 100$$

Donde:

% DIVMS = degradación de la materia seca *in vitro*.

g MS_i = g de materia seca inicial.

g MS_n = g de materia seca no degradada.

3.4.8 Tratamientos

Los tratamientos fueron tres por cada tipo de medio de cultivo (F-FR, GCA-FR y B-FR): 1) bacteria ruminal aislada (pura); 2) Co-cultivo (COC); 3) fluido ruminal (FR) con cinco repeticiones; y para cada bacteria ruminal aislada (*Enterococcus casseliflavus* (EC) y la nueva bacteria ruminal aislada). El inóculo D fue LRF que se extrajo de una vaca Jersey fistulada en rumen, se centrifugó a $1,157 \times g$ 3 min^{-1} (centrifuga Eppendorf 5810-R) y se mantuvo a $39 \text{ }^\circ\text{C}$, se preparó bajo flujo constante de CO_2 en una campana de flujo laminar vertical Labconco Class II Type A2. Se calculó la concentración de bacterias con cámara Petroff-Hauser y se igualó la concentración de bacterias a 10^8 bacterias mL^{-1} . La dilución del FR se hizo en medio con F-FR. Los biodigestores fueron inoculados con 5 mL de LRF, y el COC fue la combinación de ambos inóculos en 50% cada uno.

3.5 Diseño y análisis estadístico

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial $2 \times 3 \times 3$ considerando como factores: dos bacterias (*Enterococcus casseliflavus* (EC) y *Enterococcus* (EN)) x tres tipos de medio de cultivo (F-FR, GCA-FR y B-FR) x tres inóculos (bacteria sola (EC o EN), en cocultivo (COC), y líquido ruminal (FR)). Las medias se ajustaron por mínimos cuadrados usando el PROC LSMEANS de SAS (2011) y comparadas con la prueba de Tukey ajustada.

3.6 Resultados y discusión

3.6.1 Características de la nueva bacteria ruminal aislada

Una bacteria ruminal fue aislada en cultivo puro a base de AF-FR y conservada en liofilización a una concentración de 3.40×10^7 bacterias mL^{-1} a 48 h de incubación a una temperatura de 39 °C. La bacteria ruminal aislada, se trató de una bacteria Gram +, en forma de coco, pudiendo estar sola o formando pares de cocos (bicoco), en ocasiones llega a formar cadenas de hasta cuatro cocos, con resultado negativo a la prueba de fluorescencia. La colonia bacteriana en medio sólido es de superficie lisa, de consistencia suave, color crema brillante y de circunferencia irregular (Figura 8). De acuerdo con las características morfológicas y físico-químicas puede tratarse de la misma bacteria ruminal aislada inicialmente.

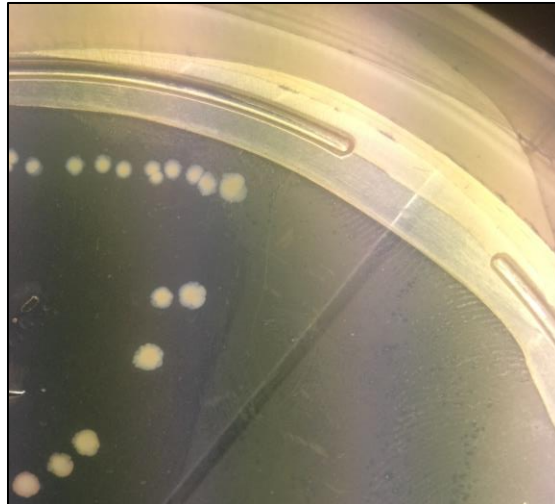


Figura 8. *Enterococcus spp.* aislado en caja Petri con medio sólido (AFA-FR).

3.6.2 Identificación molecular de la bacteria ruminal aislada

3.6.2.1 Concentración de DNA extraído

La rehidratación del liofilizado de la bacteria ruminal aislada conservó las características originales del aislamiento, manteniendo la concentración y morfología de las bacterias (cocos). No se encontró contaminada. Los resultados de la extracción de DNA de la nueva bacteria ruminal aislada se muestran en el Cuadro 15:

Cuadro 15. Concentración de DNA extraído de la bacteria aislada.

Muestras	Concentración ng/μl	260/280	260/230
1	224.1	2.12	2.24
2	103.1	2.07	2.03

Resultados obtenidos del Nanodrop 2000c Thermo USA.

El producto de la extracción de DNA fue utilizado para la amplificación del gen ADNr 16S mediante PCR. Derivado de la amplificación de la PCR y de la secuenciación del gen ADNr 16S se obtuvieron 970 pb. La secuencia obtenida se comparó con las secuencias guardadas en el GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia de la bacteria ruminal aislada y consultada en GenBank solo coincidió en el género *Enterococcus* (EN), sin llegar a especie (Figura 9).

Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* son Gram (+), en forma de cocos, pueden presentar solos o en pares, hasta formar cadenas cortas y no forman esporas, son homofermentativos y su producto principal de fermentación es ácido láctico. El crecimiento óptimo para este tipo de bacterias se da de 35 a 37 °C, aunque algunas especies pueden soportar desde 10 °C hasta 45 °C. Muchas especies de *Enterococcus*

forman parte de la flora intestinal de mamíferos, aves y otros animales (Manual® Bergey's of Systematic bacteriology, 2009).

```
CCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATGTTCTTCGCATGAAGGATATTTGAAA
GGCGCTTTTTCGCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGA
TGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTC
TGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT
CTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTG
CCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATC
TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCACGCCGCGGTGAA
```

Figura 9. Secuencia de nucleótidos obtenidos de la secuenciación de la bacteria ruminal aislada.

Las bacterias del género *Enterococcus* presentan las características mencionadas anteriormente, sin embargo, por el género puede tratarse de la misma bacteria aislada inicialmente, la cual fue identificada como *Enterococcus casseliflavus* (EC). Las bacterias del género *Enterococcus* junto con otros géneros de las bacterias ácido lácticas, pertenecen a la subdivisión clostridial de las eubacterias Gram (+); los *Enterococcus*, junto con los géneros *Melissococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*, pertenecen a la familia *Enterococcaceae* (Franz *et al.*, 2003).

3.6.3 Variables de producción de gas *in vitro*

La prueba se dio por terminada a las 72 h de incubación a 39 °C. El desplazamiento de las trampas de solución salina saturada se presentó en todos los tratamientos, variando

en diferentes cantidades de acuerdo al grado de fermentación de cada uno. El patrón de fermentación ruminal esta influenciado por la interacción entre la dieta, la población de microorganismos y el animal; en un sistema *in vitro* tiene los mismos componentes que son sustrato, inóculo y las condiciones que se le dan para que la fermentación se lleve a cabo en condiciones semejantes, sin embargo la importancia relativa de estos procesos varia de acuerdo con las características del alimento (sustrato), es por ello que es diferente la producción de moles de gas producidos en cada variable (Arcos-García *et al.*, 2007). La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los sustratos, pueden ser carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce AGV, succinato, formato, lactato, etanol, CO₂, CH₄, y trazas de H₂; sin embargo, estos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Posada y Noguera, 2005) tal como ocurre con los tratamientos en este experimento. En el caso de los forrajes como sustrato el tamaño de la partícula que va desde 0.1 a 1.0 g influye en la cinética de fermentación, porque con el aumento del tamaño de partícula se produce una disminución en la producción de gas por cada gramo de materia seca (MS) debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato (Getachew *et al.*, 1998), en este caso no se ve afectada la producción de gas por esta situación, porque el forraje de todos los tratamientos se molió al mismo tamaño de partícula.

3.6.3.1 Metano (CH₄)

La producción de CH₄ *in vitro* disminuyó en porcentaje en COC para ambas bacterias (EC y EN) en medios de cultivo F-FR y B-FR. La producción de CH₄ en medios GCA-FR no disminuyó en COC tal como se presentó en el capítulo anterior. De acuerdo al

modelo estadístico utilizado para el análisis de datos, no se presentó interacción entre tipo de bacteria - medio de cultivo - inóculo ($P \leq 0.05$) para las variables CH_4 y CO_2 .

Cuadro 16. Comparación de las bacterias EC y EN sobre la producción de CH_4 y CO_2 .

Bacteria	Medio	Inóculo	CH_4	CO_2
EC	F-FR	EC	0.00 ^e	100.00 ^a
	F-FR	COC	13.36 ^{cd}	86.64 ^{cb}
	F-FR	LR	27.57 ^a	72.44 ^e
	GCA	EC	0.00 ^e	100.0 ^a
	GCA	COC	13.67 ^{cd}	86.34 ^{cb}
	GCA	LR	12.30 ^{cd}	87.70 ^{cb}
	B-FR	EC	0.00 ^e	100.0 ^a
	B-FR	COC	15.17 ^{bcd}	84.84 ^{cbd}
	B-FR	LR	17.78 ^{bc}	82.22 ^{cd}
EN	F-FR	EN	0.00 ^e	100.0 ^a
	F-FR	COC	21.85 ^{ba}	78.16 ^{ed}
	F-FR	LR	27.07 ^a	72.96 ^e
	GCA	EN	0.00 ^e	100.0 ^a
	GCA	COC	12.04 ^{cd}	87.96 ^{bc}
	GCA	LR	9.90 ^d	90.10 ^b
	B-FR	EN	0.00 ^e	100.0 ^a
	B-FR	COC	12.86 ^{cd}	87.12 ^{cb}
	B-FR	LR	13.03 ^{cd}	86.96 ^{cb}
EEM	--	--	0.18	0.18
Valor P				
	Bacteria		0.6365	0.6323
	Medio		<.0001	<.0001
	Bacteria*Medio		0.0130	0.0133
	Inóculo		<.0001	<.0001
	Bacteria*Inóculo		0.0678	0.0679
	Medio*Inóculo		<.0001	<.0001
	Bacteria*Medio*Inóculo		0.0787	0.0797

a, b, c d, e Medias en con distinta literal son diferentes ($P \leq 0.05$). F-FR = Medios con formato de sodio. GCA-FR = Medios con glucosa, celobiosa y almidón. B-FR = Medios con pasto bermuda. EC = *Enterococcus casseliflavus*. EN = Enterococcus. EE = Error estándar de la media.

El tipo de bacteria no generó interacción con el tipo de inóculo ($P \leq 0.05$) para CH_4 y CO_2 ; sin embargo, el tipo de bacteria interactúa con el tipo de medio de cultivo ($P \leq 0.05$) y el inóculo interactúa con el medio de cultivo ($P \leq 0.05$) para CH_4 y CO_2 (Cuadro 16). Los datos se analizaron por las interacciones que presentaron significancia, pero se pondrá más énfasis a la interacción medio - inóculo, porque el tipo de bacteria inoculada no afectó el comportamiento de los tratamientos ($P \leq 0.05$) que resulta de mayor interés en la presente investigación.

Aunque el medio F-FR es donde se presentó la mayor producción de CH_4 , el comportamiento del tipo de bacteria se comporta diferente. La bacteria EN produce la mayor cantidad de CH_4 en el medio F-FR (16.31 %) y es diferente a los medios GCA-FR y B-FR ($P \leq 0.05$). En contraste, aún y cuando la mayor producción de CH_4 en medio F-FR se da por EN en los medios GCA-FR y B-FR EN se produce la mayor cantidad de CH_4 . Cabe señalar, que en ambos tipos de bacteria, la producción de CH_4 no presentó diferencias entre los medios GCA-FR y B-FR ($P \leq 0.05$; Cuadro 16).

En la interacción medio – inóculo para la bacteria EC (Cuadro 16) la producción de CH_4 se redujo con la adición de las bacterias aisladas al LR en los medios F-FR ($P \leq 0.05$), ya que el LR produjeron 27.57% de CH_4 , mientras en COC se cuantificó 13.36%. En porcentaje se logró disminuir la producción de CH_4 en 48.46%. En contraste, no se presentó efecto reductivo en la adición de la bacteria aislada en los medios GCA-FR al comparar el tratamiento en COC con LR, siendo no diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$). Los medios B-FR la disminución de CH_4 es menor, sin embargo la producción de este GEI se reduce en 9.02%, sin presentar diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) al

comparar con LR. En el tratamiento de la bacteria EN, ningún tratamiento presenta diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Hasta ahora, no se han reportado investigaciones que indiquen que las bacterias del género *Enterococcus* y específicamente la especie *E. caseliflavus* disminuyan la producción de CH_4 en cocultivo con bacterias ruminales. Al comparar dos bacterias para disminuir la producción de CH_4 se ha presentado una variabilidad de resultados sobre los tratamientos utilizados, esto es consecuencia de los nutrientes o sustratos que componen cada medio de cultivo. Johnson y Johnson (1995) indican que los dos principales factores responsables de las variaciones en la producción de CH_4 son: la cantidad de carbohidratos fermentados, lo cual implica diversas interacciones dieta-animal, que afectan el balance entre las tasas de fermentación de estos carbohidratos y la tasa de AGV producidos, la cual regula la producción de hidrógeno y subsecuentemente la producción de CH_4 .

Anteriormente se afirmó que el formato de sodio es un sustrato que puede ser utilizado por las bacterias acetogénicas para la producción de acetato y también por las bacterias metanogénicas para producir CH_4 funcionando como un estimulador inmediato de la metanogénesis, y que la competencia por el sustrato se da por la interacción de las bacterias; sin embargo, en este caso no se favorece la producción de productos finales de fermentación (acetato y CH_4) y el resultado se da por la interacción de las bacterias inoculadas. Se utilizó formato de sodio como sustrato, porque se ha demostrado que es un intermediario en la fermentación ruminal produciéndose en el rumen de manera natural principalmente por bacterias celulolíticas, hongos y

protozoarios ciliados (Ellis *et al.*, 1990), por ello se utilizó en cocultivo con bacterias ruminales.

Por otro lado, la combinación de sustratos utilizados a base de glucosa, celobiosa y almidón, aceleran la producción de H₂. El H₂, es un sustrato utilizado por las bacterias metanogénicas para producción de CH₄ (Ellis *et al.*, 1990), por lo tanto el H₂ y el formato de sodio son los principales sustratos formadores de CH₄ en rumen, con esto de alguna forma se esta proporcionando sustrato para producir CH₄ y así evaluar si las bacterias aisladas tienen efecto significativo sobre la disminución de CH₄ como GEI.

Para el caso del tratamiento utilizando como sustrato el pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) el comportamiento es diferente en comparación con los sustratos anteriormente mencionados. Generalmente, el tipo de carbohidrato presente en el forraje determina la producción de CH₄, sin importar los cambios que se presenten en la población bacteriana a nivel ruminal (Johnson y Johnson, 1995); por ejemplo el alto contenido de carbohidratos solubles en forrajes promueve la producción de propionato en rumen, lo que trae como consecuencia que el pH disminuya haciendo que se inhiba el crecimiento de bacterias metanogénicas y reduciendo así, la producción de CH₄ por unidad de materia orgánica fermentada (Meale *et al.*, 2012).

La producción de CH₄ en los bovinos representa pérdidas de energía potencial consumida en la dieta entre 5.5 - 6.5 %; sin embargo, en condiciones de pastoreo en zonas templadas se dice que hay pérdidas de 2-12%, pero cuando la alimentación es con forrajes de baja calidad nutritiva, la producción de CH₄ puede representar una pérdida entre el 15 y el 18% de la energía digestible (Carmona *et al.*, 2005). Se han

realizado investigaciones tratando de disminuir la producción de CH₄ alimentados con dietas a base de forrajes o agregando cierto porcentaje de forraje a la dieta, tal como lo reportan Delgado *et al.* (2013), que lograron disminuir la producción de CH₄ en 15.6% al incluir en la dieta la tercera parte de *Leucaena leucocephala* sin afectar la digestibilidad, tal como sucede en esta investigación, sin embargo la cantidad de CH₄ disminuida no es significativa. Se ha encontrado que existe una correlación negativa sobre la producción de CH₄ y la proteína cruda (PC), por lo tanto, el seleccionar forrajes con mayor contenido de PC ayudará a contrarrestar la producción de CH₄ (Gemedá y Hassen, 2014) en la producción animal.

Gagen *et al.* (2014) aislaron una nueva bacteria ruminal acetogénica de un marsupial Australiano identificada como TWA4 el cual no disminuye la producción de CH₄ y tampoco favorece la producción de acetato *in vitro* (Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha sugerido que la producción de CH₄ estimula una mayor producción de acetato, CO₂, H⁺, con esto se ve disminuida la producción de ácido láctico, succinato, propionato, etanol y formato (Contreras y Noro, 2010). Además, también se sabe que las bacterias metanogénicas son más eficientes sobre la utilización de sustratos y que existen bacterias acetogénicas que no necesariamente disminuyen la producción de CH₄ (Nollet *et al.*, 1997).

3.6.3.2 Ácidos grasos volátiles (AGV)

El Cuadro 17 muestra los efectos de interacción de la bacteria – medio – inóculo para las variables AGV totales, ácido acético, propiónico, butírico, incluyendo el % de degradación *in vitro* en medio de cultivo B-FR. EN presentó mayor producción de AGV totales en los medios/inóculo: B-FR COC (238.14mMol), mientras que EC lo produjo en

B-FR LR (167.43 mMol) siendo diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$). EC sola produjo mayor cantidad de acetato con F-FR COC (78.36 mMol), mientras que la EN presentó la mayor producción de acetato en GCA-FR (71.84 mMol) sin presentar diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$). Por su parte, los inóculos de las dos bacterias solas, que produjo mayor cantidad de acetato fue B-FR EC (75.74 mMol) y GCA-FR EN (71.84 mMol) siendo iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$). Las altas producciones de AGV totales están relacionados con una mayor fermentación, lo cual tiene un efecto positivo sobre una mayor disponibilidad de energía sobre el rumiante (Juárez-Reyes *et al.*, 2009).

El propionato se produjo en mayor cantidad con EN en GCA-FR COC (38.90 mMol), en tanto que la EC lo hizo en GCA-FR LR (38.38 mMol) no presentando diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$). Por su parte, el butirato se produjo en mayor cantidad por EN en F-FR COC (17.22 mMol), mientras que EC lo hizo en B-FR LR (11.00 mMol). Cuando se proporcionan altas cantidades de sustratos fácilmente digestibles para los microorganismos se incrementa la producción de ácido propiónico y butírico (Juárez-Reyes *et al.*, 2009), tal como sucede en los medios con GCA-FR y B-FR. Butirato y propionato son dos intermediarios importantes en la mineralización de la materia orgánica en condiciones metanogénicas (Dong y Stams, 1995). Las bacterias acetogénicas oxidan butirato y propionato para formar acetato, H_2 y formato de sodio (Dong y Stams, 1995).

Por su parte, la inclusión de alimentos ricos en almidón, favorece la producción de propionato y reduce el pH ruminal, por lo tanto se inhibe el crecimiento de metanógenos y protozoos (Boadi *et al.*, 2004). Cuando los rumiantes son alimentados con dietas rica en forrajes la producción de propionato se reduce tal como sucede en

los tratamientos B-FR; además el propionato no está asociada a formación de lactato como producto intermediario (Contreras y Noro, 2010).

Cuadro 17. Producción de AGV y degradación interacción de la bacteria – medio – inóculo.

Bacteria	Medio	Inóculo	AGV				Degradación %
			Total (mMol)	Acético*	Propiónico*	Butírico*	
EC	F-FR	EC	39.60 ^g	71.52 ^{ba}	17.80 ^{gf}	10.66 ^{bc}	--
	F-FR	COC	77.06 ^{edf}	78.36 ^a	12.90 ^g	8.74 ^c	--
	F-FR	LR	73.38 ^{edf}	77.28 ^a	13.62 ^g	9.14 ^c	--
	GCA	EC	40.02 ^g	72.48 ^{ba}	17.26 ^{gf}	10.22 ^{bc}	--
	GCA	COC	89.40 ^{ed}	54.14 ^d	36.18 ^{bac}	9.68 ^c	--
	GCA	LR	98.00 ^d	51.36 ^d	38.38 ^{ba}	10.28 ^{bc}	--
	B-FR	EC	49.10 ^{gf}	75.74 ^{ba}	15.20 ^g	9.06 ^c	21.95 ^c
	B-FR	COC	137.30 ^c	58.92 ^{dc}	30.62 ^{edc}	10.52 ^{bc}	60.78 ^a
	B-FR	LR	167.43 ^b	57.60 ^{dc}	31.40 ^{ebdac}	11.00 ^{bc}	54.49 ^b
	F-FR	EN	51.76 ^{gf}	70.86 ^{ba}	18.84 ^{gf}	10.34 ^{bc}	--
EN	F-FR	COC	68.98 ^{ef}	57.90 ^{dc}	24.88 ^{edf}	17.22 ^a	--
	F-FR	LR	90.66 ^{ed}	65.70 ^{bc}	20.12 ^{gf}	14.20 ^{ba}	--
	GCA	EN	68.82 ^{ef}	71.84 ^{ba}	17.42 ^{gf}	10.72 ^{bc}	--
	GCA	COC	129.80 ^c	50.70 ^d	38.90 ^a	10.44 ^{bc}	--
	GCA	LR	134.02 ^c	54.12 ^d	36.50 ^{bac}	9.40 ^c	--
	B-FR	EN	98.40 ^d	67.92 ^{bac}	23.76 ^{ef}	8.32 ^c	16.73 ^d
	B-FR	COC	238.14 ^a	56.72 ^{dc}	31.96 ^{bdac}	11.32 ^{bc}	52.69 ^b
	B-FR	LR	131.98 ^c	59.00 ^{dc}	30.94 ^{ebdc}	10.04 ^c	54.48 ^b
EEM	--	--	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Valor P				
Bacteria			<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	<.0001
Medio			<.0001	<.0001	0.0004	<.0001	<.0001
Inóculo			<.0001	<.0001	0.0088	<.0001	<.0001
Bacteria*Medio*Inóc			<.0001	0.0017	0.0017	0.0010	<.0001

a, b, c, d, e, f Medias en con distinta literal son diferentes ($P \leq 0.05$). EC = *Enterococcus casseliflavus*. EN = Enterococcus. F-FR = Medios con formato de sodio. GCA-FR = Medios con glucosa, celobiosa y almidón. B-FR = Medios con pasto bermuda. EC = Inóculo bacteria sola. COC = Inóculo en Cocultivo. LR = Inóculo Líquido ruminal. *mM por 100 mL producidos.

Por otro lado, las dietas con alta cantidad de forraje, el patrón de AGV en la fermentación ruminal fluctúa entre 65:25:10 a 70:20:10 (acetato: propionato: butirato, en porcentaje molar) tal como se presentan los resultados en esta investigación, por

otra parte cuando la cantidad de concentrado en la ración se eleva por encima de 70%, las proporciones de AGV varían entre 45:40:15 a 50:40:10 (Shimada 1991).

Según Russel (1998) y Lila *et al.* (2005) afirman que la producción de CH₄ se asocia con la relación acético:propiónico producido en rumen. A mayor producción de CH₄ mayor es el valor de la relación acético:propiónico (González *et al.*, 2012; Cuadro 17), de acuerdo con esta aseveración, se produce mayor cantidad de CH₄ en los medios con F-FR para ambas bacterias. Si la relación acético:propiónico llega a 0.5 la pérdida energética es mínima, pero si todos los carbohidratos fueran fermentados a ácido acético y no se produjera propionato las pérdidas podrían llegar hasta 33%. La relación acético:propiónico puede variar entre 0.9 y 4.0, por lo tanto las pérdidas por CH₄ varían ampliamente (Carmona *et al.*, 2005). La relación acético:propiónico promedio medio/inóculo se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 18. Relacion de acético/propionico de cada bacteria en la interacción medio – inóculo.

Bacteria	Medio/ Inóculo	Relación Acet/Prop.
EC	F-FR	5.2
	GCA-FR	2.3
	B-FR	2.9
EN	F-FR	3.1
	GCA-FR	2.3
	B-FR	2.1

Calculados a partir de las concentraciones de AGV. EC = *Enterococcus casseliflavus*. EN = *Enterococcus*. F-FR = Medios con formato de sodio. GCA-FR = Medios con glucosa, celobiosa y almidón. B-FR = Medios con pasto bermuda. Acet = Acético. Prop = Propiónico.

La producción de AGV se da por la flora del rumen, pero la tasa de producción varía a lo largo del día, pudiendo estar influenciada por la naturaleza de los patrones de la dieta y la alimentación de los animales (Seymour *et al.*, 2005). El acetato y butirato promueven la producción de CH₄, la producción de propionato puede considerarse como una ruta que compite por el uso de hidrógeno en el rumen (Knapp *et al.*, 2014), y hasta donde se sabe la producción de gas (CH₄ y CO₂) se da cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato, porque la fermentación del sustrato hasta propionato produce solamente gas desde la neutralización del ácido, por lo tanto una menor producción de gas se asocia con la fermentación propiónica (Getachew *et al.*, 1998).

3.6.3.3 Degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS)

La degradación *in vitro* de MS del pasto bermuda fue mayor por EC en COC (60.78%), por su parte EN presentó su mayor degradación en B-FR LR (54.48%) siendo diferentes estadísticamente ($P \leq 0.05$). Ambas bacterias en inóculo solo presentaron las degradaciones más bajas en comparación con el resto de los tratamientos, aunque fue ligeramente mayor la degradación de la EC y diferente de EN ($P \leq 0.05$). Altas tasas de degradación indican una elevada disponibilidad de nutrientes para los microorganismos ruminales, mientras que los valores bajos pueden ser el resultado de mayores cantidades de fibra de detergente neutro (FDN), cuyos componentes químicos pueden reducir la velocidad de fermentación de los sustratos (Juárez-Reyes *et al.*, 2009); sin embargo, en esta prueba los medios de cultivo de cada tratamiento tenían la misma cantidad de componentes (nutrientes) disponibles para los microorganismos ruminales inoculados, por lo tanto, esto indica que la población y el tipo de bacterias presentes

influyen sobre la DIVMS. El tratamiento de EC sola presentó la degradación mínima, porque no hay presencia de microorganismos celulolíticos, no así con los tratamientos en FR y COC. Por otro lado, se ha discutido que la degradación *in vitro* de los forrajes también puede estar afectada por la disminución del pH (Farenzena *et al.*, 2014), sin embargo, el uso de dietas altas en fibra el pH del fluido ruminal aumenta, al igual que el ácido acético y la relación acético:propiónico es mayor, pero se ve disminuida la concentración de NH_3 , la concentración de ácido propiónico y ácido butírico (Renhua *et al.*, 2013); además, aumenta la cantidad de CH_4 producido por unidad de forraje digerido (Robertson y Waghorn, 2002). La producción de CH_4 tiene una correlación negativa con el contenido de proteína cruda de los forrajes (Gemeda y Hassen, 2014). Aunque tampoco se puede inhibir por completo la metanogénesis, tal como lo reporta Russell y Jeraci (1984); se ha comprobado que la inhibición de la metanogénesis mediante la utilización de monóxido de carbono disminuyó la digestibilidad de la hemicelulosa y la celulosa en un 40 % y 27 % respectivamente, esto afecta completamente los índices de digestibilidad, e indica que las bacterias celulolíticas no pueden alterar fácilmente su metabolismo, generar más productos reducidos o adaptarse a la disminución en la transferencia de interespecies de H_2 cuando la comunidad de organismos consumidores del mismo es inhibida (Ramírez *et al.*, 2014), por lo tanto, cualquier método para suprimir la producción de CH_4 en el rumen debe estar acompañado por un método para convertir el H_2 producido en otro producto de fermentación porque la acumulación de H_2 podría detener la degradación ruminal.

3.6.3.4 Potencial de hidrogeno (pH).

El tipo de bacteria – medio – inóculo presentó interacción para las variables pH, potencial redox y la concentración de bacterias totales (Cuadro 19). Los pH más altos se presentaron en los medios con F-FR (> a 7.18), mientras que los pH en rango de 6.42 – 6.68 predominaron principalmente en los medios con GCA-FR; en contraste, los pH ácidos de 5.90 – 5.98 se produjeron con el medio B-FR. En todos los medios existe interacción de los tres factores, por lo tanto las variables pH, potencial de oxidoreducción (redox) y concentración de bacterias totales está influenciado por el tipo de bacteria inoculado, tipo de medio y tratamiento utilizado. El pH ruminal de animales alimentados a base de forrajes oscila entre 6.2 – 6.8, y predomina materia orgánica celulolítica, tal como ocurre en todos los tratamientos B-FR. Si el pH disminuye, aumenta la presencia de amilolíticos, y predominan los lactobacilos cuando el pH es menor de 5.5 (Contreras y Noro, 2010) situación que no se presenta en ningún tratamiento.

El pH fisiológico oscila entre 5.5 a 7.0 y tal como se ha explicado, va a variar de acuerdo con el tipo de sustrato que se fermenta en rumen. Cuando ocurren cambios bruscos en la dieta de los rumiantes y disminuye el pH tiende a disminuir la población de protozoarios (Contreras y Noro, 2010). Calsamiglia *et al.*, (2009) encontraron una correlación entre el pH y las dietas, donde la inclusión de altos porcentajes de concentrados (hasta 40 %) disminuyó el pH y aumentó la producción de ácido propiónico, lo cual conduce a la disminución en la producción de CH₄ en los rumiantes. La cantidad de H⁺ producido va a depender del tipo de dieta y el tipo de

microorganismo que fermente dicho nutriente, lo cual determinará también la eficiencia del alimento debido a la producción de CH₄ y tipos de AGV producidos.

Cuadro 19. Valores de pH, redox y concentración de bacterias de los tratamientos.

Bacteria	Medio	Inóculo	pH	Redox	Bacterias 10 ⁹
EC	F-FR	EC	6.58 ^{dce}	-177.4 ^f	3.80 ^g
	F-FR	COC	7.18 ^b	-354.2 ^{ba}	3.10 ^g
	F-FR	LR	7.32 ^{ba}	-352.3 ^{bc}	7.70 ^{dc}
	GCA	EC	6.44 ^{fe}	-140.8 ^h	6.32 ^{fe}
	GCA	COC	6.52 ^{dfe}	-332.8 ^{cd}	6.72 ^{de}
	GCA	LR	6.60 ^{dc}	-342.6 ^{bcd}	5.00 ^g
	B-FR	EC	6.56 ^{dfce}	-168.4 ^{gf}	3.80 ^g
	B-FR	COC	5.90 ^g	-257.7 ^e	7.80 ^{cd}
	B-FR	LR	5.89 ^g	-272.2 ^e	12.50 ^b
	F-FR	EN	6.68 ^c	-169.1 ^{gf}	0.64 ⁱ
	F-FR	COC	7.40 ^a	-373.7 ^a	3.50 ^g
EN	F-FR	LR	7.32 ^{ba}	-373.9 ^a	6.64 ^{de}
	GCA	EN	6.42 ^f	-136.6 ^h	5.20 ^{fg}
	GCA	COC	6.64 ^{dc}	-322.7 ^d	8.70 ^c
	GCA	LR	6.62 ^{dc}	-326.8 ^d	7.40 ^{de}
	B-FR	EN	6.58 ^{dce}	-152.1 ^{gh}	1.90 ⁱ
	B-FR	COC	5.96 ^g	-267.3 ^e	12.70 ^b
	B-FR	LR	5.98 ^g	-276.0 ^e	14.44 ^a
EEM	--	--	0.00	0.00	0.00
			Valor P		
	Bacteria		<.0001	0.9915	<.0001
	Medio		<.0001	<.0001	<.0001
	Inóculo		<.0001	<.0001	<.0001
	Bact*Medio*Inóculo		0.0565	0.0028	<.0001

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j Medias en con distinta literal son diferentes (P≤0.05). EC = *Enterococcus casseliflavus*. EN = Enterococcus. F-FR = Medios con formato de sodio. GCA-FR = Medios con glucosa, celobiosa y almidón. B-FR = Medios con pasto bermuda. EC = Inóculo bacteria sola. COC = Inóculo cocultivo. LR = Inóculo liquido ruminal.

Se sabe que el alimentar a rumiantes con dietas de alto contenido energético a base de cereales producen una rápida fermentación de los almidones y azúcares, por lo tanto se produce una acidosis, que consiste en la baja del pH causado por la acumulación de ácidos orgánicos (Krause y Oetzel, 2006); en otras palabras, la tasa de producción

microbiana de AGV es mayor a la tasa de absorción del epitelio ruminal dando lugar a la acumulación en el rumen y por consiguiente el pH disminuye. En esta investigación el pH más bajo se presentó en los tratamientos con B-FR COC y B-FR LR con valores de 5.96 y 5.98 respectivamente.

3.6.3.5 Potencial de óxido reducción (redox)

El potencial redox en general mantuvo en valores negativos (Cuadro 19), lo que nos indica la ausencia de oxígeno y poder reductor con condiciones de anaerobiosis de los biodigestores por parte de las bacterias inoculadas. El tratamiento que presentó mayor potencial de óxido-reducción fueron los medios con F-FR COC y F-FR LR con -373.7 y -373.9 mV respectivamente, inoculados con la bacteria EN siendo iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$). El potencial redox menor se presentó en el tratamiento GCA-EN con 136.6 mV.

El potencial redox es un parámetro que describe el modo de acción de los factores que muestran la capacidad de influir sobre el poder reductor en el rumen (Richter *et al.*, 2010). En condiciones normales el ambiente ruminal anaerobio con un potencial redox marcadamente negativo indican el fuerte poder reductor (Wang *et al.*, 2012). El potencial redox en promedio es de -350 mV, y puede variar desde -250 a 450 mV, además es una medida que indica la actividad de los electrones y esta relacionado con el pH y el contenido de oxígeno que es mínimo en condiciones de anaerobiosis. Un potencial redox positivo y de alta magnitud indica que existen condiciones de oxidación y cuando es negativo y de baja magnitud es de un ambiente reductor, por ello se ve afectada la actividad metabólica de los microorganismos (Contreras y Noro, 2010). En esta investigación no se afectó la actividad metabólica de los microorganismos

inoculados por el potencial redox, porque se mantuvieron en valores negativos y de baja magnitud.

3.6.3.6 Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales presentó interacción para tipo de bacteria – medio – inóculo, por lo que la concentración de bacterias esta influenciado por los tres factores. La bacteria EN obtuvo una mayor concentración de bacterias totales que EC, siendo los tratamientos B-FR los de mayor población de microorganismos presentando diferencias estadísticas en algunos tratamientos ($P \leq 0.05$). Sin embargo, las concentraciones de bacterias en cultivo puro fue mayor por EC siendo diferente estadísticamente de EN ($P \leq 0.05$). La concentración mínima de bacterias es de 10^9 , por lo tanto no disminuye la población en ningún tratamiento, al contrario, aumentaron en los tratamientos con LR y en COC, lo que indica que la prueba presentó las condiciones ambientales para el desarrollo de los microorganismos. Las bacterias aisladas en cultivo puro conservaron sus características morfológicas de aislamiento aumentando su concentración en una potencia (10^9). Las bacterias en COC compitieron por los sustatos disponibles disminuyendo la producción de CH_4 en solo dos tratamientos, sin embargo aun se considera un porcentaje bajo sobre la reducción de este gas. Las bacterias ruminales acetogénicas varían en su potencial para disminuir CH_4 , por lo tanto, sería viable aislar una nueva bacteria ruminal acetogénica más eficiente. Tal como lo afirma López *et al.* (1999) hasta ahora, no se ha tenido éxito la disminución de CH_4 con el uso de inóculos bacterianos a base de bacterias ruminales acetogénicas.

3.7 Conclusiones

- Se aisló y conservó en liofilización una bacteria ruminal en una concentración de 3.4×10^7 .
- Con la identificación molecular de la bacteria aislada se identificó el género tratándose de un *Enterococcus*, sin lograr obtener la especie.
- Al comparar dos bacterias aisladas, *Enterococcus casseliflavus* disminuye la producción de CH₄ en 48.46% en medios de cultivo con formato de sodio, no así para medios de cultivo con glucosa, celobiosa y almidón; y pasto bermuda.
- Se comprobó que la bacteria del género *Enterococcus* produjo mayor cantidad de AGV totales.
- Es mayor la población bacteriana de *Enterococcus casseliflavus* que *Enterococcus*, además es mejor la de mayor concentración de bacterias.

3.8 Literatura citada

- Arcos-García, J. L., R. López-Pozos, H. A. Bernabé, J. Hoffman. 2007. La actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia y Tecnología* Vol. 11. No. 32: 51-62.
- Ashokkumar, K., K. Selvaraj, S. D. Muthukrishnan. 2013. *Cynodon dactylon* (L.) Pers.: An updated review of its phytochemistry and pharmacology. *J. Med. Plants Res.* Vol 7 (48): 3477 – 3483.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 319-335.
- Boccazzi P., J. A. Patterson. 2013. Isolation and initial characterization of acetogenic ruminal bacteria resistant to acidic conditions. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 3: 129-144.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328.
- Calsamiglia, S., P. W. Cardozo, A. Ferret, A. Bach. 2009. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci* 86: 702-711.
- Carmona J.C., D.M Bolívar, L. A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 18 1: 49-63.
- Clark, H., C. Pinares-Patiño, C. De Klein. 2005. Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. In: McGilloway, D.A. *Grassland: A global resource.* Academic Publishers. Wageningen, The Netherlands. pp. 279-293.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: *Rumen Ecology Research Planning.* Wallace R. J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp 151-161.
- Contreras, P. A., M. Noro. 2010. Rumen, morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3ra ed. Valdivia. America. 135 p.
- Delgado, D. C., J. Galindo, J. Cairo, I. Orta, M. Domínguez, N. Dorta. 2013. Suplementación con follaje de *L. leucocephala*. Su efecto en la digestibilidad aparente de nutrientes y producción de metano en ovinos. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 47, Número 3:* 267-271.

- De Vos, P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. Schleifer and, W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Vol. 3. The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 1422 p.
- Dong, X., A. J. M. Stams. 1995. Evidence for H₂ and formate formation during syntrophic butyrate and propionate degradation. *Anaerobe* 1: 35-39.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* Vol. 12, no. 1, p. 13-15.
- Ellis, J. E., A. G. Williams, D. Llyod. 1990. Formate and glucose stimulation of methane and hydrogen production in rumen liquor. *Current Microbiology* Vol. 20: 251-254.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771.
- FAO. 2010. Greenhouse gas emissions from the dairy sector. A life cycle assessment. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Farenzena, R., G. V. Kozloski, M. P. Mezzomo, A. C. Fluck. 2014. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect of pH or glucose concentration. *J. Agricul. Sci.* 152: 325-332.
- Franz, C., M. Stiles, K. Schleifer, y W. Holzapfel. 2003. Enterococci in foods – A conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105-122.
- Gagen, E. J., J. Wang, J. Padmanabha, J. Liu, I. Pena, X. Liu, R. I. Webb, M. Morrisn, S. E. Denman, C. S. McSweeney. 2014. Investigation of a new acetogen isolated from an enrichment of the tamar wallaby forestomach. *BMC Microbiology* 14: 314.
- Gemeda, B. S., A. Hassen. 2014. In vitro fermentation, digestibility and methane production of tropical perennial grass species. *Crop Pasture Sci.* 65(5): 479 - 488.
- Getachew, G., M. Blummel, H. P. Makkar, K. Becker. In vitro measures techniques of assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- González, N., J. Galindo, A. I. Aldana, O. Moreira, L. Sarduy. 2012. Efecto de diferentes niveles de inclusión de *Morus alba* Linn. vc. Cubana en la fermentación y producción de metano en condiciones in vitro con líquido ruminal de búfalos de río (*Bubalus bubalis*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 46, Número 2: 151 – 157.
- Hook, S. E., A. D. Wright, B. W. McBride. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. Hindawi Publishing Corporation, *Archaea*. Article ID 945785.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York, N. Y. 533 pp.

- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, J. R. Norris and D.W. Ribbons (eds). Vol. 3. Academic Press, New York. pp 117-132.
- IPCC. 2007. How has the science of climate change advanced since the IPCC began. Intergovernmental Panel on Climate Change, New York.
- Johnson K. A., D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73: 2483-2492.
- Juárez-Reyes, A. S., M. A. Cerrillo-Soto, E. Gutiérrez-Ornelas, E. M. Romero-Treviño, J. Colín-Negrete, H. Bernal-Barragán. 2009. Assessment of the nutritional value of tropical grasses obtained from conventional analyses and in vitro gas production. DE MÉXICO Téc. Pecu. Méx; 47(1): 55 - 67.
- Kirchgessner, M., W. Windisch, and H. L. Muller. 1995. Nutritional factors for the quantification of methane production. In: Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction (Ed. W. von Engelhardt, S. Leonhard-Marek, G. Breves and D. Gieseke). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 333-348.
- Knapp J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, J. M. Tricarico. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. J. Dairy Sci. 97: 3231–3261.
- Krause, K. M., G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. Anim. Feed Sci. Technol. 126: 215–236.
- Lila, Z. A., N. Mohammed, S. Kanda, M. Kurihara, H. Itabashi. 2005. Sarsaponin effects on ruminal fermentation and microbes, methane production, digestibility and blood metabolites in steers. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 18: 1746.
- Liu H, Jin Wang, Aijie Wang, Jian Chen. 2011. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89: 1333–1340.
- López, S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. Anim. Feed Sci. Technol. 78: 1-9.
- Meale, S. J., A. V. Chaves, J. Baah, T. A. McAllister. 2012. Methane Production of Different Forages *in vitro* Ruminal Fermentation. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 25, No. 1: 86 – 91.
- Posada, S. L. y R. R. Noguera. 2005: Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Lives. Res. Rural Dev. Vol. 17 (4)
- Ramírez, J.F., O. S. Posada, R. Noguera. 2014. Ruminal methanogenesis and mitigation strategies. ISSN 1900-9607. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol 9. No 2.

- Renhua, N., D. Hongming, Z. Zhiping, C. Yongxing. 2013. Effects of forage type and dietary concentrate to forage ratio on methane emissions and rumen fermentation characteristics of dairy cows in China. *Agricul. Biosystems Engin.* Vol. 56 (3): 1115-1122.
- Richter, M., L. Křížová, J. Třináctý. 2010. The effect of individuality of animal on diurnal pattern of pH and redox potential in the rumen of dry cows. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, (10): 401–407.
- Robertson L. J., G. C. Waghorn. 2002. Dairy industry perspectives on methane emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. *Proc NZ Soc. Anim. Prod.* 62: 213–218.
- Russel, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production. *J. Dairy. Sci.* 81: 3222.
- Russell, J. B., J. L. Jeraci. 1984. Effect of carbon monoxide on fermentation of fiber, starch, and amino acids by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1): 211-217.
- SAS. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Seymour, W. M., D. R. Campbell, Z. B. Johnson. 2005. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study.
- Shimada, Y. A. 1991 Metabolismo de los carbohidratos. En: Pérez D.M. Ed. Manual sobre ganado productor de leche. Ed. Diana México. pp. 44-63.
- Vargas, J., E. Cárdenas, M. Pabón, y J. Carulla. 2012. Enteric methane emission by grazing ruminants. *Arch. Zootec.* 61 (R): 51-66.
- Yang, C. L., L. L. Guan, J. X. Liu, J. Wang. 2015. Rumen fermentation and acetogen population changes in response to an exogenous acetogen TWA4 strain and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product. *Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* in press JZUS 1: 1-13.
- Wang, C. T., C. M. Yang, Z. S. Chen. 2012. Rumen microbial volatile fatty acids in relation to oxidation reduction potential and electricity generation from straw in microbial fuel cells. *Biomass and Bioenergy* 37: 318-329.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se logró aislaron dos bacterias ruminales en medios selectivo anaerobio para bacterias acetogénicas a base de acetato-formato fluido ruminal.
- La primera bacteria aislada fue identificada molecularmente como *Enterococcus casseliflavus* y la segunda solo se identificó el género *Enterococcus* sin conocer la especie.
- Hasta ahora no existen reportes sobre las bacterias del género *Enterococcus* y específicamente la especie *casseliflavus* disminuya la producción de CH₄ por competencia vs bacterias metanogénicas.
- Se logró disminuir la producción de CH₄ numericamente en medios con formato-fluido ruminal en cocultivo. En medios con glucosa celobiosa y almidón en cocultivo la producción de CH₄ aumenta.
- Al comparar las dos bacterias aisladas es mejor *Enterococcus casseliflavus* sobre la disminución de CH₄, logrando disminuir 48.46%, sin embargo *Enterococcus* produce mayor cantidad de AGV.
- Propondría repetir la identificación molecular las bacterias aisladas y realizar una prueba *in vivo*.