

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROFLORA BACTERIANA
RUMINAL EN VACAS HOLSTEIN ALIMENTADAS CON SUBPRODUCTOS DE
CERVECERÍA**

JUAN ÁNGEL LLAMAS RIVAROLA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROFLORA BACTERIANA
RUMINAL EN VACAS HOLSTEIN ALIMENTADAS CON SUBPRODUCTOS DE
CERVECERÍA

TESIS POR


JUAN ÁNGEL LLAMAS RIVAROLA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ZOOTECNIA

COMITÉ PARTICULAR

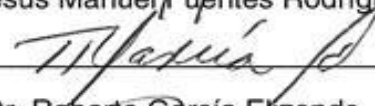
Asesor principal _____


Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor _____



Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez

Asesor _____


Dr. Roberto García-Elizondo

Asesor _____


Dr. Ramiro López Trujillo


Dr. Fernando Ruíz Zarate

Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Junio de 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud, inteligencia, paciencia, discernimiento para tomar decisiones, constancia, tranquilidad en situaciones difíciles.

A mi Alma Mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por darme la oportunidad de seguir con mis estudios y ser mejor profesional y persona.

A mi familia, que supo comprender y dar fuerzas para seguir con mis objetivos.

A la Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez, por su paciencia, empeño, enseñanza, sencillez. Así también a mis demás asesores, el Dr. Jesús Fuentes Rodríguez, por su amistad, comprensión. Al Dr. Ramiro López Trujillo, por ser estricto y muy constante con la enseñanza, no solo profesional sino también personal. Así también al Dr. Roberto García Elizondo, por su rectitud, empeño y profesionalismo.

A la Dra. Guadalupe Virginia Nevarez Moorillón y su equipo de trabajo que permitieron que mi estancia de maestría en la ciudad de Chihuahua, sea muy fructífera en la investigación. Por la calidez como personas y apoyo profesional y personal.

Al Dr. Raúl Rodríguez Herrera y su equipo de trabajo, por su disponibilidad y apoyo, para culminar parte tan importante de la investigación.

Al equipo de estudiantes de servicio social (Ulises Solís Naranjo, Gloria Dinorah Espinoza Cuevas, Hector Velázquez), por agilizar el trabajo en laboratorio, así también a los tesisistas de licenciatura (Lidia Valdés Sepúlveda, Isabel Reyes Arreozola, Tomás López Altunar, Susana Ruíz Maldonado, María Concepción Santiago García) que pusieron empeño y dedicación para culminar el trabajo de investigación.

A mis amigos, quienes en forma directa o indirecta me brindaron su apoyo para ser mejor profesional y mejor persona.

De la misma manera a mis compañeros de generación de posgrado y maestros varios en todo el transcurso de la maestría, por sus conocimientos, por saber escuchar, por sus palabras y recomendaciones que me ayudaron a crecer profesionalmente.

COMPENDIO

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROFLORA BACTERIANA
RUMINAL EN VACAS HOLSTEIN ALIMENTADAS CON SUBPRODUCTOS DE
CERVECERÍA**

POR

JUAN ANGEL LLAMAS RIVAROLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS

ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. JUNIO – 2011

DRA. ANA VERÓNICA CHARLES RODRÍGUEZ ---ASESOR---

Palabras claves: Microbiología ruminal, biotecnología ruminal, rumen bovino, subproductos de cervecería.

Existen diversos factores que afectan la población bacteriana ruminal, los cuales pueden ser clasificados como cuantitativos y cualitativos. El patrón de fermentación ruminal en los rumiantes está influenciado por la interacción entre la

dieta, la población de microorganismos y el animal. Existen varios subproductos derivados de la fabricación de cerveza (grano húmedo, o masilla, cascarilla y crema final y levadura) que pueden utilizarse en la alimentación de novillos de engorda y de vacas productoras de leche. El estudio básico de los microorganismos en ganado bovino Holstein es de suma importancia ya que no hay reportes de biotipos mexicanos en Coahuila, México, lo cual nos abre una ventana de oportunidades para registrar y conservar a estos microorganismos ya que pueden generar futuras investigaciones, enriqueciendo la información de fuentes genéticas y rutas metabólicas. Sobre esta base, se trabajó con la proliferación de bacterias celulolíticas, proteolíticas, quitinolíticas, xilololíticas pectinolíticas y fíticas mediante la modificación de la dieta de ganado Holstein con residuos agroindustriales de la industria cervecera (masilla y levadura).

Con el propósito de evaluar el efecto de masilla y levadura de la industria cervecera sobre la población de bacterias ruminales, se realizó la presente investigación en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en la cuál se utilizaron 32 vacas de la raza Holstein (16 primíparas y 16 multíparas) con pesos promedio de 450 y 650 kg, respectivamente. Las vacas fueron alimentadas por un período de 120 días con cuatro dietas balanceadas diferentes, que constituyeron los siguientes tratamientos: (T1: control, T2: masilla= 14%, T3: masilla= 13% y levadura= 6%, T4= levadura= 9%). Se obtuvo el líquido ruminal, el cual se utilizó como inóculo inicial para el aislamiento, identificación y cultivo de células procariontas para su posterior caracterización macroscópica, microscópica, bioquímica y molecular. Se consiguió aislar e identificar 38 bacterias., de acuerdo a la caracterización antes mencionada. Se puede concluir que se identificaron cepas de considerable importancia para la aplicación biotecnológica de las mismas en el sector agropecuario y con posibilidades de utilizarse en otros campos.

ABSTRACT

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE RUMEN BACTERIAL
MICROFLORA IN HOLSTEIN COWS FED BREWERY BYPRODUCTS**

BY

JUAN ANGEL LLAMAS RIVAROLA

MASTER OF SCIENCE

ZOOTECHNY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SALTILLO, COAHUILA, MEXICO. JUNE - 2011

DR. ANA VERONICA CHARLES RODRIGUEZ ---ADVISOR---

Keywords: Rumen microbiology, biotechnology rumen, rumen cattle, brewing byproducts.

There are several factors affecting the ruminal bacterial population, which can be classified as quantitative and qualitative. The pattern of rumen fermentation in ruminants is influenced by the interaction between diet, the population of microorganisms and animals. There are several by-products of brewing (Brewers

wet grain, scale and final cream and yeast) that can be used in feed for fattening steers and dairy cows. The basic study of microorganisms in Holstein cattle is of paramount importance because there are no reports of biotypes Mexico in Coahuila, Mexico, which opens a window of opportunity to record and preserve these organisms because they can generate future research, enriching the information from genetic and metabolic pathways. On this basis, we worked with the proliferation of cellulolytic bacteria, proteolytic, chitinolytic, pectinolytic and phytic xilololíticos by changing the diet of Holstein cattle in agro-industrial waste from the brewing industry (Brewers wet grain and yeast).

In order to evaluate the effect of filler and brewing yeast on rumen bacterial populations, this research was conducted at the Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro in what used 32 Holstein cows (16 primiparous and 16 multiparous) with average weights of 450 and 650 kg, respectively. The cows were fed for a period of 120 days with four different balanced diets, which were the following treatments: (T1: control, T2: Brewers wet grain = 14%, T3: Brewers wet grain and yeast = 13% = 6%, T4 = yeast = 9%). Rumen fluid was obtained, which was used as initial inoculum for the isolation, identification and cultivation of prokaryotic cells for further characterization of macroscopic, microscopic, biochemical and molecular level. It managed to isolate and identify bacteria 38. According to the characterization above. It can be concluded that strains identified considerable importance for the biotechnological application of these in the agricultural sector and likely to be used in other fields.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de Cuadros.....	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Introducción.....	1
Revisión de Literatura.....	3
Población Microbiana.....	3
Bacterias.....	3
Bacterias Celulolíticas.....	3
Bacterias Hemicelulolíticas.....	4
Bacterias Amilolíticas.....	4
Bacterias que Utilizan Azúcares Solubles.....	4
Bacterias Proteolíticas.....	4
Bacterias Lipolíticas.....	4
Bacterias que Utilizan Ácidos.....	4
Medio Ambiente Ruminal.....	5
Interacción Rumen – Microorganismos.....	5
Subproductos de Cervecería para la Alimentación del Ganado Bovino.....	7
Masilla.....	9
Levadura.....	14
Variantes de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Levadura Inactiva.....	16
Levadura Inactiva Enriquecida.....	17
Aplicaciones Biotecnológicas.....	18
Las biotecnologías ganaderas en los países en desarrollo.....	20
Hipótesis.....	22
Materiales y Métodos.....	23
Etapa I.....	23
Etapa II.....	25
Aislamiento de Microorganismos en Agar Nutritivo (AN).....	25
Caracterización Macroscópica de las Especies Bacterianas Aisladas en AN.....	27
Aislamiento de Microorganismos en AS (Agar Schaedler).....	27
Caracterización macro y microscópica de las especies bacterianas aisladas en AS.....	28
Identificación del Metabolismo Microbiano.....	28
Citrato de Simmons.....	28
Agar de Hierro y Lisina.....	29
Caldo Urea.....	29
Agar MIO.....	29
Agar SIM.....	29
Agar MacConkey.....	29
Identificación Molecular.....	30
Preparación de las Muestras.....	30
Técnica de extracción de ADN utilizada para bacterias Gram negativas.....	30
Técnica de extracción de ADN utilizada para bacterias.....	34

Gram positivas.....	35
Elaboración de PCR para Secuenciar.....	39
Primers Utilizados.....	39
Secuencia.....	39
Etapa III.....	40
Creación de un cepario de bacterias ruminales de bovinos.....	40
Etapa IV.....	41
Aplicaciones Biotecnológicas de las Cepas Obtenidas.....	41
Producción de una Proteasa Cepa 2506-3 VC.....	41
Selección (ensayo).....	41
Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico para Anaerobios (Tioglicolato de Sodio).....	42
Turbidimetría.....	42
Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico para la Producción de la Enzima.....	43
Determinación de Proteína Extracelular (Enzima) por el método de Biuret.....	44
Cinética Enzimática.....	44
Preparación de Sustrato.....	45
Condiciones de la Cinética.....	45
Cuantificación de Proteína (enzima) por el Método de Biuret.....	45
Producción de Quitosanasa.....	46
Ensayo (Screening).....	46
Medio específico.....	47
Producción de Pectinasa.....	47
Ensayo (Screening).....	47
Medio específico.....	47
Producción de Xilanasa.....	48
Ensayo (Screening).....	48
Medio específico sólido.....	48
Inducción de la actividad xilanasa en medio líquido específico.....	48
Curva de crecimiento en medio líquido de tioglicolato de sodio para la cepa 1502-4 VAM.....	50
Curva de crecimiento en medio líquido específico 2 para la cepa 1502-4 VAM.....	50
Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret para la cepa 1502-4 VAM.....	51
Determinación de actividad enzimática mediante la técnica de azúcares reductores (Somogyi-Nelson) para la cepa 1502-4 VAM.....	52
Producción de celulasa.....	53
Ensayo (Screening).....	53
Curva de crecimiento en medio líquido en Tioglicolato de sodio de la cepa 513-2 VML.....	54
Curva de crecimiento o en medio líquido específico	

para producir celulasa de la cepa 513-2 VML.....	54
Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa 513-2 VML.....	55
Determinación de Azúcares Reductores (Somogy-Nelson) de la cepa 513-2 VML.....	57
Producción de una proteasa cepa 652-2 VLI.....	57
Selección (ensayo).....	57
Curva de crecimiento en medio líquido específico para anaerobios (tioglicolato de sodio).....	58
Turbidimetría.....	58
Curva de crecimiento en medio líquido específico para la producción de la enzima.....	59
Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret.....	60
Cinética enzimática.....	60
Producción de Fitasa.....	62
Selección (ensayo).....	62
Preparación del extracto enzimático.....	62
Preparación del Medio de Cultivo para Fitasa.....	64
Curva de crecimiento de las 7 cepas seleccionadas para actividad fitasa.....	64
Turbidimetría.....	65
Preparación de la Curva de Calibración de las 7 cepas seleccionadas para actividad fitasa.....	66
Proposición de aplicaciones biotecnológicas para algunos de los biotipos aislados de las vacas Holstein de la U.A.A.N.....	68
Resultados y Discusión.....	69
Etapa I.....	69
Acondicionamiento de ganado Holstein y obtención de Líquido Ruminal.....	69
Etapa II.....	70
Aislamiento Preliminar de Microorganismos Bacterianos en Agar Nutritivo (AN).....	70
Aislamiento de Microorganismos Bacterianos en Medio de Cultivo Comercial Específico para Anaerobios Agar Schaedler (AS).....	75
Características microscópicas de las especies bacterianas aisladas en AS.....	88
Identificación del Metabolismo Bioquímico de las Cepas Bacterianas Obtenidas.....	101
Identificación del Metabolismo Microbiano.....	101
Agar Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar).....	103
Agar Hierro Lisina (Agar LIA o Lisyne Iron Agar).....	109
Caldo Urea.....	111
Medio Movilidad-Indol-Ornitina (Medio MIO o Motility Indole Ornithine Medium).....	111
Agar SIM (Sulfide Indole Motility Medium).....	112
Agar MacConkey.....	112

Identificación Molecular.....	114
Extracción de ADN de Bacterias del Rumen Bovino.....	114
Técnica de PCR.....	115
Secuencia.....	116
Etapa III.....	122
Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas.....	122
Purificación de los microorganismos aislados.....	122
Etapa IV.....	123
Producción de Enzimas como Prospectivas Biotecnológicas.....	123
Producción de Proteasa, de la Cepa VC 2506-3 VC del Tratamiento 1.....	123
Determinación y Cuantificación de la Actividad Proteasa Mediante Técnicas Espectrofotométricas.....	125
Producción de la Enzima Quitosanasa.....	126
Producción de la Enzima Pectinasa.....	127
Producción de la Enzima Xilanasa.....	128
Inducción de la Actividad Xilanasa en Medio Líquido Específico.....	128
Curva de Crecimiento en Medio Líquido de Tioglicolato de Sodio.....	129
Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico 2.....	131
Determinación de Proteína Extracelular por el Método de Biuret.....	132
Determinación de Actividad Enzimática Mediante la Técnica de Azúcares Reductores (Somogyi-Nelson)...	133
Producción de la Enzima Celulasa.....	135
Determinación de la Curva de Crecimiento Microbiano en Medio Líquido (TGNa).....	136
Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico para la Producción de una Celulasa.....	137
Determinación de Proteína Extracelular por el Método de Biuret.....	138
Determinación de Actividad Celulasa por Somogyi-Nelson.....	140
Producción de la Enzima Proteasa, de la Cepa 652-2 VLI del Tratamiento 4.....	141
Determinación y Cuantificación de la Actividad Proteasa Mediante Técnicas Espectrofotométricas.....	143
Producción de la Enzima Fitasa.....	148
Propuestas Biotecnológicas para Algunos Biotipos.....	148
Conclusión.....	151
Literatura citada.....	152
Anexos.....	164
Anexo 1: Elaboración de Tinción de Gram.....	164
Anexo 2 .Fundamentos pruebas bioquímicas.....	165
Anexo 3. Preparación de Reactivos 1 y 2 para la técnica de Somogyi-	

Nelson.....	166
Anexo 4. Preparación de reactivo de Taussky-Shorr.....	167
Anexo 5: Preparación de Buffer de extracción CTAB.....	168
Anexo 6: Preparación de Albumina Sérica Bovina al 20%.....	168
Anexo 7: Preparación de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).....	168
Anexo 8: Preparación de TE 1X.....	168
Anexo 9: Preparación de EDTA 0.5M.....	168
Anexo 10: Preparación de Lauril Sulfato de sodio (SDS) al 14%.....	168
Anexo 11: Preparación de Proteinasa K al 0.1%.....	169
Anexo 12: Preparación de TE 0.1X.....	169
Anexo 13: Secuencia de Identificación.....	170

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Pág.
1	Valores nutricionales de la masilla de cerveza.	13
2	Características químicas y nutritivas (base materia seca) de la levadura de cerveza (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).	15
3	Productos y servicios de origen biotecnológico en diferentes sectores.	19
4	Dietas experimentales utilizando subproductos de cervecería.	24
5	Cantidad de reactivos para preparación de PCR para 50 µL de muestra.	37
6	Cantidad de reactivos para preparación de PCR con variaciones en Mg Cl ₂ (50 mM) y Taq.polimerasa (5 U/µL) para 50 µL de muestra	38
7	Programas utilizados en el termociclador para realizar PCR	39
8	Composición química del medio sólido específico para el monitoreo de la degradación de la proteína.	41
9	Composición química del medio líquido específico para producir enzima proteasa.	44
10	Contenido de los tubos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret.	46
11	Composición química del medio sólido específico para el ensayo de la degradación de xilosa.	48
12	Composición química del medio líquido inductor 1 para la degradación de xilosa.	50
13	Composición química del medio líquido específico 2 para producir xilanasa.	51
14	Preparación de muestras para la cinética enzimática.	53
15	Composición química del medio sólido específico para el screening de la degradación de celulosa	54

16	Composición química del medio líquido específico para producir celulasa.	55
17	Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret.	56
18	Composición química del medio sólido específico para el monitoreo de la degradación de la proteasa.	58
19	Composición química del medio líquido específico para producir proteasa.	60
20	Contenido de los tubos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret.	61
21	Curva de calibración utilizada.	67
22	Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en agar nutritivo.	79
23	Morfología macro y microscópica de los microorganismos aislados en agar Schaedler.	85
24	Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas del tratamiento 1	101
25	Resultados de pruebas bioquímicas para cada cepa del tratamiento 2.	102
26	Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas del tratamiento 3.	102
27	Relación del comportamiento bioquímico de cepas aisladas de rumen bovino, a las 24 y 48 horas de incubación para el tratamiento 4.	103
28	Resultados de las comparaciones de cada muestra para la identificación.	117
29	Resumen de bacterias identificadas del rumen de vacas Holstein alimentadas con subproductos de cervecería en Saltillo, Coahuila, México.	120
30	Velocidades de formación del producto	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pág.
1	Bagazo o masilla de cervecería.	12
2	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleada para la investigación.	17
3	El campo de la Biotecnología.	18
4	Área de trabajo para inoculación de las muestras en campana de flujo laminar.	26
5	Bolsa para crear anaerobiosis.	27
6	Jarra de anaerobiosis utilizada para dar ambiente propicio a los microorganismos del rumen bovino.	27
7	Centrífuga utilizada en Biología Molecular.	31
8	Termomixer utilizada para dar temperatura al proceso de extracción.	32
9	Gel de Agarosa.	32
10	Cámara de electroforesis horizontal.	33
11	Mini cuarto oscuro unido a un Transiluminador Ultravioleta.	33
12	Termociclador utilizado para realizar el proceso de elaboración de PCR.	36
13	Vista de PCR corrido en un gel de agarosa, con bandas inespecíficas, observada mediante una cámara oscura con luz ultravioleta.	37
14	Liofilizador.	40
15	Campana de Flujo Laminar	63
16	Incubadora con agitadora	63
17	Centrífuga con temperatura baja, para tubos Falcon de 50 mL	64
18	Vortex Mixer	65

19	Espectrofotómetro controlado mediante una computadora.	66
20	Obtención de líquido ruminal mediante empleo de una sonda ororuminal conectada a una bomba de vacío.	69
21	Crecimiento microbiológico empleando agar nutritivo incubadas a 40°C y en condiciones anaerobias.	70
22	Morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar nutritivo. A) Caja # 903VML, B) Caja # 763VML, C) Caja # 283VML, D) Caja # 873VML, E) Caja # 343VML.	73
23	Identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la siembra del líquido ruminal obtenidas en agar nutritivo. A) Caja # 332, B) Caja#932, C) Caja #652 y D) Caja #572.	74
24	Crecimiento microbiano empleando agar Schaedler.	77
25	Identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la siembra del líquido ruminal obtenidas en agar Schaedler. A) Caja #332, B) Caja #932, C) Caja #652 y D) Caja #572.	78
26	Colonias codificadas como. A) VC 1003 – 2, B) VA 2606 – 2 y C) VC 3505 -3, D) VC 1003-3, E) VC 2606 -1, F) VC 901-3, G) VC 1003- 5, H) VC 3505- 5, I) VC 2506- 3, teñidas con Gram.	89
27	Características microscópicas de colonias codificadas como A) VAM 205-1, B) VAM 205-2, C) VAM 205-5, D) VAM 1502-4, E) VAM 1502-6, F) VAM 1502-7, G) VAM 4906-3, H) VAM 4906-5, I) VAM 1004-2, teñidas con Gram.	94
28	Morfología microscópica de las cepas, A) VML 513-1, B) VML 953-10, C) VML 513-2, D) VML 643-11, E) VML 513-5, F) VML 513-7, G) VML 953-8, H) VML 953-9, I) VML 643-12, J) VML 643-13 y K) VML 193-16, aisladas de líquido ruminal.	97
29	Morfología microscópica de las colonias A) VLI 332-1, B) VLI 332-3, C) VLI 932-1, D) VLI 932-2, E) VLI 932-3, F) VLI 932-4, G) VLI 932-5, H) VLI 652-2, I) VLI 572-3, J) VLI 572-4, aisladas del líquido ruminal teñidos con Gram.	100
30	Prueba bioquímica Citrato de Simmons para las cepas del	

	tratamiento 1.	104
31	Cepa VAM 205-2 del metabolismo microbiano (Citrato de Simmons).	105
32	Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo cepa 5.	105
33	Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo cepa 8.	106
34	Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo cepa 10.	106
35	Pruebas bioquímicas para citrato de Simmons realizadas a las cepas puras.	109
36	Prueba bioquímica Agar LIA.	110
37	Cepa VAM 1502-4 del metabolismo microbiano (Agar de Hierro y Lisina).	111
38	Prueba bioquímica caldo urea.	112
39	Pruebas bioquímicas en medio MIO.	112
40	Pruebas bioquímicas en medio SIM.	113
41	Prueba bioquímica Agar MacConkey negativo (cepa 1).	113
42	Pruebas bioquímicas para citrato de Simmons realizadas a las cepas puras.	114
43	Gel de agarosa con ADN en cada carril para corroborar calidad de extracción.	115
44	Gel de agarosa con ADN en cada carril para verificar la calidad de PCR realizado de cada muestra.	116
45	Curva de crecimiento de la cepa VC 2506-3 en medio de tioglicolato de sodio a 40° C.	123
46	Curva de crecimiento en medio específico de la cepa VC 2506-3 empleando como fuente de carbono caseína.	125
47	Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2506-3.	126
48	Fotografía de cajas empleando quitosan como fuente de carbono con a) Medio Sólido sin buffer y b) Medio sólido con Buffer (AAANa 50 mM).	127

49	Fotografía de cajas con medio sólido y pectina como única fuente de carbono.	127
50	Fotografía de cajas con medio sólido y xilosa.	128
51	Fotografía de medio líquido inductor 2.	129
52	Curva de crecimiento de la cepa VAM 1502-4 en medio de tioglicolato de sodio a 40°C	131
53	Curva de crecimiento de la cepa 1502-4 en medio líquido específico con xilosa incubados a 40°C.	132
54	Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa VAM 1502-4.	133
55	Determinación de la actividad xilanasas de la cepa VAM 1502-4 en medio específico a 40°C empleando xilosa al 2%.	135
56	Curva de crecimiento de la cepa # 2 aislada en TGN a 40°	137
57	Curva de crecimiento de la cepa # 2 en medio líquido específico a 40° C.	138
58	Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa # 2.	140
59	Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 2	141
60	Curva de crecimiento de la cepa 2 de la VLI # 652 cultivada en tioglicolato de sodio.	142
61	Curva de crecimiento en medio específico de la cepa 2 de la VLI # 652 empleando como fuente de carbono caseína.	143
62	Concentración de proteína extracelular en mg/mL a diferentes tiempos de reacción cuantificada por el método de Biuret de la cepa 2 de la VLI #652.	145
63	Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2 de VLI # 652.	147

1. INTRODUCCIÓN

En la industria cervecera, en el proceso de elaboración de la cerveza se derivan residuos (subproductos) propicios para utilizar en la alimentación de ganado por su alto valor biológico debido a que provienen de procesos enzimáticos que hidrolizan los nutrientes es decir son fácilmente absorbidos por el organismo del animal (Montero, 2009).

La diversidad de microorganismos del rumen es importante porque la presencia de especies distintas aporta un conjunto mayor de genes y complemento de enzimas, así como reacciones bioquímicas precisas, para una conversión máxima de productos alimenticios en células microbianas y productos de fermentación. Existen en el rumen especies que se superponen en su capacidad para utilizar un determinado sustrato aumentando así la eficacia con que es utilizado dicho sustrato. Una población diversa estabilizará la fermentación, al evitar grandes fluctuaciones en las cantidades y proporciones de productos finales formados.

La concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis, específicamente para bacterias, protozoarios y hongos son de $10^{10}/\text{ml}$, $10^6/\text{ml}$ y $10^4/\text{ml}$ respectivamente (Jouany, 1994). Para permitir que los organismos de crecimiento lento; tales, como los hongos y protozoarios ruminales puedan reproducirse se necesita permanencia prolongada del alimento dentro del rumen de 48 a 72 hr y sostener así la concentración de las poblaciones microbianas (McAllister *et al.*, 1994). Los tiempos de multiplicación varían de 5-14 hrs. para los protozoarios (Williams y Coleman, 1988) y de 24-30 hrs. para los hongos (Bauchop, 1981; Joblin, 1981). Es posible que la eficiencia del crecimiento bacteriano este directamente relacionada con la tasa de dilución de las bacterias y/o del contenido ruminal, debido a que las bacterias en el rumen están asociadas a los sólidos alimenticios, al líquido y la pared ruminal;

por lo tanto, la tasa de crecimiento bacteriano puede estar en relación a la tasa de dilución del líquido (Aguilera, 1988), lo cual se explica porque solamente en cultivos continuos in vitro de estado estable, la tasa de crecimiento específico de los microorganismos es igual a la tasa de dilución del cultivo (Bergen, 1979).

Es por ello que es de suma importancia identificar a los microorganismos del rumen ya que la cantidad de bacterias puede variar por factores ambientales o dietarios, y cuando estos se mantienen, las variaciones derivan de factores específicos de cada animal, tales como: tiempo destinado a la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance de la digesta.

El estudio básico de los microorganismos en ganado bovino es trascendental, ya que los biotipos mexicanos no están registrados o caracterizados, lo cual abre una ventana de oportunidades y posibilidades para registrar y conservar a estos microorganismos ya que pueden generar nuevas aplicaciones, es decir, se tendrán mayores posibilidades de contar con prospectivas biotecnológicas mediante procariotas ruminales. Por lo que, es importante realizar la identificación bioquímica y molecular de los microorganismos del rumen bovino ya que el cepario producido de esta investigación será un aliciente para futuras investigaciones.

Las diferentes actividades de la investigación se harán de tal manera a alcanzar los objetivos específicos que continuación de mencionan:

- Aislar e identificar bioquímica y molecularmente los biotipos bacterianos del rumen de vacas Holstein, alimentadas con subproductos de cervecería.
- Crear un cepario de bacterias, ruminales de bovinos.
- Crear prospectivas biotecnológicas de las cepas obtenidas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Población Microbiana

La población microbiana en el rumen es variable, predominando las bacterias y protozoarios ciliados (procariotas), pero puede aparecer una cantidad considerable de levaduras (eucariotas). En general, y debido a las condiciones que prevalecen en el rumen, la mayor parte de los microorganismos son anaerobios o anaerobios facultativos.

Algunos de los géneros bacterianos más importantes, por su capacidad para degradar a los principales carbohidratos (glúcidos) de los alimentos son: *Bacterioides*, *Ruminococos*, *Succinomonas*, ciertos *Clostridios*, *Celobacterias* y *Butirivibrio* (Hungate, 1966; Bryant, 1963).

Los protozoarios más comunes en el rumen pertenecen a los géneros: *Isotriquia*, *Dasitriquia*, *Diplodinio* y *Entondinio* (Hungate, 1966). En rumiantes jóvenes también se encuentran protozoarios flagelados (Eadie, 1962), *Monocercomonas*, *Calimastix*, *Quilomastix*, *Tetratricomonas*, etc. (Hungate 1966).

Bacterias

Las bacterias del rumen se han agrupado, según el sustrato que fermentan en forma predominante, de la siguiente manera:

Bacterias Celulolíticas

Son las que producen celulasa, que es una enzima extracelular capaz de hidrolizar los enlaces beta de la celulosa, produciendo celobiosa. Algunas de ellas también aprovechan la celobiosa que a su vez libera glucosa (Bryant 1953;

Hungate, 1950). Este tipo de bacterias se encuentran en concentraciones altas en el rumen de animales alimentados con forrajes que contienen mucha fibra. Muchas de las bacterias de este grupo también degradan el almidón.

Bacterias Hemicelulolíticas

Son bacterias capaces de degradar a las hemicelulosas, liberando las pentosas, hexosas y ácidos úricos, convirtiéndolos en glucosa o fructosa. (Bryant 1953).

Bacterias Amilolíticas

Estas utilizan los almidones como sustrato pues poseen una amilasa que hidroliza enlaces alfa 1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa.

Bacterias que Utilizan Azúcares Solubles

Estas dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosas y otros azúcares solubles a partir de las celulosas, almidones, hemicelulosas, etc., transformándolas en ácidos grasos volátiles.

Bacterias Proteolíticas

Producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces peptídicos, liberando péptidos y finalmente ácidos aminados.

Bacterias Lipolíticas

Poseen estererasas que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y esteres de ácidos grasos.

Bacterias que Utilizan Ácidos

Actúan sobre los productos finales de la actividad de las bacterias de los grupos anteriores, utilizando como sustrato diferentes tipos de ácidos, por lo que ayudan a su eliminación del medio.

Además hay otros tipos de bacterias capaces de producir amoníaco a partir de los ácidos aminados, por mecanismos de desaminación; las metanogénicas que producen metano a partir de hidrógeno y bióxido de carbono y otras que sintetizan vitaminas (Bryant, 1953).

Medio Ambiente Ruminal

El rumen ofrece un medio adecuado para el crecimiento bacteriano, ya que el pH varía generalmente entre 5.5 y 7.0 y la temperatura de 39° a 40°C, es muy cercana a la óptima para la mayoría de los sistemas enzimáticos. El alimento llega hasta el rumen en una forma más o menos constante y es mezclado por las contracciones de las paredes ruminales, lo que permite que los microorganismos entren en contacto con alimentos recién ingeridos o regurgitados y vueltos a masticar y humedecer. La reinsalivación de los alimentos durante la rumia, en combinación con el agua que llega al rumen, y las secreciones del mismo, proveen una humedad relativa favorable para muchos microorganismos. Además, los productos finales de las reacciones fermentativas son eliminados del medio, ya sea por absorción a través de la mucosa del retículo-rumen, o bien por el paso hacia los siguientes compartimientos, evitando de esta manera la saturación del medio y la consecuente inhibición del crecimiento bacteriano. Por lo tanto, se favorece el crecimiento de microorganismos llegando a producir una cantidad de protoplasma equivalente al 10% del líquido total del rumen (Warner, 1962).

Interacción Rumen - Microorganismos

Los rumiantes establecen una simbiosis con los microorganismos ruminales mediante la cual los primeros aportan nutrientes y un medio ruminal adecuado para la supervivencia de los microorganismos y la fermentación de los alimentos, y los microorganismos aportan la capacidad de utilizar la fibra y proteína microbiana sintetizada en el rumen, y que constituyen la fuente principal de energía y proteína, respectivamente, para el animal (Calsamiglia *et al.*, 2005).

Los rumiantes, con frecuencia son alimentados con subproductos de la industria agrícola como cereales, bagazo de caña de azúcar, forrajes, granos, etc. La eficiencia de los rumiantes para utilizar una gran variedad de dietas se debe a diversidad del ecosistema microbiano ruminal formado por bacterias (10^{10} - 10^{11} células/ml, representando más de 50 géneros), protozoarios ciliados (10^4 - 10^6 /ml, de 25 géneros), hongos anaeróbicos (10^3 - 10^5 zoosporas/ml, representando 5 géneros) y bacteriófagos (10^8 - 10^9 /ml) (Hobson, 1989).

Sin embargo, estos números podrían ser mayores ya que muchos de ellos son no cultivables. El sinergismo y antagonismo de los diferentes grupos de microorganismos, así como de los distintos géneros incluso del mismo grupo, dificultan la cuantificación del papel que desempeñan cada uno de los grupos en particular de microbios presentes en el rumen (Kamra, 2005).

El resultado neto de las reacciones que ocurren en el rumen, es la bioconversión de la alimentación en formas utilizables que el animal emplea como fuente de energía (ácidos grasos volátiles de cadena corta). Estos microorganismos sobreviven en el rumen bajo diferentes restricciones, las cuales pueden darse de manera natural o bien asociadas a la alimentación (Kamra, 2005).

El ecosistema microbiano del rumen es estable y al mismo tiempo dinámico. Es estable ya que se encarga de desarrollar la bioconversión del alimento en ácidos grasos volátiles. En rumiantes sanos la contaminación del ecosistema no se lleva a cabo debido a que cada día millones de microbios invaden el rumen a través de la alimentación, agua y aire. Y el ecosistema es dinámico tanto por los cambios en la población microbiana debido a la dieta, así como a la adaptación del tipo de alimentación; esto ocurre debido a que los microorganismos del rumen están adaptados a sobrevivir en una serie de factores limitantes que prevalecen en el rumen y ningún contaminante que no sobreviva a estos factores limitantes de crecimiento son eliminados. Los principales factores limitantes del medio ambiente del rumen son la anaerobiosis, la alta capacidad de amortiguación, presión osmótica, etc (Kamra, 2005).

La anaerobiosis en el rumen, es una de las mayores limitantes de este ecosistema, el cual ayuda en la conversión de la energía para poder ser empleada por el animal. La cantidad de energía liberada por la reacción de transferencia de electrones depende del último aceptor de los mismos. En microorganismos aeróbicos, el último aceptor de electrones es el oxígeno y la liberación de energía se da en forma de ATP, la cual es mucho mayor que la que se libera cuando el último aceptor de electrones es un compuesto orgánico como en el caso de las bacterias anaeróbicas (Thauer, 1977).

Las condiciones anaeróbicas en el rumen se mantienen por la generación de gases durante la fermentación, como CO₂, CH₄, y trazas de H₂. Pequeñas cantidades de oxígeno atrapado en los alimentos consumidos por el animal es utilizado por los microorganismos aerobios facultativos presentes en el rumen; esto hace que se generen y mantengan las condiciones perfectas de anaerobiosis. Sin embargo, sólo los microorganismos que son capaces de tolerar potenciales de óxido-reducción bajos (-350 mV) sobreviven en el rumen y el resto son eliminados por el sistema. La alta capacidad de amortiguación y la presión osmótica limita el crecimiento de microorganismos invasores. Algunos de los microorganismos del rumen producen compuestos antimicrobianos que limitan el crecimiento de microorganismos presentes en este ecosistema (Stewart, 1992; Odenyo, 1994).

Subproductos de Cervecería para la Alimentación del Ganado Bovino

En los últimos años se han aumentado los esfuerzos destinados al estudio de las características nutricionales de los subproductos de la agroindustria, ya sea para la producción de carne o leche. El propósito es tratar de disminuir la utilización de granos que podrían ser destinados al consumo humano (Garciaarena, 2010).

Por otra parte, las industrias que procesan los productos agropecuarios deben encontrar un destino final para los subproductos, que cumpla con dos requisitos mínimos. Por un lado, que no sea contaminante del ambiente y, por

otro, que, los costos de procesamiento y transporte sean cubiertos por el precio de venta de los mismos (Garciaarena, 2010).

Los subproductos de la agroindustria presentan una amplia gama de calidad, con muy baja o alta energía digestible como la cáscara y el afrecho de arroz, o con altos o bajos contenidos proteicos como las harinas de plumas y la pulpa de cítricos, respectivamente. Si bien algunos subproductos, como la malta húmeda, son muy regulares en su composición porque ésta depende de procesos industriales altamente controlados, otros pueden presentar una alta variabilidad composicional. De tal forma resulta imperioso conocer tanto los aportes de energía digestible, proteínas y fibra efectiva de cada suplemento, como así también la estabilidad del alimento y las condiciones en que se debe conservar (Garciaarena, 2010).

Es improbable que un subproducto sea el alimento base de los animales independientemente de la categoría y del sistema de producción de que se trate. En una producción convencional, el alimento base es la pastura y/o verdeo, y en un feedlot o engorda a corral estabulado el alimento base, generalmente, es el ensilaje de maíz y granos de cereales. De esta manera los subproductos son utilizados como sustitutos parciales y/o correctores de las deficiencias del sistema para un objetivo planteado.

La masilla y la levadura provenientes de la industria cervecera, han sido empleadas por su alto contenido de proteínas de elevado valor biológico, además de que estimulan el consumo de materia seca obteniendo mayor producción de leche (Johnson *et al.*, 1997). La levadura contiene un alto porcentaje de proteína de paso y es absorbida en el intestino delgado, además contiene vitaminas hidrosolubles y es un excelente promotor del crecimiento de la población microbiana del rumen (Burgstaller, 2007).

Debido a su naturaleza fibrosa y bajo contenido de energía, la masilla de cerveza es adecuada para los rumiantes, en particular en las vacas lecheras,

para balancear el consumo de los altos contenidos de almidón en la dieta (Dhiman *et al.*, 2003).

Las levaduras y sus medios de cultivos pueden contener nutrientes (ácidos orgánicos, vitaminas del grupo B, enzimas, aminoácidos) que estimulan el crecimiento de bacterias que digieren la celulosa y utilizan el ácido láctico (Callaway y Martin, 1997; Nisbet y Martin, 1991).

Los principales subproductos de la industria cervecera son la, las raicillas de cebada, la malta húmeda ó masilla y la levadura de cerveza (tal cual o deshidratada), siendo las dos últimas las principales utilizadas en la alimentación del ganado (Garciaarena, 2010).

Masilla

La malta húmeda ó masilla es el bagazo remanente de la elaboración de la cerveza. Sus ingredientes principales son malta (cebada malteada), sémola de maíz y/o arroz quebrado. Estos son sometidos a distintas temperaturas en salas de cocimiento y luego filtrados para la obtención de los líquidos para la elaboración de la cerveza. Los sólidos resultantes constituyen la malta húmeda. Se caracteriza por poseer altos contenidos de proteínas, un interesante valor energético y contenido de agua cercano al 70 %. Estas propiedades hacen que el producto sea muy fácil de fermentar si se le dan las condiciones aeróbicas necesarias para ello, por lo que si no se va a utilizar en un breve período, no mayor de cinco días, es necesario ensilarla para prevenir el deterioro. La malta húmeda es bien aceptada por los animales luego de un corto período de acostumbramiento, al poseer altos contenidos de proteínas, le confiere atributos para ser utilizada en rumiantes de altos requerimientos, como los terneros destetados precozmente y las vacas lecheras de alta producción. En ensayos de producción de leche se comportó satisfactoriamente, permitiendo aumentar un 12 % en la producción de leche y un 17 % en la producción de proteínas cuando se utilizó en reemplazo de forrajes de mediana calidad (Garciaarena, 2010).

Por otra parte, su inclusión permite disminuir la utilización de concentrados con rendimientos similares, en cuanto a producción, del orden de 23 litros por día, y manteniendo sin modificaciones la composición de la leche. En diversos experimentos de investigación en aspectos nutritivos y de producción de carne y leche, se ha recurrido a un amplio rango de niveles de utilización de malta húmeda, llegando al 100 %. En estos ensayos no se observaron disturbios digestivos derivados de la inclusión de malta húmeda. En este aspecto se hace hincapié en la necesidad de atender los requerimientos de los animales a alimentar, contemplando los niveles de producción de carne o leche esperados, efectuando un correcto balance de nutrientes (Garciaarena, 2010).

Dado al alto contenido de proteínas, existe un cierto temor a la incorporación de cantidades importantes de este subproducto, debido a que se ha demostrado que dietas muy ricas en proteínas provocan altas concentraciones de amonio en rumen, compuesto que luego pasa al torrente sanguíneo. Este proceso puede aumentar el requerimiento de energía, ya que ésta es necesaria para la detoxificación del amonio a nivel hepático (Garciaarena, 2010).

En experiencias realizadas en Argentina, se informa que la suplementación con 60 % de malta húmeda eleva los contenidos de amonio en rumen como para satisfacer los requerimientos de los microorganismos ruminales. Sin embargo, los niveles obtenidos son muy inferiores a los observados en animales que pastorean forrajes con altos contenidos de proteínas, como son alfalfas, tréboles y gramíneas fertilizadas con altas dosis de nitrógeno. Esta situación se debe, fundamentalmente, a dos aspectos: en primer lugar, si bien la proteína de la malta húmeda posee una mediana degradabilidad, la cantidad de proteína que se degrada en las primeras horas no es tan elevada, y en segundo lugar, la malta húmeda posee un tamaño de partícula pequeño y un alto peso específico, lo que determina que el alimento permanezca poco tiempo en el rumen. Estas características hacen que gran parte de las proteínas no son degradadas por los microorganismos y, de esta manera, los aminoácidos del

alimento son absorbidos como tales en el intestino delgado (proteína "by pass") (Garciaarena, 2010).

Por lo general la malta húmeda es llevada al campo del productor por medio de camiones de volteo que transportan alrededor de 25 toneladas, por lo que se deben tener en cuenta las formas de almacenamiento y conservación, antes que el alimento llegue al establecimiento. Si bien la malta húmeda se puede suministrar fresca, recién extraída de las salas de cocimiento, es muy común que al menos una parte del producto deba permanecer en el establecimiento durante lapsos variables antes de ser utilizado. Por esta razón es imprescindible recurrir a algún sistema de conservación anaeróbico, sellando herméticamente el producto para impedir la entrada de aire. Este procedimiento permite que el alimento se conserve por varios meses con mínimas alteraciones (Garciaarena, 2010).

La conservación del material, que es muy sencilla, puede realizarse mediante silos construidos en lugar alto directamente sobre el suelo, tapando con una manta plástica de 200 micrones resistente a agentes climáticos. Posteriormente se sellan todos los bordes con tierra de forma que no permita la entrada de aire. Si se observa que el plástico tiene movimiento por acción del viento es señal de que el sellado no fue eficiente y, en este caso, es imprescindible corregir el defecto a la mayor brevedad. Si el tapado no es adecuado se producen fermentaciones aeróbicas que conducen a pérdidas en su valor nutritivo e, incluso, a la putrefacción del producto (Garciaarena, 2010).

El bagazo de cerveza ó masilla (Figura 1), es un subproducto rico en proteína, siendo su contenido proteico medio de un 24-26% sobre materia seca (Cuadro 1). El extracto etéreo representa un 6%. Es un subproducto rico también en fibra, con un contenido en FND del 44% y en FAD del 20%, aunque se trata de un fibra muy poco efectiva (18%). El contenido en lignina es de un 5% y el de cenizas de un 7%. En el residuo mineral destaca el contenido en P (6 g/kg), siendo más bajo (3 g/kg) el contenido en Ca (Calsamiglia, 2004).

El contenido en energía metabolizable de este subproducto es de 2.86 Mcal/kg. La degradabilidad efectiva de la proteína es baja (50%), siendo la velocidad de degradación de un 7 %/h. Se trata pues de un alimento de elevado contenido proteico, siendo ésta una proteína que escapa, en buena parte, de la degradación ruminal (Calsamiglia, 2004).



Fuente: Universidad de Córdoba, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria. España

Figura 1. Bagazo o masilla de cervecería

Cuadro 1. Valores nutricionales de la masilla de cerveza

Composición Química (%)

Humedad	Cenizas	PB	PB-FND	PB-FAD	EE
75.70	3.53	27.00	8.92	2.70	8.00

Grasa Verd. (%)	FB	FND	FAD	LAD	CNF	Almidón	Azúcares	pH
45.00	17.60	50.10	20.40	4.08	13.80	8.84	--	4.15

Perfil de Ácidos Grasos

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C≥20
% Grasa Verdadera	1.20	22.20	--	1.50	12.00	55.40	5.60	--
% Alimento	0.50	0.80	--	0.05	0.43	1.99	0.20	--

Minerales %

Ca	P	Na	Cl	Mg	K	S
0.26	0.52	0.01	0.14	0.15	0.08	0.33

Valor Energético (Kcal/kg), en rumiantes

EM1	ENI1	UFI2	UFc2	EM3	ENm3	ENc3
2.86	1.84	1.04	0.97	2.72	2.08	2.71

1EM y ENI a ingestión 3 veces el mantenimiento según NRC (2001); 2Según INRA (1988); según NRC (1996).

Valor Proteico (%), en rumiantes

Degradabilidad del N	Digest. Intest. PB Indegrad.	PDIA	PDIE	PDIN	Lys (%PDIE)	Met (%PDIE)
50	70	12.8	16.9	19.2	5.2	1.6

Fuente: Calsamiglia, 2004

Levadura

La levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) (Figura 2), una de las levaduras más usadas y ampliamente comercializada, es rica en proteínas (40-45 %), (Cuadro 2), de alto valor biológico y abundante en vitaminas del complejo B, como biotina, niacina, ácido pantoténico y tiamina, entre otras (Nagodawithana, 1991 y Aghdamshahriar *et al.*, 2006; Reed).

Debido al incremento en la utilización de la levadura de cerveza en la alimentación del ganado, por sus múltiples aportes favorables, las investigaciones a nivel mundial, se han orientado a verificar los efectos de cada uno de los componentes de *Saccharomyces cerevisiae*. Uno de los procesamientos más comunes incluye la realización de autólisis, y por acción de enzimas endógenas, se rompe la pared celular y se libera el protoplasma, obteniéndose entonces extracto (E) y pared celular (PC) (Perdomo *et al.*, 2004).

La PC de la levadura está compuesta principalmente de complejos de polímeros de β -glucanos, α -mananos, manoproteínas y en menor cantidad quitina. Los mananos y manoproteínas representan el 30-40 % de la pared

celular y determinan las propiedades de la superficie celular (Zhang *et al.*, 2005 y Smits *et al.*, 1999).

Cuadro 2. Características químicas y nutritivas (base materia seca) de la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*)

Característica	Cantidad
Materia Seca	15 %
Energía Bruta	4.623 kcal/Kg.
Energía Digestible	3.795 kcal/Kg.
Energía Metabolizable	3.392 kcal/Kg
Grasa Bruta	1.90 %
Fibra Bruta	3.00 %
Azúcares	7.40 %
Proteína	88 %
Proteína Bruta	47.00 %
Lisina	3.60 %
Metionina	0.75 %
MET-CIS	1.30 %
Triptófano	0.59 %
Treonina	2.37 %
Calcio	0.15 %
Fósforo Total	1.50 %

Fósforo Disponible	0.97 %
Proteína Degradable	24.44 %
Proteína By Pass	22.56 %
Fibra Neutro	7 %
Detergente	
C.N.F.	42 %
U.F.L	0.95 %

Fuente: www.poballe.com

Variantes de la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Levadura Activa.

Levadura viable con un conteo de 10 mil a 20 mil millones de células vivas por gramo, esta levadura se utiliza principalmente como probiótico, algunas de sus funciones en cerdos son:

- ✓ Promotor de crecimiento.
- ✓ Mejores camadas.
- ✓ Aumenta la producción de leche materna.
- ✓ Mayor ganancia de peso.
- ✓ Cambio de alimentos más rápidos.
- ✓ Reduce el exceso de amoniaco en el intestino de los cerdos.
- ✓ Acción estimulante de la inmunidad.
- ✓ Mejora la asimilación de nutrientes.
- ✓ Corrige el balance de la población microbiana.

Levadura Inactiva. Esta levadura, tiene casi nula viabilidad, prácticamente 1.0×10^2 células vivas por gramo. El hecho de hacerse inactiva es para aprovechar otras bondades cuando es fermentada a pH bajo, como es el ser apetecible por ciertas especies que no toleran fácilmente consumir alimentos de origen vegetal (felinos, caninos, entre otros.).

- ✓ Cuando ha sido fermentada a pH bajo es un excelente potenciador de sabor.
- ✓ Fuente natural rica en proteínas - Mejora la palatabilidad del alimento.
- ✓ Una fuente natural de vitaminas B.
- ✓ Buen equilibrio de aminoácidos esencial, con niveles altos de lisina.
- ✓ Es un buen complemento del alimento balanceado.
- ✓ Aumenta la calidad cuando se mezcla en la fabricación de Pellets, induciendo las siguientes ventajas:
 - ✓ Reduce pérdida de alimento.
 - ✓ Reduce la pérdida de energía por animales.
 - ✓ Aumenta la digestibilidad de los nutrientes.

Levadura Inactiva Enriquecida. En esta levadura lo que se trata de aprovechar principalmente, es que esta enriquecida orgánicamente con algún micro mineral, lo que se traduce, es una mejor biodisponibilidad de éste, hay una mejor retención del micro mineral orgánico que el inorgánico, además que hay una menor posibilidad de intoxicación, siempre y cuando se aplique a las dosis recomendadas. En estas levaduras podemos encontrar las enriquecidas con selenio, cromo, hierro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, etc.



Figura 2: Levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleada para la investigación.

Aplicaciones Biotecnológicas

La biotecnología es la tecnología basada en la biología, especialmente usada en el sector agropecuario, farmacia, ciencia de los alimentos, medioambiente y medicina. Es el empleo de organismos vivos (Figura 3), para la obtención de algún producto o servicio útil para el hombre (Muñoz, 2006).

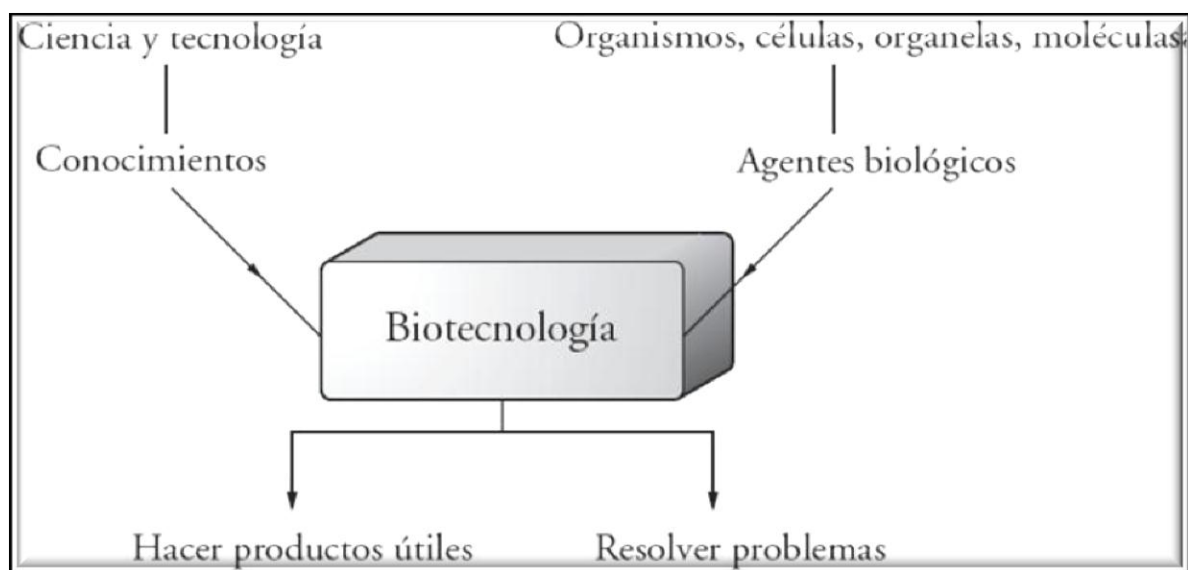


Figura 3. El campo de la Biotecnología

Así, la biotecnología tiene una larga historia, que se remonta a la fabricación del vino, el pan, el queso y el yogur. El descubrimiento de que el jugo de uva puede transformarse en vino, que la leche puede convertirse en yogur, o que se puede hacer cerveza fermentando soluciones de malta y lúpulo fue el comienzo de la biotecnología, hace miles de años. Aunque en ese entonces los hombres no entendían cómo ocurrían estos procesos, podían utilizarlos para su beneficio. Estas aplicaciones constituyen lo que hoy se conoce como biotecnología tradicional y se basa en el empleo de los microbios o de los productos que ellos fabrican (Muñoz, 2006).

Ahora los científicos comprenden en detalle cómo ocurren estos procesos biológicos, conocen bien a los microbios involucrados y a las sustancias que son capaces de fabricar. Efectivamente, los microbios producen compuestos químicos y enzimas que hoy se emplean eficientemente en la fabricación de

detergentes, la manufactura de alimentos y la obtención de medicamentos (Muñoz, 2006), como así también en varias industrias (Cuadro 3).

Cuadro 3. Productos y servicios de origen biotecnológico en diferentes sectores.

Sector	Tipos de productos o servicios
Energía	Etanol, biogás y otros combustibles (a partir de biomasa).
Industria	Butanol, acetona, glicerol, ácidos, vitaminas, etcétera. Numerosas enzimas para otras industrias (textil, detergentes, etcétera).
Medio ambiente	Recuperación de petróleo, biorremediación (tratamiento de aguas residuales y de basura, eliminación de contaminantes).
Agricultura	Abono, silaje, bioinsecticidas, biofertilizantes, plantines libres de enfermedades, plantines de árboles para reforestación. Plantas con nuevas características incorporadas (transgénicas) para mayor valor nutritivo, resistencia a plagas y a condiciones de cultivo adversas (sequía, salinidad, etcétera).
Pecuaria	Embriones, animales con características nuevas (transgénicos), vacunas y medicamentos para uso veterinario, hormonas.
Alimentación	Panificación (panes y bizcochos), lácteos (quesos, yogures y otras bebidas lácteas), bebidas (cervezas, vinos y bebidas destiladas) y aditivos diversos (salsa de soja, glutamato de sodio, edulcorantes, etc.); proteína unicelular (PUC) para raciones, alimentos de origen transgénico con propiedades nuevas.
Salud	Antibióticos y medicamentos para diversas enfermedades, hormonas, vacunas, reactivos y pruebas de diagnóstico, etcétera.

Fuente: Muñoz, 2006

La biotecnología moderna, en cambio, surge en la década de los 80 del siglo pasado, y utiliza técnicas, denominadas en su conjunto “ingeniería genética”,

para modificar y transferir genes de un organismo a otro. De esta manera es posible producir insulina humana en bacterias y así mejorar el tratamiento de la diabetes (Muñoz, 2006). Por ingeniería genética también se fabrica la quimosina, enzima clave para la fabricación del queso y que evita el empleo del cuajo en este proceso (Muñoz, 2006).

La ingeniería genética también es hoy una herramienta fundamental para el mejoramiento de los cultivos vegetales. Por ejemplo, es posible transferir un gen proveniente de una bacteria a una planta, tal es el ejemplo del maíz Bt (Muñoz, 2006). En este caso, los bacilos del suelo fabrican una proteína que mata a las larvas de un insecto que normalmente destruyen los cultivos de maíz. Al transferirle el gen correspondiente, ahora el maíz fabrica esta proteína y por lo tanto resulta refractario al ataque del insecto.

Las biotecnologías ganaderas en los países en desarrollo

El ganado contribuye directamente a los medios de vida de las personas de todo el mundo, al proporcionar no sólo alimentos sino también otros productos, fuerza de tiro y seguridad financiera. La producción ganadera representa ya más de un tercio del producto interno bruto (PIB) agrícola en los países en desarrollo y se prevé que esta proporción seguirá aumentando (FAO, 2010). El rápido crecimiento de la demanda de productos pecuarios, conocido como la "revolución ganadera", ha creado oportunidades para aumentar el bienestar de al menos parte de los casi 1,000 millones de personas pobres cuyos medios de vida dependen de la ganadería. Sin embargo, la degradación de las tierras, la contaminación ambiental, el recalentamiento mundial, la erosión de los recursos zoogenéticos, la escasez de agua y las nuevas enfermedades presentarán previsiblemente obstáculos al crecimiento del sector pecuario mundial (FAO, 2010).

Las tecnologías convencionales y las biotecnologías ganaderas han contribuido enormemente al aumento de la productividad, particularmente en los países desarrollados, y pueden ayudar a mitigar la pobreza y aliviar el hambre,

reducir las amenazas que presentan las enfermedades y conseguir la sostenibilidad ambiental en los países en desarrollo. Existe un amplio abanico de biotecnologías que ya se han usado en países en desarrollo en cada uno de los tres sectores principales de la zootecnia, que pueden categorizarse como la reproducción animal, la genética y el mejoramiento; la nutrición y la producción animal; y, en fin, la sanidad animal (FAO, 2010).

Las biotecnologías de nutrición y producción animal se basan a menudo en el uso de microorganismos, incluidos los producidos por medio de la tecnología del ADN recombinante. Se emplean tecnologías de fermentación para producir nutrientes (como determinados aminoácidos esenciales o proteínas completas) o para mejorar la digestibilidad de los piensos. Se usan cultivos microbianos para incrementar la calidad del ensilado o mejorar la digestión, cuando se suministran como alimentos probióticos. Se han obtenido bacterias recombinantes para producir enzimas y hormonas específicas que mejoran el aprovechamiento de los nutrientes, lo que puede aumentar la productividad (por ejemplo, la somatotropina) o reducir las repercusiones ambientales (por ejemplo, la fitasa). Para aumentar la productividad del ganado y reducir los contaminantes ambientales se han utilizado también enzimas que causan la degradación de la fibra (FAO, 2010).

Aunque hay poca información, los aminoácidos y las enzimas parecen ser los productos biotecnológicos relacionados con la alimentación más corrientes e importantes empleados en los países en desarrollo. La India y China han creado industrias nacionales para producirlos. Varios factores han limitado el uso de otras aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, la producción de ensilado no es común, lo que impide el uso de cultivos microbianos. La utilización de la somatotropina ha sido afectada por la escasa aceptación pública, la falta de piensos adecuados y de buena calidad y el bajo potencial genético de los animales en los países en desarrollo. La fermentación de materias lignocelulósicas para mejorar la calidad de los residuos de los cultivos y los forrajes no ha sido demasiado efectiva (FAO, 2010).

Hipótesis

Es posible la creación de prospectivas biotecnológicas a partir del aislamiento e identificación de bacterias del rumen en vacas Holstein.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa I

Acondicionamiento de los Animales: los mismos fueron provenientes del establo lechero, propiedad de la U.A.A.A.N. Se utilizaron 32 vacas de diferentes números de parto de la raza Holstein con 550 kg de peso promedio, las vacas fueron alojadas en un área que cuenta con, corrales individuales acondicionados con comederos y patio de ejercicio en el cual se encuentra el bebedero. Se sometieron a un periodo de adaptación de 15 días previos al parto y al inicio de la prueba de alimentación, las dietas a evaluar se les proporcionaron gradualmente en un 25, 50, 75 y 100 %. Una vez adaptadas las vacas a las dietas de cada tratamiento la alimentación duró 120 días.

Las dietas se formularon en base a las recomendaciones del NRC (2001) para ganado lechero y las cuales fueron isoproteicas e isoenergéticas. Las dietas estuvieron integradas a base de alfalfa, sorgo rolado, semilla de algodón, harinolina, salvadillo, ensilaje de maíz, premezcla de minerales traza, calcio y bicarbonato de sodio (cuadro 4).

Cuadro 4. Dietas experimentales utilizando subproductos de cervecería.

Ingrediente	T1	T2	T3	T4
Sorgo rolado	38.59	30.09	28.93	34.33
Salvadillo	5	5	4	5
Harinolina	12.11	8.61	6.77	8.37
S. algodón	13	13	13	13
Silo maíz	5	5	5	5
Heno avena	0	0	0	0
Alfalfa	25	23	22	24
Masilla	0.00	14	13	0
Levadura	0.00	0	6	9
Prem. Minerales	0.60	0.6	0.6	0.6
Bicarbonato	0.70	0.7	0.7	0.7

Fuente: Montero, 2009

Las dietas se ofrecieron en un sistema integral totalmente mezclado (TMR), preparadas en un carro mezclador vertical de 760 m³. El ganado se alimentó tres veces al día 7 am, 12 pm y 4 pm, distribuyéndose la dieta en 50, 30, y 20 %, respectivamente. Se ofreció 10 % más del consumo previsto de la dieta (3.6 % PV).

Las dietas se formularon en programación lineal elaborada en Excel (Microsoft Windows, 2007), al 18 % de PC y con 1.71 ENI para satisfacer los requerimientos establecidos de NRC 2001, de 35 kg de leche, con 3.5 % de grasa y 3.2 % de proteína.

Los trabajos de campo del proyecto fueron realizados en el establo lechero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, el cual se encuentra ubicado a un lado de la carretera Saltillo – Zacatecas, a 7 Km. al Sur de Saltillo, Coahuila en las coordenadas terrestres 25° 22' de latitud Norte y 101° 0' de

longitud Oeste, con una altura de 1742 msnm, tiene una temperatura media anual de 19.8°C y una precipitación media anual de 350 mm (régimen de lluvias de mayo a octubre) (Mendoza 1994). El clima de la región según García (1974), corresponde a un clima muy seco estepario, lluvias escasas todo el año y extremo.

Esta etapa de Pre acondicionamiento culminó con la obtención de líquido ruminal al finalizar el período de alimentación de 120 días. Se obtuvieron muestras de contenido ruminal de las vacas y vaquillas anteriormente mencionadas, mediante una sonda oro-ruminal conectada a una bomba de vacío, las cuales fueron transportadas en contenedores cerrados herméticamente y en condiciones anaeróbicas por medio de la presencia de agentes reductores o en jarras de anaerobiosis. El estudio microbiológico de las muestras recolectadas se realizó lo más pronto posible para evitar la modificación de las proporciones en las que se encuentran las poblaciones microbianas in vivo.

Así también es importante señalar que las cepas están condificadas con relación a los tratamientos de la siguiente manera: VC= T1, VAM= T2, VML= T3 y VLI= T4.

Etapa II

Aislamiento e identificación macroscópica, microscópica, bioquímica y molecular de bacterias ruminales:

Aislamiento de Microorganismos en Agar Nutritivo (AN)

El aislamiento se realizó en medio sólido para que los microorganismos cultivados se pudieran diferenciar de acuerdo a sus características macroscópicas. Se preparó el AN (BIOXON) de la siguiente manera: se diluyeron 23 g de agar, en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizó y se esterilizó en una autoclave (PRESTO) a 121 ° C y 15 Lb de presión por 15 min. Se vaciaron de 15 a 20 mL de AN en cajas Petri.

Posteriormente se tomaron 0.5 mL de líquido ruminal y se sembraron en las cajas, con la ayuda de un asa de Digrasky.

En una campana de flujo laminar (Figura 4), previamente esterilizada, las cajas fueron incubadas (ARSA) a 39 - 40°C en condiciones anaeróbicas para lo cual se empleó una cámara de anaerobiosis con atmósfera de nitrógeno y mezcla de gases de nitrógeno: hidrógeno: dióxido de carbono (80:10:10) (Figura 5) y/o jarras anaerobiosis (Figura 6). El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se observó crecimiento favorable de los microorganismos registrando características macroscópicas de la colonia y realizando tinciones de Gram para la definición de características microscópicas.

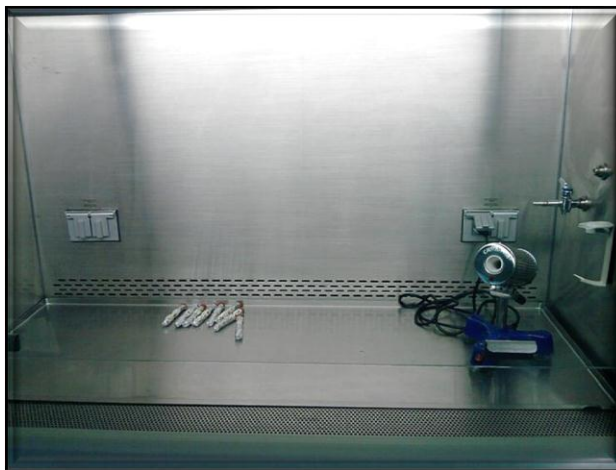


Figura 4. Área de trabajo para inoculación de las muestras en campana de flujo laminar.

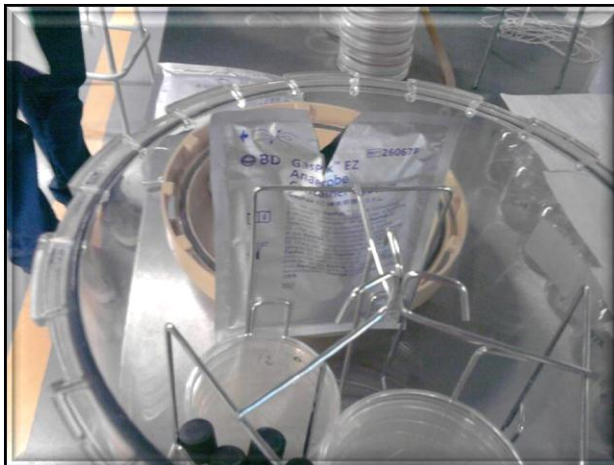


Figura 5. Bolsa para crear anaerobiosis.



Figura 6. Jarra de anaerobiosis utilizada para dar ambiente propicio a los microorganismos del rumen bovino.

Caracterización Macroscópica de las Especies Bacterianas Aisladas en AN

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se registraron las características macroscópicas de las colonias, en donde se consideró, tipo de borde, color, translucidez, forma y consistencia entre otras características.

Aislamiento de microorganismos en AS (Agar Schaedler)

Se preparó un medio comercial AS (DICKINSON) de la siguiente manera: se diluyeron 41.9 g de agar, en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se

solubilizó (se llevó a flama de mechero para su disolución hasta coloración cristalina) y se esterilizó en una auto clave (121°C-15 lb-15 min). Se vaciaron 15 – 20 mL de (AS) en las cajas Petri.

Posteriormente se tomaron 0.5 mL de líquido ruminal y se sembraron en las cajas, con la ayuda de un asa de Digrasky. Las cajas fueron incubadas a 39 - 40°C en condiciones anaerobias (jarra de anaerobiosis). El tiempo de incubación dependió del tiempo en que se observó crecimiento uniforme de los microorganismos procariotas; se revisaron cada 24 hrs.

Caracterización macro y microscópica de las especies bacterianas aisladas en AS

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se registraron las características macroscópicas de las colonias considerando los mismos factores mencionados anteriormente en la identificación macroscópica para AN, y por medio de la técnica de tinción de Gram (anexo 1) se definieron las características microscópicas.

Identificación del metabolismo microbiano

Una vez obtenidas las cepas puras se les realizó la identificación bioquímica. Las pruebas bioquímicas son un método utilizado para la identificación de bacterias de acuerdo a las características que presenta en sus acciones metabólicas. El agar se prepara en forma de pico de flauta. Esto determina que existan dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada (pico) expuesta en toda sus superficie al oxígeno es aerobia y la porción inferior (fondo) está protegida del aire y es relativamente anaerobia (anexo 2).

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron:

Citrato de Simmons. En tubos de ensaye, se vaciaron 4 mL de Citrato de Simmons (BIOXON) (24.2 g de citrato en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inocularon y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se

monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire en el color del medio.

Agar de Hierro y Lisina. En tubos de ensaye, se vaciaron 4 mL de agar Hierro y Lisina (33 g de agar en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inocularon y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color.

Caldo Urea. En tubos de ensaye, se vaciaron 4 mL de Urea (3.87 g de agar en 100 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inoculó 0.4 mL y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color.

Agar MIO. En tubos de ensaye, se vaciaron 4 mL de Agar Mio (31g de agar en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); Posteriormente se inoculó 0.4 mL y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color

Agar SIM. En tubos de ensaye, se vaciaron 4 mL de Agar SIM (30g de agar en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inoculó y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color.

Agar MacConkey. En tubos de ensaye, se vaciaron 5 mL de Agar MacConkey (BIOXON) (50 g de agar en 1000 mL de agua destilada, solubilizar y esterilizar); se inclinaron en forma de pico de flauta. Posteriormente se inocularon y se realizó anaerobiosis en las jarras para incubar 40° C. Se monitorearon cada 24 horas hasta observar cambio de vire de color (Anexo 2).

Identificación Molecular

Preparación de las Muestras. Cada una de las 38 cepas, fueron resembradas en un medio líquido, el cual fue Tioglicolato de Na (sodio), medio con indicador de presencia de oxígeno. La resiembra se realizó de cajas Petri con cultivos puros, anteriormente constatada la pureza de cada una mediante tinción de Gram. Se dejaron incubar por 24 horas en el medio líquido. Después de estos pasos las muestras quedaban listas para la extracción de ADN.

Técnica de extracción de ADN utilizada para bacterias Gram negativas. Se probaron varias técnicas pero la que mejor resultó para bacterias Gram negativas fue la CTAB (Rodriguez, 2010), para la cual se extrajo 1 mL de la muestra a utilizar, luego se vació en tubos ependorff de 1.5 mL. Se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 14,000 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. A la pastilla, resultado de la centrifugación, se le agregó 1 mL de agua destilada desionizada estéril (agua DDE). Luego se dio un periodo de vortex (Labnet, serial #: Z805500) (Figura 18), hasta que la pastilla se disolviera totalmente, es decir, hasta que el agua se vea turbia y pareja. Se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 14,000 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Posteriormente Se repitieron los pasos desde la cetrifugación con agua DDE, lo que resultó realizar dos lavadas de las células. Una vez que se haya descartado el sobrenadante de la segunda lavada, se agregó 1 mL de CTAB (Anexo 5). Se aplicó vortex (Labnet, serial #: Z805500) (Figura 18), hasta que se mezclara en forma adecuada y uniforme. Luego se dio baño maría (Eppendorf, Thermomixer, Serial #: 535021311) (Figura 8) a 65°C por 25 minutos. Se agregó 20 µL de albumina sérica bovina al 20% (Anexo 6). Se dió un período de vortex (Labnet, serial #: Z805500) (Figura 18) hasta que la pastilla se disuelva. Se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 12,000 RPM por 5 minutos. Se rescató el sobrenadante aproximadamente 800 µL, al cual se le agregó 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) (Anexo 7). Se mezcló por inversión suave por 1 minuto. Se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7) a

12,000 RPM por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante, se vuelve a recuperar 800 μ L y se repitieron los pasos desde el pasos. Luego se agregó acetato de amonio 7.5 M, en una cantidad del 10% del sobrenadante que se tomó en el paso "p", también se agregaron 2 volúmenes de etanol frio al 96%. Se mezcló por inversión suave, luego se incubó a -20°C por 3 horas. Posterior a eso se Centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 12,000 RPM por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 15 minutos la pastilla que quedó. Luego la pastilla fue lavada con etanol al 70%, 1 mL, mediante inversión suave, si la pastilla se desprendía era centrifugada a 8,700 RPM por 5 minutos. Se decantó y se dejó secar la pastilla totalmente. Se resuspendió la pastilla en 50 μ L de agua DDE. Posterior a esto se refrigeró a 4°C , por 12 horas como mínimo antes de correr el gel para comprobar si la extracción fue la deseada. Después de las 12 horas como mínimo antes de hacer correr el gel se le agregaba ARNasa. Se corría en un gel de agarosa al 1% (Figura 9), con bromuro de etidio (en 30 mL de gel 6 μ L) en una cámara de electroforesis horizontal (Figura 10). Se observaba en una cámara con luz ultravioleta (Mini cuarto oscuro: UVP, modelo: GDS-8000 System; Transiluminador ultravioleta: Spectroline, modelo: TVC-312R) (Figura 11), los geles corridos de tal manera a ver si la extracción era la deseada, de caso contrario se debía hacer de nuevo la extracción.



Figura 7: Centrífuga utilizada en Biología Molecular.



Figura 8: Termomixer utilizada para dar temperatura al proceso de extracción.

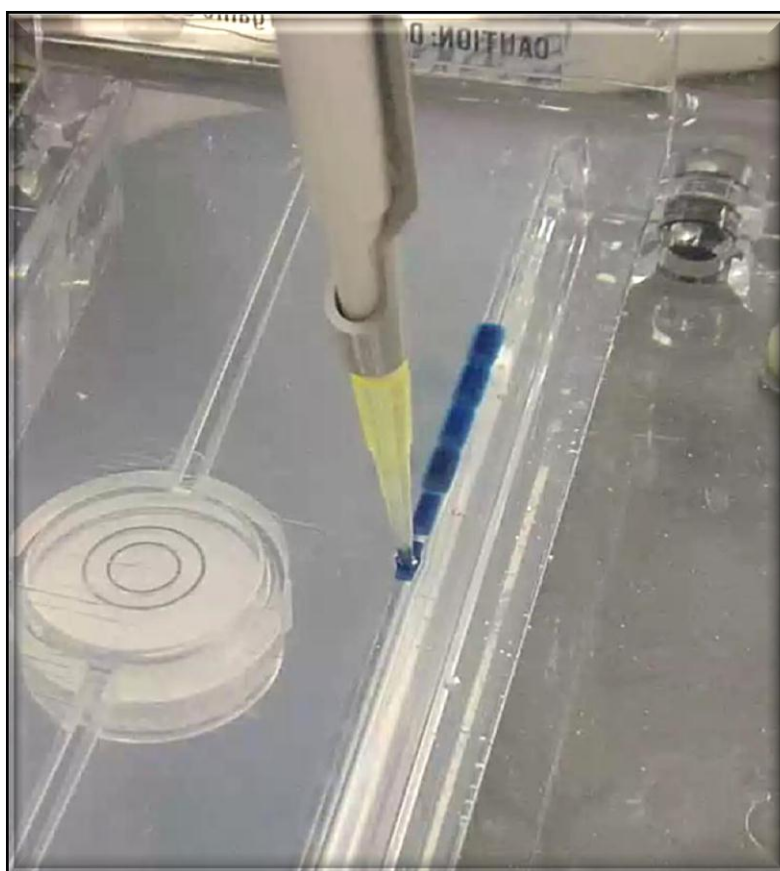


Figura 9: Gel de Agarosa.



Figura 10: Cámara de electroforesis horizontal.



Figura 11: Mini cuarto oscuro unido a un Transiluminador Ultravioleta

Técnica de extracción de ADN utilizada para bacterias Gram positivas

La técnica que tuvo mejor resultado para extraer bacterias gram positivas fue la utilizada en la Universidad Autónoma de Coahuila en el departamento de investigación en alimentos, en el laboratorio de biología molecular (Rodríguez, 2010), la cual se puede observar en el manual de laboratorio de dicho lugar. Se extrajo 1 mL de la muestra a utilizar, luego se vació en tubos ependorff de 1.5 mL. Se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 14,000 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. A la pastilla, resultado de la centrifugación, se le agregó 1 mL de agua destilada desionizada estéril (agua DDE). Se dio un periodo de vortex (Labnet, serial #: Z805500) (Figura 18), hasta que la pastilla se disolviera totalmente, es decir, hasta que el agua se viera turbia y pareja. Luego se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 14,000 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Se repitieron los pasos desde agregar 1 mL de agua DDE, lo que resultó realizar dos lavadas de las células. Se enfrió la pastilla a -20°C por 1 hora, luego se agregó 10 μl de acetona fría y se metió al congelador a -20°C por 10 minutos. Se agregó 500 μl de TE 1X (Anexo 8) + 50 μl EDTA (Anexo 9) 0.5 M + 50 μl SDS 14% (Anexo 10) + 10 μl proteinasa K 0.1% (Anexo 11), mezclar mediante vortex (Labnet, serial #: Z805500) (Figura 18), hasta que se vea un líquido homogéneo, e incubar a 55°C por 1 hora o toda la noche a 37°C . Posterior a esto se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 10,000 RPM por 5 minutos. Luego se separó la fase acuosa y se procedió a agregar medio volumen de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1). Para luego mezclar por inversión. Después se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7), a 17,310g (gravidades) por 20 minutos. Más tarde se separó la fase acuosa y se agregó 1 volumen de isopropanol, la cual se Mezcló por inversión. Luego se Incubó a -20°C / toda la noche (por más de 12 horas). Se centrifugó (Labnet, modelo: Spectrofuge 24 D, Serial #: D011854) (Figura 7) a 10,000 RPM por 5 minutos. Las pastillas fueron lavadas con etanol helado al 70% (el número de lavadas dependió de la contaminación presente en la pastilla). En seguida se

decantó el alcohol y se dejó evaporar los residuos. Y por último se resuspendió la pastilla en 70 μ l de TE 0.1X (Anexo 12) y se esperó a que se disuelva antes de correr gel de electroforesis. Se corría en un gel de agarosa al 1% (Figura 14), con bromuro de etidio (en 30 mL de gel 6 μ L), en una cámara de electroforesis horizontal (Figura 10). Se observaba en una cámara con luz ultravioleta (Mini cuarto oscuro: UVP, modelo: GDS-8000 System; Transiluminador ultravioleta: Spectroline, modelo: TVC-312R) (Figura 11), los geles corridos, de tal manera a ver si la extracción era la deseada, de caso contrario se debía hacer de nuevo la extracción.

Elaboración de PCR para secuenciar. Para poder llegar a la secuencia de las muestras se utilizó la técnica de PCR (Mullis *et al.*, 1986), la cual es una técnica de biología, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; se parte de una única copia de ese fragmento original, o molde. Su utilidad es que tras la amplificación resulte mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad lo que posea ADN o bien hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Para tal técnica se consideraron las cantidades de reactivos correspondientes (Cuadro 5), en la mayoría de los casos, pero en las muestras 193-16 VML y 332-1 VLI se tuvo que hacer variar el $MgCl_2$ (50 mM), disminuyéndolo en un 25% y también la modificación se realizó en la cantidad de Taq. polimerasa (5 U/ μ L), aumentándolo en un 25%. Para la preparación de PCR, se elaboró un coctel con todos los reactivos que figuran en el cuadro 5, como también en el cuadro 6 para las dos cepas antes mencionadas, a excepción del ADN, ya que este era agregado una vez que el coctel estaba totalmente preparado y puesto en cada tubo. Es importante mencionar que cada una de las cantidades que figuran en los cuadros eran multiplicadas por la cantidad de tubos o muestras que se iban a preparar. Así también en cada muestra preparada siempre se trabajó con un positivo, negativo y blanco. Luego se colocó 46 μ L de coctel en cada tubo de 0.5 mL y a cada uno de ellos se le adicionó 4 μ L de ADN de las 38 muestras con las que se contaba. Siempre se consideró que tanto la preparación del coctel como la adición del ADN fuera en el menor tiempo posible. Una vez que

se tuvo terminada la preparación de las muestras se procedió a introducir las al termociclador (Axygen Maxygen, Catalog #: Therm-1001) (Figura 12), Los programas utilizados fueron 3 (Cuadro 7), ya que no todas las muestras presentaron bandas específicas en el gel de agarosa, y lo que siempre se buscó fue eliminar bandas inespecíficas (Figura 13) para que la secuencia fuera relevante. La mayoría de las muestras fueron aplicadas en el programa 2, excepto las muestras 193-16 VML y 332-1 VLI, para las cuales se utilizó el programa 1 y también se exceptuaron las muestras 513-5 VML, 513-7 VML, 953-10 VML , 932-3 VLI y 932-4 VLI, para las cuales se utilizó el programa número 3. Es importante mencionar que para el programa 1 y 3 las muestras no fueron introducidas en el precalentamiento del termociclador sino cuando ya alcanzaban los 95°C, lo que se hizo fue dar un choque térmico. Luego de estos pasos, se procedió a hacer correr un gel de agarosa al 1.5%, con bromuro de etidio (en 50 mL de gel 7 µL de bromuro de etidio), para comprobar la calidad del PCR realizado, lo cual tendría que dar bandas únicas y limpias, es decir, sin bandas inespecíficas. Una vez alcanzado el objetivo de PCR, con calidad óptima, los tubos fueron etiquetados y almacenados a -20°C, por lo que quedaron listos para enviarlos a secuenciar.



Figura 12: Termociclador utilizado para realizar el proceso de elaboración de PCR.

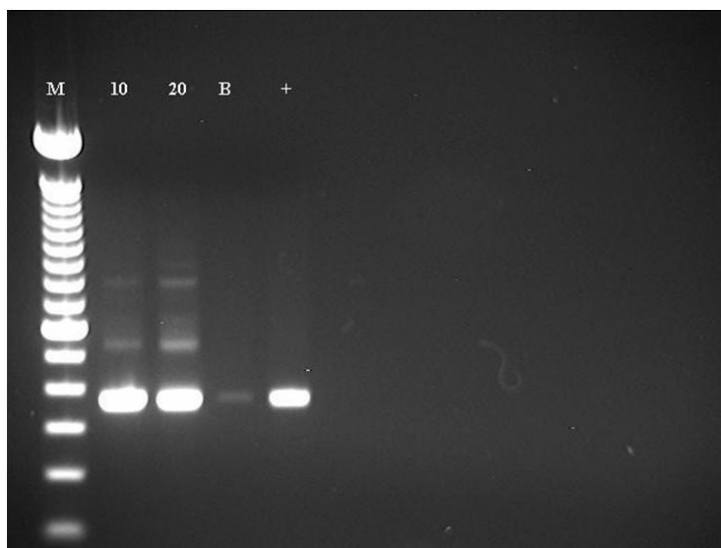


Figura 13: Vista de PCR corrido en un gel de agarosa, con bandas inespecíficas, observada mediante una cámara oscura con luz ultravioleta

Cuadro 5: Cantidad de reactivos para preparación de PCR para 50 μ L de muestra.

Componente	Cantidad (μ L)
Agua DDE	29
Buffer 10X	5
Mg Cl ₂ (50 mM)	2
dNTP's (10mM)	1
Primer derecho (10 m μ / μ L)	4
Primer izquierdo (10 m μ / μ L)	4
Taq.polimerasa (5 U/ μ L)	1
ADN _c	4

Cuadro 6: Cantidad de reactivos para preparación de PCR con variaciones en Mg Cl₂ (50 mM) y Taq-polimerasa (5 U/μL) para 50 μL de muestra.

Componente	Cantidad (μL)
Agua DDE	29
Buffer 10X	5
Mg Cl ₂ (50 mM)	1.5
dNTP's (10mM)	1
Primer derecho (10 mμ/μL)	4
Primer izquierdo (10 mμ/μL)	4
Taq-polimerasa (5 U/μL)	1.25
ADN _c	4

Cuadro 7: Programas utilizados en el termociclador para realizar PCR

Programa	Desnaturalización	Alineamiento			Elongación		
1	1 temperatura (1 ciclo)	3 temp. (30 ciclos)			2 temp. (1 ciclo)		
	Temp.(°C)	95	94	53	72	72	4
	Tiempo (min.)	5	1	1	1	5	∞
2	1 temperatura (1 ciclo)	3 temp. (35 ciclos)			2 temp. (1 ciclo)		
	Temp.(°C)	95	94	55	72	72	4
	Tiempo (min.)	5	1	1	1	5	∞
3	1 temperatura (1 ciclo)	3 temp. (30 ciclos)			2 temp. (1 ciclo)		
	Temp.(°C)	95	94	60	72	72	4
	Tiempo (min.)	5	1	1	1	5	∞

Primers Utilizados. Los Primers utilizados fueron de 16S, los cuales poseen la siguiente secuencia:

- DG74: 16f-5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'
- RW01: 16r-5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'

Secuencia. La secuencia se llevó a cabo mediante una empresa privada (Macrogen Inc.), en este proceso, el único trabajo que se realizó fue acondicionar de acuerdo a los requisitos que pedía la empresa, las muestras y luego enviarlas. La respuesta fue en forma electrónica con las secuencias de las 38 muestras enviadas. Luego se procedió a comparar esos resultados en la página del GenBank.

Etapa III.

Creación de un cepario de bacterias ruminales de bovinos

Una vez que se tuvieron identificados los biotipos del rumen bovino, se procedió a resembrar cada microorganismo por estría abierta cruzada, para que posteriormente se puedan obtener los cultivos puros, para luego pasarlos a tioglicolato. El siguiente paso luego de llegar hasta este punto fue el de liofilizarlos a partir del cultivo puro para su mejor manejo y seguridad, mediante un liofilizador (Labconco, modelo: Freezone 4.5, serial #: 060960176S) (Figura 14), el cual separa el agua de una sustancia, o de una disolución, mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material esponjoso que se disuelve posteriormente con facilidad. Se utiliza en la deshidratación de los alimentos, materiales biológicos y otros productos sensibles al calor. Y como último paso se almacenaron las 38 bacterias ó biotipos mexicanos, encontrados en el rumen bovino.



Figura14: Liofilizador

Etapa IV

Aplicaciones Biotecnológicas de las Cepas Obtenidas

Producción de una Proteasa Cepa 2506-3 VC. La metodología que se empleó para la producción de una proteasa fue la siguiente:

Selección (ensayo). Se eligió una cepa pura (crecimiento homogéneo) codificada con 2506-3 VC, para verificar la degradación de proteínas.

Se diseñó un medio sólido específico empleando como fuente de carbono caseína (cuadro 8). El medio mineral fue esterilizado a 121°C por 15 min y una vez que alcanzó temperatura ambiente, se adicionó la fuente de carbono empleando leche descremada y deslactosada (Lala, tetrapack) agitando suavemente para permitir su homogenización.

Cuadro 8. Composición química del medio sólido específico para el monitoreo de la degradación de la proteína.

Componentes	Cantidad (%)
Agar bacteriológico	2
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de carbono (leche descremada)	1
MgSO ₄	0.01
KH ₂ PO ₄	0.2

Se prosiguió a vaciar el medio en cajas Petri esperando hasta que se solidificara para poder realizar la siembra por estriado e incubando las cajas a 40 °C en condiciones de anaerobiosis por periodos de tiempo de 24 a 96 h o hasta observar crecimiento uniforme; posteriormente se realizó la caracterización macro y microscópica del crecimiento celular.

Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico para Anaerobios (Tioglicolato de Sodio). Se disolvieron 29.5 g de tioglicolato de sodio (TGNa) en 1000 mL de agua destilada posteriormente se solubilizaron y se esterilizaron. En tubos de ensaye (triplicado) con 4 mL de TGNa se inocularon 50 µl de una suspensión celular bacteriana de la cepa; posteriormente se incubaron a 40° C, previamente se realizó anaerobiosis, y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 108, 132, 156 horas. Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) leyendo a una longitud de onda de 590 nm.

Turbidimetría. Este método da información sobre el contenido de macromoléculas, y no sobre el número de células. En el laboratorio de microbiología se usa un espectrofotómetro y se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos en comparación con un blanco que es el medio esterilizado, sin inóculos. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Se cumple una ley similar a la de Lambert-Beer y expresando la relación en términos de masa microbiana y absorbancia, la ecuación es la siguiente:

$$A = k \times W$$

Donde:

A= absorbancia

k= constante

W= masa molecular

Para utilizar la medida de la absorbancia como método de recuento, es necesario hacer para cada microorganismo una curva de calibración, midiendo el número de microorganismo por otro método de recuento. El método se emplea fundamentalmente para preparar inóculos cuando se trabaja con cultivos puros.

Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico para la Producción de la Enzima. Se preparó el medio líquido (cuadro 9) específico para la producción de la enzima proteasa. En un matraz Erlenmeyer se agregaron 150 mL de agua destilada y se disolvieron las sales minerales (NaCl , NaNO_3 , KCl , KH_2PO_4 , MgSO_4) y después se solubilizó y esterilizó, posteriormente una vez que alcanzó la temperatura de $40\text{ }^\circ\text{C}$ se le agregó la fuente de carbono (caseína), y fue mezclado con los demás componentes del medio; se colocaron aproximadamente 3 mL de este medio en tubos de 13x100 hasta su posterior uso.

Se realizó una suspensión celular bacteriana (cada ensayo se realizó por triplicado), vaciando 4 mL de medio específico en un tubo, inoculando 10 μl de suspensión en todos los demás tubos; una vez terminada de hacer la suspensión celular se incubaron los tubos a $40\text{ }^\circ\text{C}$ y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 194 y 216 horas, para posteriormente leer la absorbancia y obtener la velocidad específica de crecimiento, cada muestra que se sacaba de la incubadora inmediatamente se congelaba (Torrey) para inhibir la actividad microbiana.

Cuadro 9. Composición química del medio líquido específico para producir la enzima proteasa.

Componentes	Cantidad (%)
Agar bacteriológico	2
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de carbono (leche descremada)	1
MgSO ₄	0.01
KH ₂ PO ₄	0.2

Determinación de Proteína Extracelular (Enzima) por el Método de Biuret.

Se centrifugaron (SOLBAT) a 4000-5000 rpm por 20 minutos los tubos obtenidos a los diferentes tiempos de fermentación con la finalidad de separar la biomasa y obtener el extracto celular. Se prepararon tubos de 3*100 mL para poder realizar la cinética enzimática se hicieron 2 repeticiones para cada tiempo de reacción (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 minutos) de cada tiempo de fermentación (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas). Se empleó un kit para cuantificación de proteínas totales (RANDOX).

Cinética enzimática. En tubos de ensaye 13x100 mL se agregó 145 µL de sustrato por duplicado, se colocaron en una gradilla a baño María (Napco Model 210^a) con una temperatura controlada de 40±2 Posteriormente se añadieron 5 µL de extracto enzimático a cada tubo y se dejó actuar por tiempos de reacción

de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min; la cinética se detuvo adicionando el reactivo de Biuret para proteínas totales, para posteriormente seguir con la técnica establecida por Randox.

Preparación de Sustrato. Se midieron 0.5 mL de proteína de leche (leche light) la cual fue disuelta en 50 mL de agua destilada y se empleó como solución madre de sustrato a concentración conocida.

Condiciones de la Cinética. Los tubos contenían 145 μ L de sustrato por duplicado, las cuales se colocaron en baño maría (Napco 5Model 210A) controlando la temperatura a 40 °C a las que se les agregó 0.5 μ L de extracto enzimático a los diferentes tiempos de reacción (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min).

Cuantificación de Proteína (enzima) por el Método de Biuret. Se colocaron los tubos con el sustrato en un gradilla y en baño María a 40°C, se les agregó 5 μ l de extracto enzimático al tiempo de reacción que está establecido (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min), esto con la ayuda de las micropipetas calibradas (200/1000, 20/200, 2/20, transferpette y V3) , se sacaron los tubos del baño María una vez que se les agregó el extracto enzimático e inmediatamente se les agregó 500 μ l de reactivo de Biuret, esto para detener la reacción enzimática del microorganismo.

Una unidad de actividad proteasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria en mg/mL de proteína para hidrolizar la caseína (leche descremada) al 1% en un tiempo de 60 minutos.

Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima y el sustrato, se preparó una muestra patrón y una muestra blanco (cuadro 10).

Cuadro 10. Contenido de los tubos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Sustrato	H ₂ O	Extracto enzimático	Biuret
Blanco sustrato	145 µl	5 µl	-	500 µl
Blanco enzima	-	145 µl	5 µl	500 µl
Blanco general	-	150 µl	-	500 µl
Muestras	145 µl	-	5 µl	500 µl

También se preparó un tubo de TP (proteína total) con 10 µl de estándar y 500 µl de Biuret dejándolo en reposo por 30 minutos, y se leyó con una absorbancia de 660 nm para poder obtener el resultado de esta sustancia.

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Tot.} = \frac{A_{\text{muestra}} \times \text{conc. patrón}}{A}$$

Conc. Patrón = 60 mg/mL

A= absorbancia

Producción de Quitosanasa. Ensayo (Screening). En el tratamiento 2 también se eligieron 9 cultivos puros (205-1 VAM, 205-2 VAM, 205-5 VAM, 1502-4 VAM, 1502-6 VAM, 1502-7 VAM, 4906-3 VAM, 4906-5 VAM y 1004-2 VAM) en tubo y se realizaron varios screening para verificar la degradación de quitosán como única fuente de carbono en cada microorganismo.

Medio específico. Se preparó el medio sólido; se disolvieron 18 g de Agar-Agar en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (oligosacáridos de quitosán), de bajo peso molecular previamente disuelta en 100 mL de agua destilada al 1%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Para el tratamiento 1, se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método de tapete en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

Posterior a esto se agregó la fuente de carbono (quitosán), se disolvió en el medio ya preparado al 1%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente. La preparación del buffer para disolver el quitosán se realizó de la siguiente manera: se disolvieron 4.5 g de Agar-Agar en 170 mL de agua destilada, se agregaron 80 mL de buffer ácido acético acetato de sodio 50 mM (AAANa) posteriormente se solubilizaron y esterilizaron.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

Producción de Pectinasa. Ensayo (Screening). Prosiguiendo con el tratamiento 2 se realizaron varios screening con las mismas cepas para verificar la degradación de pectina empleándola como única fuente de carbono en cada microorganismo.

Medio Específico. Se preparó el medio sólido; se disolvieron 18 g de agar-agar en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (pectina), previamente disuelta en 100 mL de agua destilada al 2%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

Producción de Xilanasa. Ensayo (Screening). Para los mismos 9 cultivos puros en tubo del tratamiento 2 se realizaron varios screening para verificar la degradación de xilosa.

Medio específico sólido. Se preparó el medio sólido específico (Cuadro 11); se disolvió 18 g de agar-agar en 1000 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (xilosa), previamente disuelta en 100 mL de agua destilada al 2%, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri. Se sembró cada una de las 9 cepas puras por separado con el método estriado en toda la caja y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis.

Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se compararon las características macro y microscópicas de las colonias.

Cuadro 11. Composición química del medio sólido específico para el ensayo de la degradación de xilosa.

Componente	Cantidad (%)
Agar Agar	18
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	0.3
Cloruro de potasio (KCl)	0.5
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.01
Fuente de carbono XILOSA	2

Inducción de la actividad xilanasa en medio líquido específico. Se prepararon 2 medios de cultivo empleando xilosa como fuente de carbono para la producción de esta enzima, a partir de la cepa 1502-4 VAM, los cuales fueron preparados de la siguiente manera:

- Preparación del medio líquido inductor 1 (Cuadro 12): se disolvieron 0.8 g de caldo nutritivo en 1000 mL de agua destilada, se esterilizó y una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente, se adicionó 0.05 g de la fuente de carbono (xilosa). Cada muestra se corrió por duplicado.

Se realizó un inóculo de 1 mL en tubos que contenían 3.5 mL de medio inductor 1, se incubó por 48 h en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, para separar la biomasa la cual fue re-suspendida nuevamente en medio líquido 1, el cual se aumentó la concentración de xilosa en 0.07g; este paso se repitió hasta alcanzar una concentración de xilosa de 0.5g.

- Preparación del medio líquido inductor 2: se preparó medio mineral el cual contenía NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ (cuadro 13) en 100 mL de agua destilada, adicionando acetato de potasio (0.01 g) como fuente alterna de carbono: el medio se esterilizó y una vez que alcanzó la temperatura de 25°C se adicionó la xilosa como fuente de carbono en una concentración de 0.059 g/ 3.5 mL.

Se realizó un inóculo de 1 mL en tubos que contenían 3.5 mL de medio inductor 2, se incubó por 48 h en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, para separar la biomasa la cual fue re-suspendida nuevamente en medio mineral 2, el cual se aumentó la concentración de xilosa en 0.065 g y se disminuyó la de acetato en 0.0035 g; este paso se repitió hasta alcanzar una concentración de xilosa de 0.07g y eliminar por completo la fuente alterna de acetato de potasio. Finalmente se realizó una caracterización macro y microscópica para cerciorarse que la morfología coincidiera con la cepa original.

Cuadro 12. Composición química del medio líquido inductor 1 para la degradación de xilosa.

Componente	Cantidad (%)
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.5
Nitrato de Sodio (NaNO ₃)	0.3
Cloruro de Potasio (KCl)	0.5
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.01

Curva de crecimiento en medio líquido de tioglicolato de sodio para la cepa 1502-4 VAM. Se disolvieron 29.5 g de tioglicolato de sodio (TGNa) en 1000 mL de agua destilada posteriormente se solubilizaron y se esterilizaron. En tubos de ensaye (triplicado) con 3.5 mL de TGNa se inocularon 50 µl de una suspensión celular bacteriana de la cepa inducida; posteriormente se incubaron a 40° C, previamente se realizó anaerobiosis, y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 108, 132, 156 horas.

Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) leyendo a una longitud de onda de 590 nm.

Curva de crecimiento en medio líquido específico 2 para la cepa 1502-4 VAM. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 100 mL de agua destilada y se disolvieron NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ (cuadro 13), posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (xilosa al 2%), previamente fue disuelta y adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron 3.5 mL de este medio en tubos de ensaye (triplicado) se inocularon con 50 µl de una suspensión celular bacteriana obtenida de la cepa inducida el cual es un cultivo puro; posteriormente se incubaron a 40°C y se realizó anaerobiosis; se corrió una cinética a tiempos de 0, 12, 24,36, 48, 60, 72, 84, 108, 132, 156 horas.

Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) a 590 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Cuadro 13. Composición química del medio líquido específico 2 para producir xilanasa

Componente	Cantidad (%)
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.5
Nitrato de Sodio (NaNO ₃)	0.3
Cloruro de Potasio (KCl)	0.5
Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.01
XILOSA	2.0

Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret para la cepa 1502-4 VAM. Se empleó un kit para cuantificación de proteínas totales (RANDOX) por el método de Biuret. Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas a 5,000 rpm (SOLBAT) por 15 minutos (2 ciclos). El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína mediante el método de Biuret.

Se agregaron 10 µL de extracto enzimático de los diferentes tiempos de fermentación en tubos de ensaye (duplicado) y 500 µL de Biuret en un baño a una temperatura de 25°C por 30 minutos (incluyendo un blanco y un patrón) posteriormente se agitaron y se leyó la absorbencia a 546nm. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

- Blanco:
10 µL de agua destilada + 500 µL de Biuret
- Patrón:
10 µL de solución patrón + 500 µL de Biuret

➤ Muestra:

10 µL de extracto enzimático + 500 µL de Biuret

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Total} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times \text{Concentración de Patrón}$$

Determinación de actividad enzimática mediante la técnica de azúcares reductores (Somogyi-Nelson) para la cepa 1502-4 VAM. La cuantificación de actividad xilanas se determinó mediante la técnica de azúcares reductores mediante el método propuesto por Somogyi (1952) y Nelson (1944).

Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas a 5,000 rpm (SOLBAT) por 15 minutos (2 ciclos). El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína mediante el método de Biuret.

➤ Preparación del sustrato

Se pesaron 2g xilosa para posteriormente disolverlos en 100 mL de agua destilada.

➤ Cinética enzimática

Se agregaron 200 µL de sustrato en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 50 µL de extracto enzimático (Cuadro 14), obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos.

Cuadro 14. Preparación de muestras para la cinética enzimática.

	Blanco General	Blanco Sustrato	Blanco Enzima
Agua Destilada	250 μ L	50 μ L	200 μ L
Sustrato	---	200 μ L	---
Extracto enzimático	---	---	50 μ L
Somogyi	250 μ L	250 μ L	250 μ L

➤ Cuantificación de azúcares reductores (Somogyi-Nelson):

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantificó mediante la técnica de azúcares reductores. Para la medición de azúcares reductores se colocaron 250 μ L del reactivo 1 Somogyi (Anexo 3). Luego se incubó en baño de agua hirviendo a 100°C durante 10 minutos. Se retiró del agua hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 250 μ L de reactivo 2 Nelson (Anexo 3) y se agitó vigorosamente. Se agregaron 4 mL de agua destilada y se agitó. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrómetro a una longitud de onda de 660 nm.

Una unidad de actividad xilosa se definió como:

U= Cantidad de azúcares reductores liberados en mg/mL por cada mL de proteína en 1 hora, empleando xilosa al 2%.

Producción de celulasa. Ensayo (Screening). Se eligieron dos cultivos puros (513-2 VML, tratamiento 3; 205-2 VAM, tratamiento 2) en tubo y se realizó un screening para verificar la degradación de celulosa del microorganismo, en uno de ellos sólo se alcanzó a ver si presentaba actividad, en el otro si se realizó la medición de la enzima correspondiente. Se preparó el medio sólido específico (Cuadro 15). Se disolvió Agar Bacteriológico, NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ en 100 mL de agua destilada, posteriormente se solubilizaron y esterilizaron. La fuente de carbono (celulosa), previamente disuelta en 50 mL de agua destilada, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente. Se vaciaron de 10 a 15 mL de este medio en cajas Petri.

Se sembró por estriado y se incubó a 40° C en condiciones de anaerobiosis. Una vez que se observó el crecimiento uniforme, se compararon las características macro y microscópicas de las colonias.

Cuadro 15. Composición química del medio sólido específico para el screening de la degradación de celulosa.

Componente	Cantidad (%)
Agar Bacteriológico	2
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.2
Fuente de C Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	0.5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄	0.01

Curva de crecimiento en medio líquido en Tioglicolato de sodio de la cepa 513-2 VML. Se disolvieron 29.5 g de Tioglicolato de Sodio (TGNa) en 1000 mL de agua destilada posteriormente se solubilizaron y se esterilizaron. En tubos de ensaye (duplicado) con 2 mL de Tioglicolato de Sodio se inocularon 10 µl de una suspensión celular bacteriana obtenida de un cultivo puro en tubo; posteriormente se incubaron a 40° C y se realizó anaerobiosis, monitoreando la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hrs.

Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) leyendo a una longitud de onda de 590 nm.

Curva de crecimiento en medio líquido específico para producir celulasa de la cepa 513-2 VML. Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a la producción de celulasa. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 100 mL de agua destilada y se disolvieron NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ (Cuadro 16), posteriormente se solubilizaron y esterilizaron.

La fuente de carbono, Carboximetil celulosa de sodio, previamente disuelta en 50 mL de agua destilada, fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente.

Se vaciaron 4 mL de este medio en tubos de ensaye (triplicado) se inocularon 10 μ L de una suspensión celular bacteriana obtenida de un cultivo puro en tubo; posteriormente se incubaron a 40° C y se realizó anaerobiosis, monitoreando la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 hrs.

Cada una de las alícuotas tomadas fue leída mediante turbidez empleando un espectrofotómetro (GENESYS 20) a 590 nm. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Cuadro 16. Composición química del medio líquido específico para producir celulasa.

Componente	Cantidad (%)
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de C: Carboximetil celulosa de sodio (GOLDEN BELL)	1
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄	0.01

Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa 513-2 VML. Se empleó un kit para cuantificación de proteínas totales (RANDOX) por el método de Biuret.

Las muestras obtenidas de los diferentes tiempos, fueron centrifugadas a 4500 rpm (SOLBAT) por 20 minutos. El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína mediante el método de Biuret.

➤ Preparación del sustrato

Se pesaron 0.5 g celulosa (Carboximetil Celulosa de Sodio) para posteriormente disolverlos en 50 mL de agua destilada.

➤ Cinética enzimática

Se agregaron 145 µL de sustrato en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 5 µL de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos.

➤ Cuantificación de proteína Biuret

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantifico mediante la técnica de proteínas totales. La técnica consiste en agregar 500 µL de reactivo Biuret a cada tubo y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.

Para conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre la enzima y el sustrato, se prepararon una muestra patrón y una muestra blanco (Cuadro 17).

Cuadro 17. Preparación de muestras para cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Blanco General	Blanco Sustrato	Blanco Enzima
Agua Destilada	150 µL	---	---
Sustrato	---	---	145 µL
Extracto enzimático	---	500 µL	5 µL
Reactivo Biuret	500 µL	10 µL	500 µL
TP	---	---	---

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Total} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times \text{Concentración de Patrón}$$

Determinación de Azúcares Reductores (Somogyi-Nelson) de la cepa 513-2 VML. La técnica fue la misma utilizada citada anteriormente, existen algunas diferencias las cuales fueron en base a la consideración de la enzima producida (celulasa).

➤ Preparación del sustrato

Se pesaron 0.5 g celulosa (Carboximetil Celulosa de Sodio) para posteriormente disolverlos en 50 mL de agua destilada.

➤ Cinética enzimática

Se agregaron 145 μ L de sustrato en tubos de ensaye (duplicado) y se colocaron en baño maría (Napco Model 210A) a 40° C. Se añadieron 5 μ L de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, monitoreando a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos.

➤ Cuantificación de azúcares reductores (Somogyi-Nelson)

La cuantificación se realizó de la forma antes mencionada para azúcares reductores.

Una unidad de actividad celulosa se define como:

U= Cantidad de azúcares reductores liberados en mg/ml por cada ml de proteína en 1 hora, empleando celulosa al 1%.

Producción de una proteasa cepa 652-2 VLI. Selección (ensayo). Se eligió una cepa codificada con 652-2 VLI, para verificar la degradación de proteínas.

Se diseñó un medio sólido específico (Cuadro 18) empleando como fuente de carbono caseína. El medio mineral fue esterilizado a 121°C por 15 min y una vez que alcanzó temperatura ambiente, se adicionó la fuente de carbono empleando leche descremada (Lala) tetrapack agitando suavemente para permitir su homogenización.

Cuadro 18. Composición química del medio sólido específico para el monitoreo de la degradación de la proteasa.

Componente	Cantidad (%)
Agar Bacteriológico	2
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de Carbono (leche descremada)	1
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄	0.01

Se prosiguió a vaciar el medio en cajas Petri esperando hasta que se solidificara para poder realizar la siembra por estriado e incubando las cajas a 40 °C en condiciones de anaerobiosis por periodos de tiempo de 24 a 96 h o hasta observar crecimiento uniforme; posteriormente se realizó la caracterización macro y microscópica del crecimiento celular.

Curva de crecimiento en medio líquido específico para anaerobios (tioglicolato de sodio). Se realizó un inóculo inicial de 50 µL del tubo con cultivo puro de la cepa seleccionada en tubos que contenían 4 mL de medio líquido (tioglicolato Na), se incubaron bajo condiciones anaeróbicas siguiendo una cinética de crecimiento celular tomando alícuotas por tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 196 horas . La curva de crecimiento se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 590 nm mediante la técnica de turbidimetría.

Turbidimetría. Este método da información sobre el contenido de macromoléculas, y no sobre el número de células. En el laboratorio de microbiología se usa un espectrofotómetro y se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos en comparación con un blanco que es el medio esterilizado, sin inóculos. Cuanto mayor es el número de células en suspensión,

menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Se cumple una ley similar a la de Lambert-Beer y expresando la relación en términos de masa microbiana y absorbancia, la ecuación es la siguiente:

$$A = k \times W$$

Donde:

A= absorbancia

k= constante

W= masa molecular

Para utilizar la medida de la absorbancia como método de recuento, es necesario hacer para cada microorganismo una curva de calibración, midiendo el número de microorganismo por otro método de recuento. El método se emplea fundamentalmente para preparar inóculos cuando se trabaja con cultivos puros.

Curva de crecimiento en medio líquido específico para la producción de la enzima. Se preparó el medio líquido específico para inducir al microorganismo a producir la enzima proteasa. En un matraz Erlenmeyer se agregó 150 mL de agua destilada y se disolvió NaCl, NaNO₃, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ (Cuadro 19) y después se solubilizó y esterilizó, posteriormente una vez que alcanzó la temperatura de 40 °C se le agregó la fuente de carbono (caseína), una vez mezclado todos los componente del medio se colocó 4 mL de medio en los tubos de 3*100 mL por triplicado.

Se realizó una suspensión celular bacteriana (cada ensayo se realizó por triplicado), vaciando 4 mL de medio específico en un tubo, inoculando 10 µl de suspensión en todos los demás tubos; una vez terminada de hacer la suspensión celular se incubaron los tubos a 40 °C y se monitoreó la cinética a tiempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas, para posteriormente leer la absorbancia y obtener la velocidad específica de

crecimiento, cada muestra que se sacaba de la incubadora inmediatamente se refrigeraba (Torrey) para inhibir la actividad microbiana

Cuadro 19. Composición química del medio líquido específico para producir proteasa.

Componente	Cantidad (%)
NaCl	0.5
NaNO ₃	0.3
KCl	0.5
Fuente de Carbono (leche descremada)	1
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄	0.01

Determinación de proteína extracelular (enzima) por el método de Biuret.

Se empleó un kit para cuantificación de proteínas totales (RANDOX) por el método de Biuret. Se centrifugaron (SOLBAT) a 4000-5000 RPM por 20 minutos los tubos obtenidos a los diferentes tiempos de fermentación con la finalidad de separar la biomasa y obtener el extracto celular.

Se prepararon tubos de 3*100 mL para poder realizar la cinética enzimática se hicieron 2 repeticiones para cada tiempo de reacción (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 minutos) de cada tiempo de fermentación (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas).

Cinética enzimática. En tubos de ensayo 13 x 100 mL se agregó 145 µL de sustrato, por duplicado, se colocaron en una gradilla a baño María (Napco Model 210^a) con una temperatura controlada de 40±2. Posteriormente se añadieron 5 µL de extracto enzimático a cada tubo y se dejó actuar por tiempos de reacción de 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min; la cinética se detuvo adicionando el reactivo de Biuret para proteínas totales, para posteriormente seguir con la técnica establecida por Randox.

➤ Preparación de sustrato

Se midieron 0.5 mL de proteína (leche descremada) la cual fue disuelta en 50 mL de agua destilada y se empleó como solución madre de sustrato a concentración conocida.

➤ Condiciones de la cinética

Los tubos contenían 145 μ L de sustrato (Cuadro 20), por duplicado, las cuales se colocaron en baño María (Napco Model 210A) controlando la temperatura a 40 °C a las que se les agregó 0.5 μ L de extracto enzimático a los diferentes tiempos de reacción (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min).

Cuadro 20. Contenido de los tubos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret

	Sustrato	H₂O	Extracto Enzima	Biuret
Blanco Sustrato	145 μ L	5 μ L	---	500 μ L
Blanco Enzima	---	145 μ L	5 μ L	500 μ L
Blanco General	---	150 μ L	---	500 μ L
Muestras	145 μ L	---	5 μ L	500 μ L

➤ Cuantificación de proteína (enzima) por el método de Biuret

Se colocaron los tubos con el sustrato en una gradilla y en baño María a 40°C, se les agregó 5 μ l de extracto enzimático al tiempo de reacción que está establecido (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min), esto con la ayuda de las micropipetas calibradas (200/1000, 20/200, 2/20, transferpette y V3), se sacaron los tubos del baño María una vez que se les agregó el extracto enzimático e inmediatamente se les agregó 500 μ l de reactivo de Biuret, esto para detener la reacción enzimática del microorganismo.

Una unidad de actividad proteasa (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria en mg/mL de proteína para hidrolizar la caseína (leche descremada) al 1% en un tiempo de 60 minutos.

También se preparó un tubo de TP (proteína total) con 10 µl de estándar y 500 µl de Biuret dejándolo en reposo por 30 minutos, y se trabajó con una absorbancia de 456 nm para poder obtener el resultado de esta sustancia.

Para el análisis de datos se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. de Prot. Total} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times \text{Concentración de Patrón}$$

Concentración de Patrón= 60mg/mL

Producción de Fitasa. Selección (ensayo). Se eligieron 7 cepas puras (crecimiento homogéneo y producción de pigmento) con las siguientes codificaciones: 205-1 VAM, trat. 2; 205-2 VAM trat. 2; 1502-6 VAM trat. 2, 4906-5 VAM trat. 2; 513-1 VML, trat. 3; 953-9 VML, trat. 3 y 332-3 VLI, trat.4 para verificar la degradación de fitato.

Se utilizó un medio comercial, el cual fue ácido fítico, esto con el fin de ver si algunas de las cepas presentaban crecimiento, de tal manera a seleccionar las cepas con más actividad y realizar una cinética enzimática.

Preparación del extracto enzimático. Se utilizó un medio de cultivo comercial, el cual fue Caldo de Triptisoya Caseína (CTS), se preparó en 21 matraces erlenmeyer de 250 mL, 100 mL en cada matraz del medio CTS. Posterior a esto se esterilizó a 121°C en una autoclave (Presto), por 15 minutos una vez que alcanzó la temperatura mencionada. Luego una vez a temperatura ambiente los matraces con el medio, en los mismos fueron inoculados las diferentes cepas, que se encontraban en cajas petri en el medio Agar Schaedler (medio comercial específico para anaerobios), esto fue mediante un asa calibrada, se recogió una asada y fue puesta en el medio de cultivo CTS. Todo este trabajo se realizó en una campana de flujo laminar (Nuair, modelo: NU-425-400) (Figura 15), para evitar contaminación. En seguida se metió a una incubadora con agitador y temperatura (Inova, modelo: 4300) (Figura 16), las cepas estuvieron en incubación por 24 horas, a una velocidad de agitación de 250 RPM, y a una temperatura de 40°C. Lo que se hizo a continuación fue centrifugar (Eppendorff,

modelo: 5702R) (Figura17), las 7 cepas, en triplicado, es decir, las 21 muestras, por 30 minutos a 5,000 RPM por a 4°C. Una vez terminada esta parte de la preparación del extracto eran colocados los sobrenadantes de cada muestra en frascos identificados.



Figura 15. Campana de Flujo Laminar



Figura 16. Incubadora con agitadora



Figura17: Centrífuga con temperatura baja, para tubos Falcon de 50 mL

Preparación del Medio de Cultivo Para Fitasa. El medio fue preparado al 1% en buffer de sodio acetato 0.1 M a un pH de 5.

Curva de Crecimiento de las 7 cepas seleccionadas para actividad fitasa. Se preparó el medio por triplicado. Este medio de cultivo fue utilizado para ver si los microorganismos presentaban crecimiento en los mismos, los que presentasen crecimiento iban a ser seleccionados para realizar con ellos una cinética enzimática.

Luego se procedió a agregar 500 μ L de extracto por tubo a la cual se adicionó también 500 μ L del medio de ácido fítico. Luego a incubar por 1 hora a 37°C, se le agregó 2 mL de Ac. Tricloroacético. Posterior a esto se agitó en Vortex (Labnet, serial #: Z805500) (Figura 18) por 1 minuto. Si se observaba un precipitado o turbidez, centrifugar a 4,000 RPM por 5 minutos a 4°C. Como siguiente paso se Decantó en un tubo nuevo y limpio. Luego se agregó 2 mL de solución de trabajo Taussky y Shorr (Anexo 4), se aplicó vortex por 1 minuto. Después se dejó reposar por 1 minuto. La curva de crecimiento se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 700 nm mediante la técnica de turbidimetría.



Figura 18: Vortex Mixer

Turbidimetría. Este método da información sobre el contenido de macromoléculas, y no sobre el número de células. En el laboratorio de microbiología se usa un espectrofotómetro (PerkinElmer, modelo: Lambda 25 UV/VIS Spectrometer) (Figura 19) y se mide la absorbancia de la suspensión de microorganismos en comparación con un blanco que es el medio esterilizado, sin inóculos. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Se cumple una ley similar a la de Lambert-Beer y expresando la relación en términos de masa microbiana y absorbancia, la ecuación es la siguiente:

$$A = k \times W$$

Donde:

A= absorbancia

k= constante

W= masa molecular

Para utilizar la medida de la absorbancia como método de recuento, es necesario hacer para cada microorganismo una curva de calibración, midiendo el número de microorganismo por otro método de recuento. El método se

emplea fundamentalmente para preparar inóculos cuando se trabaja con cultivos puros.



Figura 19. Espectrofotómetro controlado mediante una computadora.

Preparación de la Curva de Calibración de las 7 cepas seleccionadas para actividad fitasa. Se utilizarán 4 mL para la curva de calibración, de los cuales 3 mL corresponden al volumen en que presenta la concentración del fosfato inorgánico (Pi) proveniente del KH_2PO_4 (La molaridad del Pi está calculada en relación a los 3 mL, el cual es tomado como volumen de ensayo) (Cuadro 21).

El otro mL (1 mL), corresponde a 1 mL de H_2O , que se agrega para mantener la equivalencia con el mL (1 mL) de H_2O que es agregado a las muestras, en el ensayo enzimático.

En la preparación de la curva de calibración se tomó en cuenta:

- La preparación del reactivo de Taussky-Shorr que se utiliza, fuese la misma que el que se va a usar en las muestras del ensayo. (Una curva por cada preparación de reactivo).

- Los tubos de ensayo deben haber sido lavados con H₂O_d y secados antes de su uso, ya que el fosfato procedente de restos de detergentes altera los resultados obtenidos.

Cuadro 21. Curva de calibración utilizada

Concentración (ppm)	Sol. stock (mL)	Acido tricloroacético (mL)	Volumen de muestra (mL)	H₂O_d (mL)
140	0.84	2.16	3	1
120	0.72	2.28	3	1
80	0.48	2.52	3	1
50	0.3	2.7	3	1
30	0.18	2.82	3	1
10	0.06	2.94	3	1
5	0.03	2.97	3	1
Blanco	0	3	3	1

En el caso de las muestras de cultivo recolectadas a través del tiempo; todas ellas son analizadas al mismo tiempo, para evitar las pequeñas variaciones que se puedan producir por el procedimiento del ensayo.

Se debe realizar una curva de calibración cada vez que se procede a un ensayo mediciones de la actividad de las muestras. Esto se lleva a cabo ya que el reactivo de Taussky-Shorr debe ser agregado de un preparado fresco; y debido a ello pueden producirse pequeñas variaciones entre las diferentes preparaciones del reactivo en fresco; con lo cual se puede provocar pequeñas variaciones de absorbancias.

Proposición de aplicaciones biotecnológicas para algunos de los biotipos aislados de las vacas Holstein de la U.A.A.A.N.

A partir de los diferentes estudios realizados en la investigación se pudieron encontrar resultados muy considerables que se pudiesen aprovechar en el sector agropecuario, para esto, se analizó cada uno de los resultados y se comparó apropiadamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I

Acondicionamiento de los animales en estudio, mediante una dieta balanceada, adicionada con subproductos agroindustriales (masilla y levadura) y obtención de líquido ruminal.

Acondicionamiento de Ganado Holstein y Obtención de Líquido Ruminal

Una vez que las vacas terminaron su dieta de 120 días se extrajeron 400 mL de líquido ruminal, los cuales fueron transportados en contenedores herméticos bajo condiciones anaeróbicas y a una temperatura de $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 20).



Figura 20: Obtención de líquido ruminal mediante empleo de una sonda ororuminal conectada a una bomba de vacío.

Etapa II

Aislamiento e identificación macro, microscópica, bioquímica y molecular de microorganismos procariotas:

Aislamiento Preliminar de Microorganismos Bacterianos en Agar Nutritivo (AN)

En la figura 21 se muestran las cajas con AN después de haber obtenido un crecimiento homogéneo de las colonias las cuales fueron incubadas a 40 °C por tiempos de 24 hasta 96 h, por lo tanto representan a las cajas con las colonias originales.



Figura 21. Crecimiento microbiológico empleando agar nutritivo incubadas a 40°C y en condiciones anaerobias.

Para el tratamiento 1, en agar nutritivo se obtuvieron 21 colonias las cuales se observan en el cuadro 22, en él se muestra la identificación macroscópica que se realizó de las colonias bacterianas obtenidas de las vacas control (VC), codificadas con los números 2506, 3505, 1003, 2606 y 901. En el tratamiento 2, se obtuvieron 17 colonias de las cuales dos (205-2 VAM y 1004-1 VAM) presentaron características morfológicas exactamente iguales en todos los aspectos; sin embargo, la información reportada de características macroscópicas no es suficiente para afirmar si se trata de la misma cepa, ya que existen varias colonias bacterianas pertenecientes a distintos géneros y especies y pueden presentar morfologías macroscópicas similares. En el tratamiento 3, el cuadro 22, muestra los resultados obtenidos, donde se puede apreciar que se lograron aislar 20 microorganismos; las formas predominantes

de las colonias fueron las de forma circular. Lo cual coincide con lo reportado por Rodríguez *et al.* (2008), fueron registradas seis apariencias posibles para las colonias de microorganismos celulolíticas: presentando una morfología microscópica cocoide con perfecta definición en sus bordes (enteros) en su morfología colonial (macroscópica). Y por último para el tratamiento 4, se pudo observar un crecimiento homogéneo después de 24-48 h de incubación bajo anaerobiosis a 40°C. Así también el cuadro 22, muestra el crecimiento de los 13 microorganismos aislados donde predominaron las colonias de color blanco y forma circular.

En el tratamiento 1, se observaron 3 colonias diferentes en las 5 repeticiones las cuales presentaron la siguiente morfología:

La primera colonia fue VC 2606-3 y VC 3505-3 que presentó un color crema. La segunda colonia VC 2606-2 y VC 3505-2 es de un color amarillo. La tercera colonia VC 2506-1 y VC 2506-8 presentó un color rosa. En este contexto, algunas características morfológicas coinciden con el tratamiento 2 (Cuadro 22), porque presentó similitudes principalmente en cuanto al color de la colonia VAM 1004-3. Propiamente en el tratamiento 2, la colonia VAM 1004-5 es la única que posee un color rosa claro, así como la colonia VAM 1004-3 que presentó un color en amarillo desvanecido;

La colonia VAM 1004-2 es la única colonia que presentó un color ámbar, además se obtuvieron 4 colonias de color beige (VAM 205-1, VAM 1502-3, VAM 4906-2, VAM 1004-7), las cuales presentaron características diferentes entre ellas.

Un dato importante es que solo una colonia, la VAM 1502-4 mostró superficie rugosa y las restantes, fueron de superficie lisa (Cuadro 22).

Se obtuvieron 2 colonias (VAM 4906-1 y 2) de las cuales no se caracterizaron debido a que no se lograron distinguir sus características por el crecimiento saturado en la caja Petri.

Annison y Lewis (1966) reportan que las especies *Ruminococcus flavefaciens* y *Bacteroides succinogenes* como cepas que poseen la característica particular de una coloración amarillo intenso. Por su parte Rodríguez *et al.* (1999), reportaron seis apariencias posibles para las colonias de cepas celulolíticas: presentando una morfología microscópica cocoide con perfecta definición en sus bordes (enteros) y en su morfología colonial (macroscópica).

Por otro lado se puede observar contrastes en los resultados. En el tratamiento 2 y 3 al utilizar el mismo medio de cultivo obtuvieron diferencias en algunas características morfológicas de los microorganismos aislados. También se debe considerar que en las dietas balanceadas se utilizaron subproductos provenientes de la industria cervecera. En la formulación de raciones es de vital importancia un balance entre la cantidad de proteína degradable en el rumen y la energía proveniente de la degradación de carbohidratos debido a que las poblaciones microbianas (principalmente bacterias) pueden verse afectadas con variaciones en las características nutritivas de la dieta. Dawson *et al.* (1990), señala que la adición de levadura proveniente de la industria cervecera incrementa el número total de bacterias fibrolíticas. Hecho que demuestra el efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas situación que eventualmente incluye consecuente sobre las características morfológicas de las mismas.

Para el tratamiento 3, se encuentra que en el cuadro 22, cuatro cepas presentaron la misma morfología, colonia (color azul, rojo, negro); por lo que los siguientes estudios se realizaron sobre las 20 cepas diferentes únicamente.

Comparando las colonias macroscópicamente (cuadro 22 y figura 22), se puede observar que la colonia 1, de la caja # 903 y la colonia 8 de la caja # 763 coinciden en todas sus características morfológicas macroscópicas; hay que considerar que aunque esto suceda, no es información suficiente para afirmar que se trate de la misma cepa, ya que varias colonias bacterianas pertenecientes a distinto género y especie pueden presentar morfologías

macroscópicas similares. Lo mismo se observó para las colonias 4, 9, 13 y 21 de las cajas # 903, 703, 283 y 873 respectivamente; sin embargo, las colonias 9 y 10 de la caja # 703 son iguales en color, forma, elevación, superficie, aspecto, bordes, luz reflejada, luz transmitida, consistencia; pero son diferentes en tamaño.

En general la mayoría de las colonias sembradas en agar nutritivo son de color blanco, forma circular, aspecto húmedo, bordes enteros y consistencia suave, lo cual nos habla de una predominancia de ciertas cepas en el contenido ruminal.

Las colonias 1, 8 y 22 presentaron color anaranjado, sin embargo la número 22 difiere de las anteriores en elevación (convexa) y en luz transmitida (opaca). Mientras que las colonias 7 y 14 son diferentes en luz reflejada y luz transmitida. Las colonias 12, 20 y 23 son iguales en el color anaranjado pálido.

La figura 22 muestra la morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar nutritivo

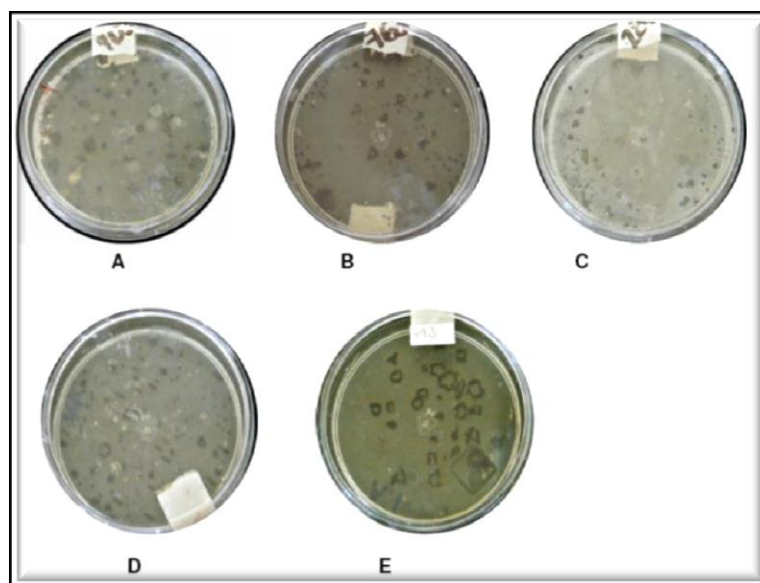


Figura 22. Morfología colonial de las 5 cajas Petri sembradas con líquido ruminal en agar nutritivo. A) Caja # 903VML, B) Caja # 763VML, C) Caja # 283VML, D) Caja # 873VML, E) Caja # 343VML.

En el tratamiento 4, mediante el Cuadro 22, se puede observar la identificación macroscópica en agar nutritivo que se realizó de las colonias bacterianas obtenidas de vacas codificadas con números 332, 932, 652 y 572, en donde se pudieron apreciar que hay microorganismos que presentan características similares en cuanto a color, forma, elevación y aspecto; sin embargo, se pudieron apreciar 3 colonias que presentaron morfologías únicas en los 4 animales. Las colonias 1, 7 y 12 coincidieron en la mayoría de los aspectos morfológicos de las muestras 332, 932 y 572; sin embargo la colonia 13 fue diferente en aspecto y consistencia. De las muestras 932 y 652 la morfología macroscópica coincidió en 2 colonias, sin embargo, no es posible afirmar que se trate del mismo microorganismo, ya que no existe suficiente información para hacerlo; además, las bacterias pertenecen a distintos géneros y especies y pueden presentar morfologías macroscópicas similares. Del total de los microorganismos aislados, se identificaron 8 cepas diferentes morfológicamente, pero se puede apreciar en la Figura 23 que la forma predominante es la circular, superficie rugosa y color blanco en la mayoría de las bacterias.

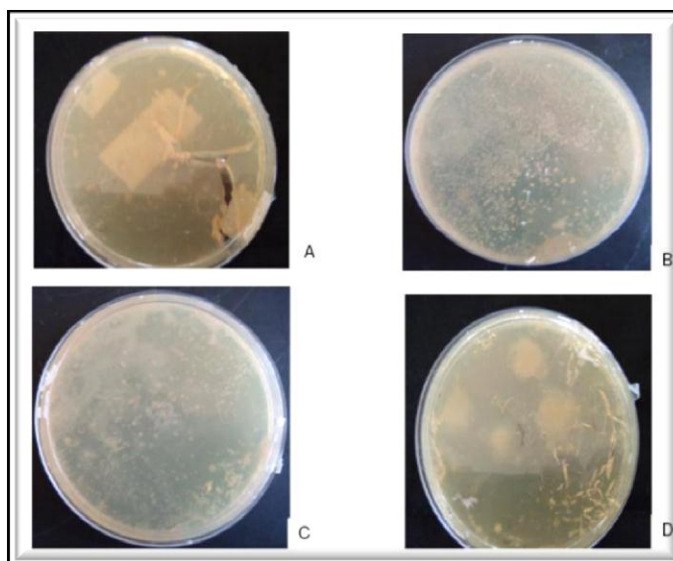


Figura 23. Identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la siembra del líquido ruminal obtenidas en agar nutritivo. A) Caja # 332, B) Caja # 932, C) Caja # 652 y D) Caja # 572.

Aislamiento de Microorganismos Bacterianos en Medio de Cultivo Comercial Específico para Anaerobios Agar Schaedler (AS)

Hungate, (1966) describe que en general y debido a las condiciones que prevalecen en el rumen, la mayor parte de los microorganismos son anaerobios o anaerobios facultativos, es por ello que se empleó AS como medio de cultivo específico para anaerobios

El rumen puede ser considerado como una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana (Annison y Lewis, 1966), por lo tanto las bacterias obtenidas en AS crecieron bajo las mismas condiciones que el rumen proporciona, en cuanto a condiciones de anaerobiosis como de temperatura.

Los resultados obtenidos muestran que se consiguió obtener morfológicamente, para el primer tratamiento (testigo: sin masilla ni levadura): 9 colonias las cuales se observan en el cuadro 23. estas colonias presentan características similares predominando las de color blanco, bordes enteros y de aspecto húmedo; sin embargo, la característica microscópica muestra cocos, *Streptococos*, diplococos y *Estafilococos* Gram positivos. En cambio para el tratamiento 2 con este medio se lograron identificar 20 colonias; de las cuales 2 colonias (VAM 205-2 y VAM 1502-6) fueron color beige y presentaban las mismas características macroscópicas, por lo que posiblemente podrían ser la misma colonia, en total existen 19 colonias diferentes entre sí en cuanto se refiere a caracterización macroscópica. Para el tratamiento 3, se consiguieron definir morfológicamente 24 colonias, de las vacas a las que se les extrajo el líquido ruminal.

El conocimiento y comprensión de la ecofisiología microbiana ruminal son imprescindibles para mejorar la utilización de los alimentos proporcionados al ganado y como consecuencia de ello incrementar la eficiencia de producción. El rumiante recién nacido queda expuesto a muchas poblaciones microbianas diferentes durante el parto y son estas las que posteriormente contribuyen al

establecimiento de la población microbiana gastrointestinal. Estas poblaciones tienen su origen en; la vagina, la saliva de la madre, bolo alimenticio, estiércol, flora ambiental, otros animales, la ubre y la leche y otras fuentes alimenticias. Las más importantes son el contacto entre animales y los alimentos disponibles (Blanch *et al.*, 2009).

La cantidad de bacterias puede variar por factores ambientales o dietarios, y cuando estos dos parámetros se mantienen, las variaciones derivan de factores específicos de cada animal, tales como: tiempo destinado a la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance de la digesta. Esto explica cómo hasta la 3ª semana de edad las bacterias que aparecen en el rumen de terneros son diferentes a las del vacuno adulto y que entre las semanas 9ª y 13ª la población bacteriana del rumen es prácticamente igual a la del rumiante adulto. Al igual que en los terneros, en los corderos el cambio hacia las especies predominantes que se descubren en las ovejas adultas, tiene lugar a la 6ª semana de edad.

Desde el punto de vista de la fermentación, el rumen es un ente bastante independiente del animal. No obstante ambos interactúan y, tanto las bacterias como el animal se benefician mutuamente. El rumen posee una serie de características que intervienen en el crecimiento de los organismos (Calsamiglia, 2008).

Reportes en la literatura menciona que la adición de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, incrementa la concentración de bacterias Gram negativas en el contenido ruminal, por lo que estos resultados coinciden con los presentados por Gedek *et al.* (1993), ya que se observa que al realizar la tinción de Gram, la mayoría de las cepas se tiñeron de color rosa-rojo, lo cual nos indica que los microorganismos son Gram negativos; dicha coloración es debida a que las paredes de estos microorganismos son más delgadas y con mayor cantidad de lípidos.

En la figura 24 se pueden observar las colonias con un crecimiento homogéneo en medio AS después de 24- 48 h de incubación.

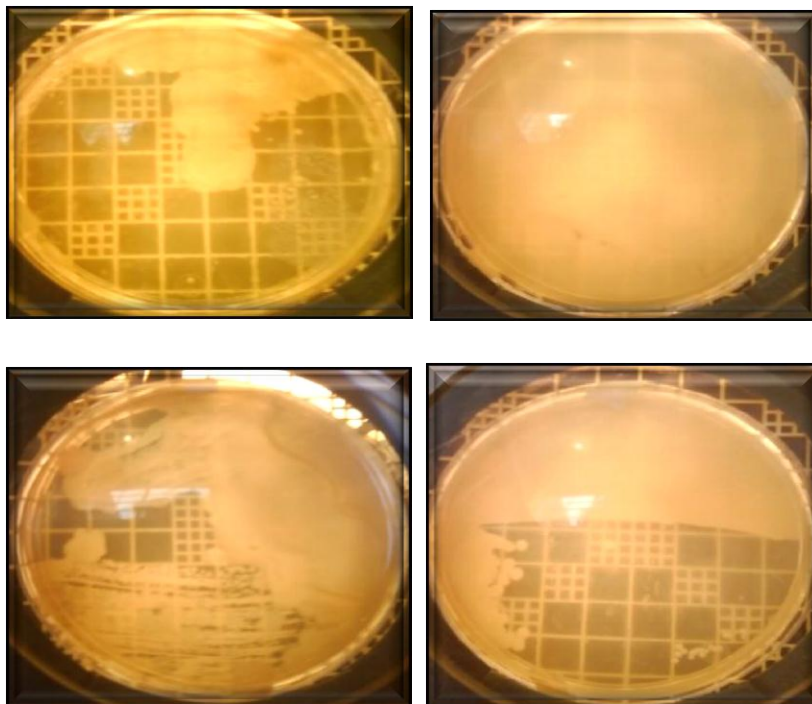


Figura 24. Crecimiento microbiano empleando agar Schaedler.

Por su parte en el cuadro 23 se puede apreciar que la morfología macroscópica de la colonia 1 de VC 2606 fue la única para el tratamiento 1, de color amarillo, tamaño mediana y forma circular.

En el tratamiento 1, en el medio se observaron 2 colonias (VC 1003-3 y VC 3505- 1) fueron de color blanco y presentaron las mismas características macroscópicas por lo que posiblemente podrían ser la misma colonia.

Los resultados obtenidos para el tratamiento 4, con este medio específico para anaerobios (agar Schaedler) muestran que la identificación macroscópica de las 17 colonias obtenidas presentan características similares o idénticas (Cuadro 23); las características predominantes de las colonias fueron color beige, forma circular y bordes enteros; sin embargo, la características

microscópicas muestran bacilos y cocobacilos Gram negativos, así como cocos Gram positivos.

En la VLI # 332 (Cuadro 23) se lograron identificar macroscópicamente 2 colonias similares en su morfología, presentando color, superficie y consistencia suave. Sin embargo, esta información no es suficiente para afirmar que se trate de la misma bacteria.

En el cuadro 23 y figura 25 se pudo apreciar que la mayoría de las colonias son diferentes en sus morfologías caracterizadas, excepto las colonias 1 y 3 de la VLI #332 que presentaron forma circular, color beige, superficie lisa y de elevación convexa, y de la VLI #932 las colonias 3 y 4 fueron similares en la mayoría de sus características macroscópicas; las cuales fueron: color beige, forma circular, superficie rugosa y elevación umbonada. Desde el punto de vista de la fermentación, el rumen es un ente bastante independiente del animal. No obstante ambos interactúan y, tanto las bacterias como el animal se benefician mutuamente. El rumen posee una serie de características que intervienen en el crecimiento de los organismos (Calsamiglia, 2008).

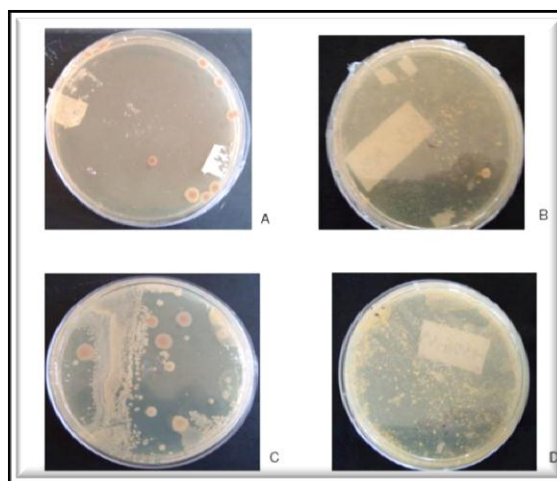


Figura 25. Identificación de las morfologías macroscópicas microbianas obtenidas de la siembra del líquido ruminal obtenidas en agar Schaedler. A) Caja #332, B) Caja #932, C) Caja #652 y D) Caja #572.

Cuadro 22. Morfología macroscópica de los microorganismos aislados en agar nutritivo

# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIÓN
2606 VA											
1	-----	Rosa	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Translúcida	Suave	4
2	----	Amarillo	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	3
3	----	Crema	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	8
4	-----	Amarillo	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Translúcida	Suave	1
505 VC											
1	----	Crema	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	3
2	----	Amarillo	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	9
3	----	Crema	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	28
4	----	Crema	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Translúcida	Suave	2
5	----	Beige oscuro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Translúcida	Suave	1
2506 VC											
1	----	Café	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Translúcida	Suave	1
2	----	Rosa	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	1
3	----	Rosa	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Suave	1
4	----	Amarillo	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	6
5	----	Amarillo	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregular	Mate	Opaca	Suave	2

# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIÓN
6	----	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Translúcida	Suave	2
7	----	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	24
8	----	Rosa	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Translúcida	Suave	3
901 VC											
1	----	Blanco	Irregular	Plana	Granular	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	2
2	----	Blanco	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante (Poco)	Translúcida	Suave	37
3	----	Sin color	Irregular	Plana	Granular	Húmedo	Filamentosos	Brillante	Transparente	Suave	3
4	----	Blanco	Irregular	Plana	Granular	Seco	Irregulares	Mate	Transparente	Firme	12
205 VAM											
1	----	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave y viscosa	2
2	----	Amarillo Claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	11
3	----	Blanco	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	14
1502 VAM											
1	----	Amarillo Claro	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	22
2	----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslúcida	Firme y viscosa	13
3	----	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1
4	----	Blanco	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Transparente	Firme y viscosa	1

# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIÓN
4906 VAM											
1	----	Amarillo	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	S. D.
2	----	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Mate	Traslúcida	Suave y viscosa	S. D.
1004 VAM											
1	----	Amarillo Claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	3
2	----	Ámbar	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	1
3	----	Amarillo opaco	Circular	Plana	Lisa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Firme y viscosa	1
4	----	Blanco	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	1
5	----	Rosa claro	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1
6	----	Blanco	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Transparente	Suave y viscosa	1
7	----	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	1
8	----	Amarillo	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	1
903 VML											
1	1 mm	Anaranjado	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	3
2	----	Blanco	Puntiforme	Umbonada	Granular	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	27
3	----	Blanco	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3
4	----	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	17
5	----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	7

# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIÓN
6	----	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	32
7	2 mm	Amarillo intenso	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3
763 VML											
8	2 mm	Anaranjado	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	1
9	1 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	76
10	3 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3
11	----	Blanco	Puntiforme	Plana	Granular	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	9
12	----	Anaranjado pálido	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	2
283 VML											
13	4 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	31
14	----	Amarillo intenso	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	2
15	----	Amarillo tenue	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	4
16	----	Beige	Irregular	Convexa	Rugosa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1
17	----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	2
873 VML											
18	----	Blanco	Puntiforme	Plana	Granular	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	18
19	3 mm	Amarillo	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	14
20	4 mm	Anaranjado pálido	Irregular	Umbonada	Rugosa	Seco	Irregulares	Mate	Traslúcida	Suave	2

# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIÓN
21	2 mm	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmeda	Enteros	Mate	Opaco	Suave	83
343 VML											
22	----	Anaranjado	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	8
23	----	Anaranjado pálido	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	4
24	----	Blanco	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	12
332 VLI											
1	7 mm	Blanco	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	9
2	----	Blanco	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Filamentosos	Mate	Opaca	Firme	3
3	4 mm	Anaranjado pálido	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	6
4	3 mm	Anaranjado	Circular	Convexa	Rugosa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	5
932 VLI											
5	----	Blanco	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Firme	6
6	----	Anaranjado	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Firme	10
7	----	Blanco	Irregular	Plana	Rugosa	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	6
652 VLI											
8	----	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	7
9	----	Blanco	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Enteros	Mate	Opaca	Firme	17
10	----	Blanco	Circular	Plana	Rugosa	Seco	Irregulares	Mate	Opaca	Firme	5

# COLONIA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	# DE REPETICIÓN
572 VLI											
11	----	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	13
12	----	Blanco	Irregular	Plana	Rugosa	Húmedo	Irregulares	Mate	Opaca	Suave	7
13	----	Anaranjado	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	7

Cuadro 23. Morfología macro y microscópica de los microorganismos aislados en agar Schaedler

CODIFICACIÓN	COLOR	TAMAÑO	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	#	GRAM
1003-2 VC	Beige claro	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Translúcida	Cremosa	2	Cocos Gram+
2606-2 VA	Amarillo	----	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Opaca	Suave	2	Cocos Gram+
3505-3 VC	Beige	----	----	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Cremosa	3	Cocos Gram+
1003-3 VC	Blanco	----	----	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Transparente	Suave	3	Cocos Gram+
2606-3 VA	Beige	----	----	Plana	Lisa	Seco	Regulares	Brillante	Opaca	Suave	3	Cocos Gram+
901-3 VC	Beige	----	----	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Translúcida	Suave	3	Cocos Gram+
1003-5 VC	Blanco	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Transparente	Suave	5	Cocos Gram+
3505-5 VC	Blanco	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Transparente	Suave	5	Cocos Gram+
2506-3 VC	Blanco	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	3	Cocos Gram+
205-1 VAM	Café Claro	----	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	11	Bacilos Gram-
205-2 VAM	Beige	----	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	1	Bacilos Gram-
205-5 VAM	Beige	----	Irregular	Plana	Rugosa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	2	Cocobacilos Gram-
1502-4 VAM	Beige intenso	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	Cocobacilos Gram-
1502-6 VAM	Beige	----	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	1	Bacilos Gram-
1502-7 VAM	Beige	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	Bacilos Gram-
4906-3 VAM	Amarillo opaco	----	Circular	Convexa	Granular	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	1	Cocos Gram+
4906-5 VAM	Beige	----	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	4	Bacilos Gram-

CODIFICACIÓN	COLOR	TAMAÑO	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	#	GRAM
1004-2 VAM	Blanco	----	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Traslúcida	Suave y viscosa	4	Cocos Gram+
513-1 VML	Beige	----	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3	Cocobacilos Gram-
513-2 VML	Blanco	4 mm	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	8	Cocobacilos Gram-
513-5 VML	Blanco	----	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Mate	Opaca	Suave	1	Cocos Gram-
513-7 VML	Marrón	5 mm	Circular	Plana	Rugosa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	Cocos Gram-
953-8 VML	Rosa pálido	5 mm	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	14	Bacilos Gram-
953-9 VML	Blanco	1 mm	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	38	Cocos Gram+
953-10 VML	Beige	----	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	2	Bacilos Gram-
643-12 VML	Beige	----	Irregular	Umbonada	Rugosa	Húmedo	Irregulares	Mate	Opaca	Suave	2	Bacilos Gram+
643-13 VML	Anaranjado pálido	----	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram-
193-16 VML	Blanco	5 mm	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	17	Bacilos Gram-
332-1 VLI	Beige	7 mm	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	9	Cocobacilos Gram-
332-3 VLI	Beige	2 mm	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	20	Cocobacilos Gram-
572-3 VLI	Beige	6 mm	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	13	Cocobacilos Gram-
572-4 VLI	Beige	----	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Transparente	Suave	2	Bacilos Gram-
652-2 VLI	Café pálido	----	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave	4	Cocos Gram+
932-1 VLI	Anaranjado	6 mm	Circular	Convexa	Rugosa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	3	Bacilos Gram-
932-2 VLI	Anaranjado	14 mm	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	4	Bacilos Gram-
932-3 VLI	Beige	15 mm	Circular	Umbonada	Rugosa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram-

CODIFICACIÓN	COLOR	TAMAÑO	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	LUZ REFLEJADA	LUZ TRANSMITIDA	CONSISTENCIA	#	GRAM
932-4 VLI	Beige	5 mm	Circular	Umbonada	Rugosa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	3	Bacilos Gram-
932-5 VLI	Beige	----	Irregular	Umbonada	Rugosa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave	1	Bacilos Gram-

Características microscópicas de las especies bacterianas aisladas en AS.

Los resultados obtenidos en el tratamiento 1 se pueden apreciar en las siguientes nueve figuras, iniciando con la Figura 26 muestra las colonias (de la A a la I), la VC 1003 – 2 (A) son bacterias Gram positivas del género estreptococo presentando una coloración violeta y características en forma de cadena. En comparación con la colonia VA 2606 – 2 (B) son cocos en forma esférica u ovalada de un tamaño pequeño. En la C se observan bacterias Gram positivas del género estafilococo en forma de racimo de uvas, estreptococos en forma de cadena y cocos en forma esférica de color violeta. En la figura D se muestra la colonia 3 de la caja VC 1003 en donde se identificaron bacterias Gram positivas del género estreptococos en forma de cadena, estafilococos en forma de racimo y cocos en forma esférica. En la caja 2606 (E) colonia 1 se identificó bacterias Gram positivo del género diplococos en forma doble, estafilococos en forma de racimo y cocos en forma esférica de una coloración violeta. En la F se observan bacterias Gram positivo del género estreptococos en forma de cadena y diplococos en forma doble y cocos en forma esférica de color violeta. En la colonia 3 de la VC 1003-5 (G) se identificó bacterias Gram positivas en forma de cocos (esféricos), estreptococos (en cadena), diplococos (dobles) y estafilococos (en racimo) de una coloración violeta. Se puede apreciar en la H que se trata de bacterias Gram positivo del género estreptococos (en cadena), diplococos (doble) y estafilococos (en racimo) de color violeta. El análisis microscópico de la VC-2506 (I), colonia 3 indica que se trata de bacterias Gram positivo del género estreptococos de color violeta.

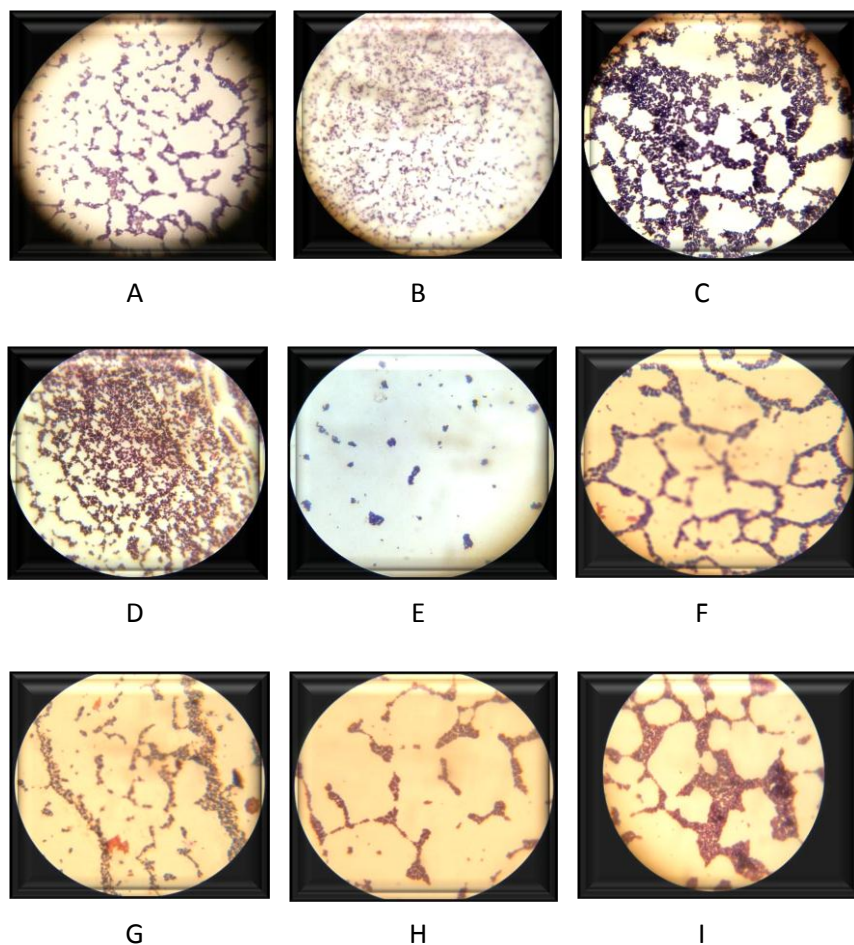


Figura 26. Colonias codificadas como. A) VC 1003 – 2, B) VA 2606 – 2 y C) VC 3505 -3, D) VC 1003-3, E) VC 2606 -1, F) VC 901- 3, G) VC 1003- 5, H) VC 3505- 5, I) VC 2506- 3, teñidas con Gram.

El estado cuantitativo y cualitativo de bacterias puede variar por factores ambientales o dietarios, ahora bien cuando estos dos parámetros se mantienen, las variaciones derivan de factores, específicos de cada animal, tales como: tiempo destinado a la rumia, cantidad de saliva segregada, consumo de agua y capacidad de avance de la digesta. Esto explica cómo hasta la 3ª semana de edad las bacterias que aparecen en el rumen de terneros son diferentes a las del vacuno adulto y que entre las semanas 9ª y 13ª la población bacteriana del rumen es prácticamente igual a la del rumiante adulto. Al igual que en los terneros, en los corderos el cambio hacia las especies predominantes que se

descubren en las ovejas adultas, tiene lugar a la 6ª semana de edad (Calsamiglia, 2008).

El rumen puede ser considerado como una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana (Annison y Lewis, 1966), este medio impulsa el desarrollo de diferentes especies microbianas, las cuales, dadas estas condiciones pueden variar en sus características morfológicas.

Annison y Lewis (1966) reportan que los grupos más notables presentes en líquido ruminal son: bacilos pequeños y cocos, esto coincide con los resultados obtenidos de la caracterización microscópica de las nueve cepas bacterianas purificadas con las que se trabajó ya que las 9 son del genero coco, en el caso del tratamiento 1, en donde no se agregan ninguno de los subproductos de cervecería (masilla y levadura) (Cuadro 4). Los microorganismos en forma de cocos Gram positivos, con una coloración azul – morada, es debido a que las paredes celulares son más gruesas, tienen más peptidoglicano y menos lípidos. Así también es importante mencionar que en la mayoría de los demás tratamientos, en donde poseen distintos niveles de masilla y levadura (Cuadro 4), las bacterias que más proliferaron fueron gram negativos, pudiendo encontrar entre los mismos: bacilos, cocos y cocobacilos.

Una de las características que poseen las bacterias es la capacidad para sintetizar sus propios constituyentes a partir de nutrientes que toman del medio externo; en este caso el agar Schaedler es el medio externo constituido por una fuente de carbono, sales minerales y nitrato como fuente de nitrógeno que es más comúnmente empleado por los microorganismos anaerobios ya que los aerobios prefieren el amoniaco.

Para todos los tratamientos se utilizaron el mismo medio de cultivo, con lo que se obtuvieron diferencias en algunas características morfológicas de los microorganismos aislados, las cuales se mencionan a continuación:

En el tratamiento 3, se encontró en la colonia 9 de la cepa codificada VML 953 que se trata de una bacteria en forma de cocos Gram positivo con una coloración azul.

En el tratamiento 4 se identificó en la colonia 2 de la VLI # 652 bacterias Gram positivas en forma de cocos que presentan una coloración azul–morada y se mencionó que se podría tratar de un microorganismo de las especies *S. ruminantium*. *Lactylitica spp.*, ya que es Gram positivo también.

En el tratamiento 2, se identificó en la VAM 1004-2 y VAM 4906-3 bacterias en forma de cocos con tamaño mediano, Gram positivo de morfología redonda. Así también se reporta en la literatura que el número total de bacterias normalmente presentes en el contenido de líquido ruminal es de unas 10^{10} UFC por gramo y la proporción de cada tipo depende de la dieta del animal (Annison y Lewis, 1966). Por lo tanto, lo descrito anteriormente coincide con los resultados obtenidos en la caja VAM 205 (Figura 27, A) ya que se obtuvieron 18 cepas de las cuales se encontró que existen 11 cepas idénticas con un tamaño mediano por lo tanto son las más abundantes, en otras palabras, el contenido de líquido ruminal sembrado en esta caja poseería una gran cantidad de biomasa (Cuadro 23).

La colonia VAM 1004-2 (Figura 27, I) es la única que presentó un color blanco; sin embargo, el número total de colonias crecidas en esta caja fue de 4.

Como se mencionó anteriormente las condiciones de manejo y composición de la dieta puede eventualmente explicarnos las diferencias en los resultados reportados por los anteriores autores. En este sentido Kumar *et al.* (1994), Wiedmeier *et al.* (1987), Harrison *et al.* (1988), y Dawson *et al.* (1990), indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, bacterias viables totales, celulolíticas, amilolíticas y protozoarios.

Selenomonas ruminantium y *Desulphovibrio* son dos microorganismos aislados de líquido ruminal los cuales se describen como: bacilos Gram negativos, anaerobios y capaces de fermentar azúcares. Por su parte

Veillonella gazogenes y *Propionibacterium sp.*, pertenecen al grupo de los cocos Gram positivos, además de fermentar azúcares y formar ácidos propiónico, acético, CO₂ y H₂ (Annison y Lewis 1966). Comparados estos microorganismos con los aislados en AS poseen características similares.

En la Figura 27 se observan las características microscópicas de diferentes cepas (de la A a la I), la VAM 205-2 (B), es un bacilo Gram negativo de tamaño pequeño y ovalado, puntas redondas, gordos y cortos, estas características coinciden con las del microorganismo aislado *Succinivibrio dextrinosolvens* el cual fermenta diversos azúcares (Annison y Lewis, 1966). La colonia 5 de la caja VAM 205 (C) posee características de tamaño demasiado pequeños los cuales presentaron una morfología de cocobacilos delgados, cortos y ovalados, Gram negativos. Cocobacilos pequeños, ovalados, con puntas redondas, delgados y cortos Gram negativos son las características presentadas por la colonia número 4 de la caja VAM 1502 (D). En comparación con los cocobacilos de la colonia VAM 205-5 (C) fueron más pequeños en cuanto a tamaño y macroscópicamente son de elevación plana, forma irregular, aspecto húmedo, luz reflejada brillante y consistencia suave y viscosa, las dos colonias. El análisis microscópico de la colonia número 6 de la caja VAM 1502 (E), indica que son microorganismos bacilares de tamaño muy chico con puntas redondas, ovalados y delgados. Si se comparan con las demás colonias se encontró que: las colonias VAM 205-1, VAM 205-2, VAM 1502-7, y VAM 4906-5 son bacilos Gram negativos.

La colonia VAM-1502-7 (F) es un microorganismo Gram negativo con forma de bacilos ovalados y gordos con punta redonda de tamaño chico. Estas características coinciden con la morfología microscópica de la colonia VAM 4906-5 además de que macroscópicamente son muy parecidas, a diferencia de la elevación y la luz transmitida. En la caja VAM 4906 colonia 3 (G) se identificaron bacterias en forma de cocos de un tamaño chico y redondo. Comparada con la colonia VAM 1004-2 son microscópicamente muy parecidos

a excepción del tamaño y macroscópicamente son muy diferentes sobre todo en color, superficie, bordes, luz reflejada y luz transmitida.

En la H se observan microorganismos bacilares Gram negativos con forma ovalada, puntas ovaladas, gordos y de tamaño corto, los cuales pertenecen a la colonia 4906-5. En la I se muestra la colonia 2 de la caja VAM 1004 en donde se identificaron bacterias bacilares con tamaño mediano, Gram positiva de morfología redonda. Anisson y Lewis (1966) reportan que *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminobacter parvum* son cocos Gram negativos caracterizadas por poseer un pigmento amarillo aislados de líquido ruminal. Comparado estas bacterias aisladas en forma de cocos no coinciden ya que la bacteria VAM 4906-3 y VAM 1004-2 se retuvieron el colorante cristal violeta, por lo tanto se trataban de bacterias Gram positivas.

Comparando los resultados con la literatura se encontró que se aislaron 7 bacterias del género *Bacillus* Gram negativas. Annison y Lewis (1966) reportan que *Bacteroides succinogenes*, es un bacilo Gram negativo de color amarillo y estrictamente anaerobio; sin embargo, no coincide el color de la colonia con las 7 cepas que se identificaron.

Selenomonas ruminantium y *Desulphovibrio*, son dos microorganismos aislados de líquido ruminal los cuales se describen como: bacilos Gram negativos, anaerobios y capaces de fermentar azúcares. *Veillonella gazogenes* y *Propionibacterium* sp., pertenecen al grupo de los cocos Gram positivos, además de fermentar azúcares y formar ácidos propiónico, acético, CO₂ y H₂.

Comparando los resultados con la literatura se encontró que posiblemente se aislaron 7 bacterias del género *Bacillus* Gram negativas. Annison y Lewis (1966) reportan que *Bacteroides succinogenes*, es un bacilo Gram negativo de color amarillo y estrictamente anaerobio; sin embargo, no coincide el color de la colonia con las 7 cepas que se identificaron.

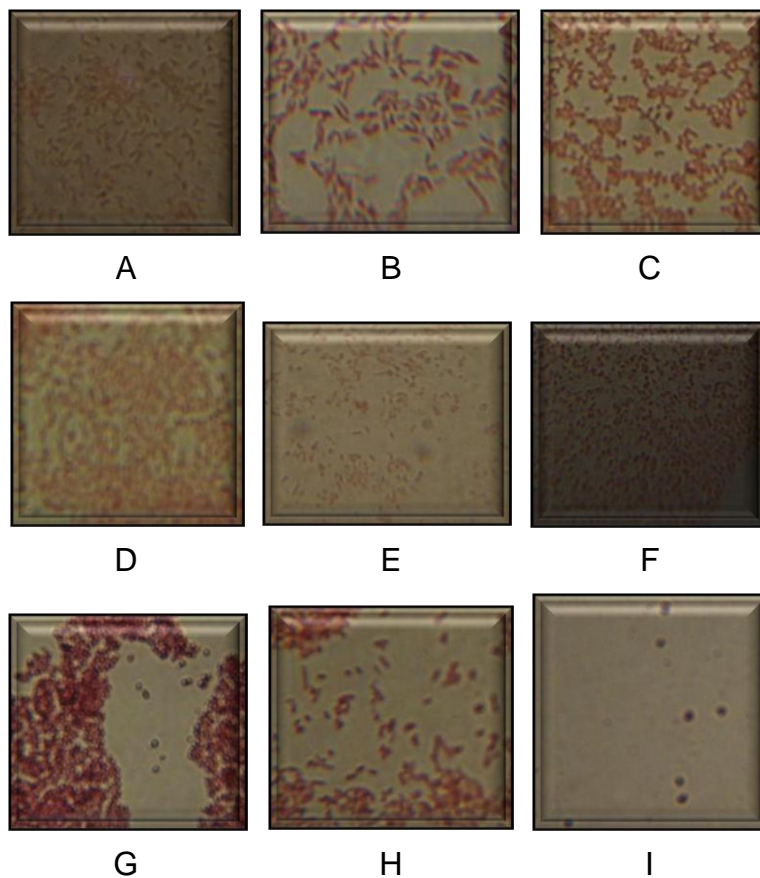


Figura 27. Características microscópicas de colonias codificadas como A) VAM 205-1, B) VAM 205-2, C) VAM 205-5, D) VAM 1502-4, E) VAM 1502-6, F) VAM 1502-7, G) VAM 4906-3, H) VAM 4906-5, I) VAM 1004-2, teñidas con Gram.

Para el tratamiento 3, en la figura 28 se pueden observar las cepas aisladas para este tratamiento (de la A a la K); haciendo una comparación de la morfología macro- y microscópica, se observa que la colonia 1 de la caja # 513 (A), y la colonia 10 de la caja # 953 coinciden en todas sus características morfológicas (cuadro 23). Al realizar la tinción de Gram de la colonia #1, se pudo notar que la cepa es un microorganismo Gram negativo. La morfología microscópica indica que se trata de un microorganismo en forma de cocobacilos pequeños. De acuerdo a Mateo-Sánchez *et al.*, (2002) el cocobacilo es una bacteria Gram negativa, no motil, esférica de 0.8-1.0 μm . Mientras que la

colonia # 10 (B), es un microorganismo Gram negativo y la morfología microscópica muestra que tienen forma de bacilos gruesos y largos.

La colonia 2 (C) y la colonia 11 (D) presentaron características macroscópicas similares y de tinción (Gram negativas), sin embargo los microorganismos de la colonia 11 poseen mayor grosor y son ligeramente más grandes que los observados en la colonia 2. Wiedmeier *et al.* (1987); Harrison *et al.* (1988), y Dawson *et al.* (1990); Kumar *et al.*, (1994), indican que la levadura incrementa el número de bacterias totales, bacterias viables totales, celulolíticas, amilolíticas y protozoarios.

La colonia 5 (E), presenta una morfología microscópica definida en cocobacilos pequeños y Gram negativos, las características macroscópicas de dicha colonia se mencionaron con anterioridad (Cuadro 23). Una morfología microscópica similar se observó en los microorganismos de la colonia 7 (F); sin embargo, la morfología macroscópica que presenta es completamente distinta. El análisis microscópico de la colonia 8 (G), indica que se trata de microorganismos bacilares, Gram negativos, gruesos y cortos; dicha morfología difiere completamente de la apreciada en las otras cepas aisladas. La colonia 9 (H) está compuesta de microorganismos Gram positivos, los cuales presentan una coloración azul-morada; esto se debe a que las paredes celulares son más gruesas (tienen más peptidoglicano y menos lípidos), no son permeables al disolvente empleado en la decoloración (alcohol-cetona), ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo de esta manera los espacios entre las moléculas, y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular (Bergey, 2005).

La misma coloración se presentó en los microorganismos pertenecientes a la colonia 12 (I), con la diferencia morfológica de que estos son bacilares, alargados y en ocasiones se observaban formas curvas o torcidas en las células. Las colonias 13 (J) y 22 coinciden en todas sus características morfológicas macro y microscópicas, Gram negativos, con estructura bacilar y ligeramente gruesa.

La colonia 16 (K), con las siguientes características morfológicas color blanco; forma circular; elevación convexa; superficie lisa; aspecto húmedo; bordes enteros; luz reflejada mate; luz transmitida opaca y consistencia suave, resulto ser Gram negativo con forma de bacilos esporulados.

Es importante mencionar que los aislamientos se realizaron en medios de cultivo convencionales para microorganismos anaerobios, ya que los medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales se dividen en 2 grupos: a) medios con contenido ruminal clarificado enriquecidos con glucosa, celobiosa, almidón, sales minerales, cisteína y en algunos casos, extracto de levadura; y b) medios sin contenido ruminal clarificados a los cuales se ha tenido que adicionar además de los componentes mencionados, ácidos grasos volátiles en pequeñas cantidades, hemina, y una serie de sustancias que asemejan el medio usando contenido ruminal.

En ambos tipos de medios se hace necesaria la adición de sustancias químicas que son factores de crecimiento (Caldwell, 1966); sin embargo, la elaboración de medios modificados a partir de sustratos de gran valor nutricional, en cuanto a nitrógeno y carbohidratos se refiere, representan elevados costos, por lo que se debe buscar alternativas para el aislamiento de estos microorganismos mediante el diseño de medios que minimicen el empleo de sustancias químicas adicionales.

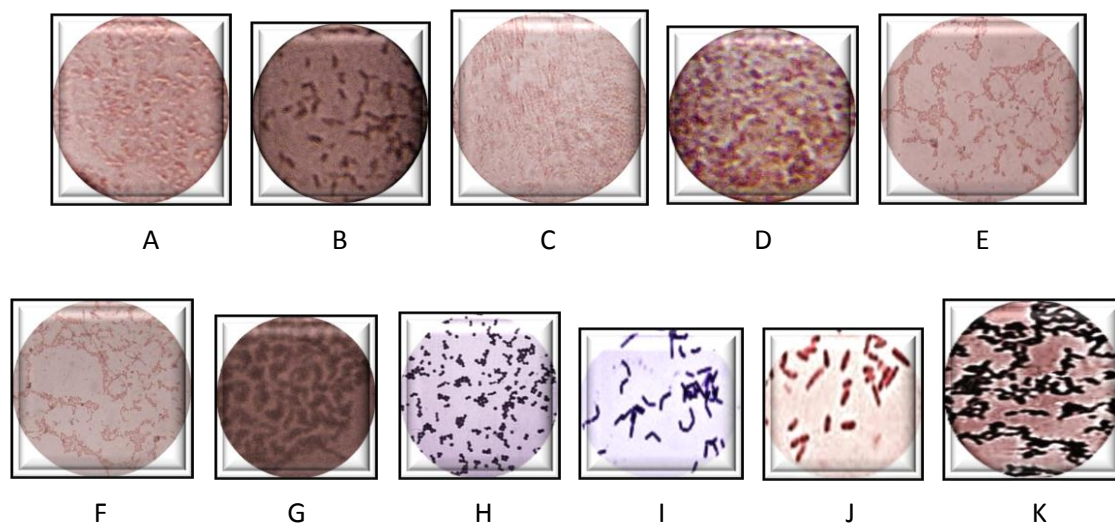


Figura 28. Morfología microscópica de las cepas, A) VML 513-1, B) VML 953-10, C) VML 513-2, D) VML 643-11, E) VML 513-5, F) VML 513-7, G) VML 953-8, H) VML 953-9, I) VML 643-12, J) VML 643-13 y K) VML 193-16, aisladas de líquido ruminal.

Para el tratamiento 4, los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 29 (de la A a la J), el cuadro 23 muestra que la morfología macroscópica de la colonia 1 de VLI #332 (A) coincide con la morfología de la colonia 3 de VLI #332 (B) presentando color beige, de forma circular, elevación convexa y superficie lisa, pero al realizar la tinción de Gram se pudo observar que se trata de microorganismos de forma de cocobacilos (Gram negativos); sin embargo, la colonia 1 de la VLI #332 (A) es un cocobacilo delgado y de tamaño mediano, mientras que la colonia 3 de la VLI #332 (B) es más corto y ligeramente más gruesas, de acuerdo con Mateo-Sánchez *et al.* (2002), un cocobacilo es Gram negativo, esférico de 0.8-1.0 mm y no motil.

La colonia 1 de la VLI #932 (C) se identificó microscópicamente tratándose de un microorganismo en forma de bacilos cortos Gram negativo, al igual se observó que la colonia 4 de la VLI #572 (J) se identificó microscópicamente también como bacilos Gram negativos, pero en la caracterización macroscópica presentaron morfología diferentes.

La colonia 2 de la VLI #932 (D) se observó microscópicamente y se trató de un microorganismo en forma de bacilos medianos y delgados Gram negativos, al igual que las colonias 3 (E) y 4 (F) de las VLI #932 se tratan de bacilos medianos pero ligeramente más gruesos que de los microorganismos de la colonia 2 (D) y la identificación macroscópica son completamente diferente como se pueden apreciar en el cuadro 23. Certes (1889), describió una bacteria ruminal en forma de media luna flagelado y las *Selonomonas* que fueron aislados en 1954, así como también Elsdén y Lewis (1953), aislaron del rumen una bacteria que tenía la capacidad de fermentar aminoácidos la cual fue clasificada en el género *Elsdenii de peptostreptococcus*.

En la colonia 5 de la VLI # 932 (G) se pudo observar que los microorganismos presentaban una forma definida bacilar mediana Gram negativa.

La colonia 2 de la VLI #652 (H), se identificó microscópicamente como un microorganismo Gram positivo en forma de cocos presentando una coloración de azul-morada, Orlajensen en 1919, aisló un coco Gram positivo, facultativo del rumen y fue clasificado como *Streptococcus bovis*. De acuerdo a la revisión de literatura, la colonia 2 de la VLI #652 puede tratarse de un microorganismo de las especies *S. ruminantium* spp. *Lactylitica*, ya que es Gram positivo.

En la colonia 3 (I) y 4 (J), de la VLI #572 se pudieron apreciar microscópicamente que se tratan de microorganismos similares de formas bacilares de tamaños medianos, pero de la colonia 3 (I), son bacterias ligeramente más gruesos que los microorganismos de la colonia 4 (J), y presentan las 2 colonias una coloración de Gram negativos. Pero se hizo la caracterización macroscópica (Cuadro 23) y se identificaron morfológicamente como microorganismos completamente diferentes. La colonia 3 (I), presenta color beige, forma circular, elevación plana, en tanto, que la colonia 4 (J), presenta coloración beige, de forma irregular y elevación convexa.

Reportes en la literatura menciona algunas bacterias aisladas del rumen de la vaca, Hungate (1944) desarrollo un medio específico para anaerobios donde obtuvo aislamiento de coco celulolíticos gram negativos, en 1953 Bryant y Burkey, aislaron tres bacterias gram negativos las cuales fueron clasificados como Succinato (*Bacteroide ruminicola*), género *Succinivibrio* y *Succinomonas*, en 1956, Bryant aisló una bacteria de forma flagelado que produjo grandes cantidades de ácido butírico, y fue clasificado como *Butirivibrio fibrisolvens*.

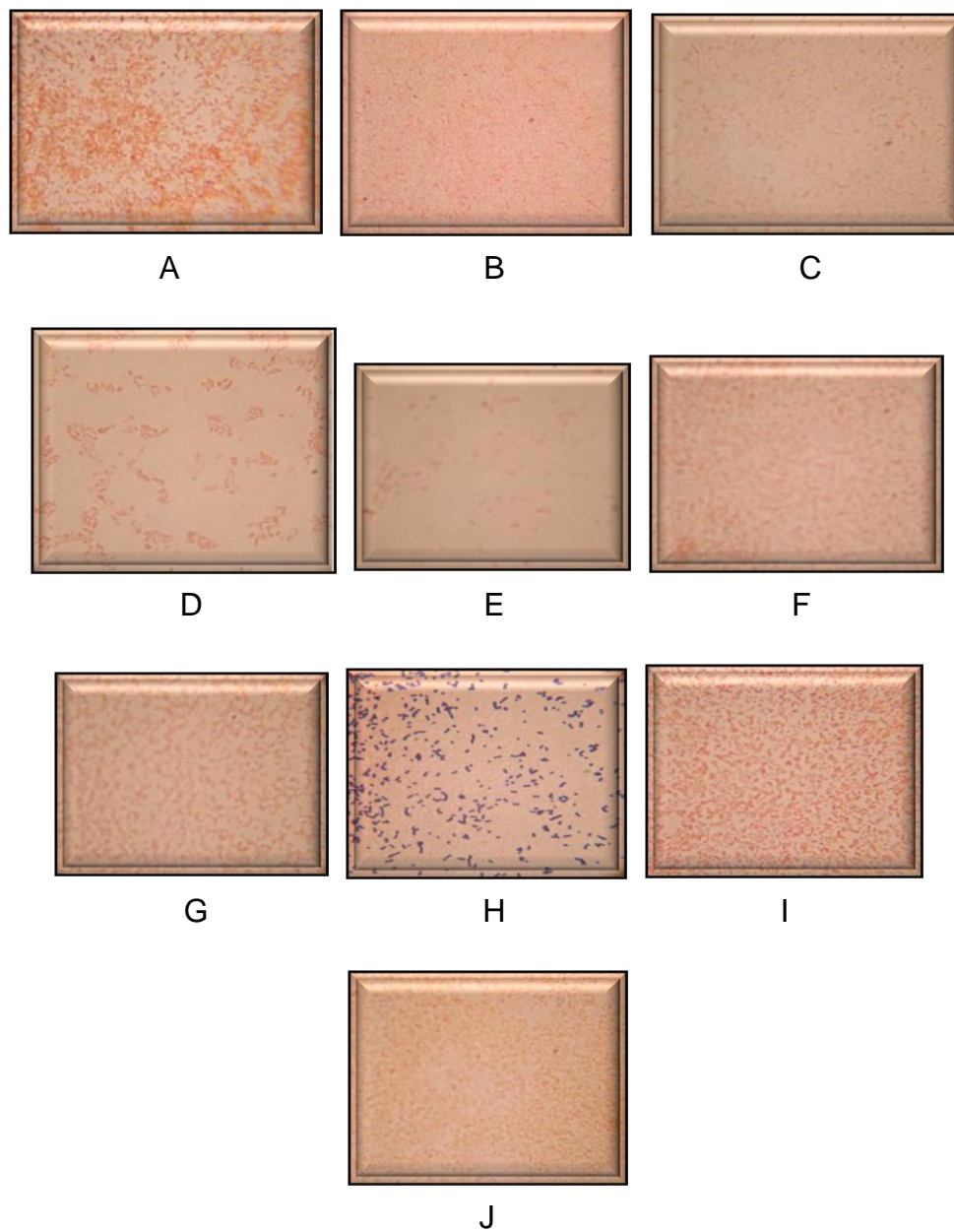


Figura 29. Morfología microscópica de las colonias A) VLI 332-1, B) VLI 332-3, C) VLI 932-1, D) VLI 932-2, E) VLI 932-3, F) VLI 932-4, G) VLI 932-5, H) VLI 652-2, I) VLI 572-3, J) VLI 572-4, aisladas del líquido ruminal teñidos con Gram.

Identificación del Metabolismo Bioquímico de las Cepas Bacterianas Obtenidas

Identificación del Metabolismo Microbiano. Las pruebas bioquímicas determinan la actividad metabólica, las preferencias nutricionales y la capacidad enzimática de un microorganismo a partir de un sustrato definido, el cual se encuentra incorporado en un medio de cultivo y que en muchas ocasiones está relacionado con un indicador que marque cambios en pH proporcionales al consumo del nutriente de interés.

El cuadro 24 indica los resultados bioquímicos obtenidos al analizar los procesos y requerimientos metabólicos de los microorganismos aislados.

Cuadro 24. Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas del tratamiento 1.

CEPA	Citrato														
	de Simmons	24 hrs	48 hrs	Agar LIA	24 hrs	48 hrs	Caldo Urea	24 hrs	48 hrs	Agar Mio	24 hrs	48 hrs	Agar Sim	24 hrs	48hrs
1003-2 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2606 -2 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3505-3 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1003-3 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2606-3 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
901- 3 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1003-5 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3505-5 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2506-3 VC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Cuadro 25. Resultados de pruebas bioquímicas para cada cepa del tratamiento 2.

Cepa	Citrato de Simmons	24	48	Agar	24	48	Urea	24	48
		Hrs.	Hrs.	LIA	Hrs.	Hrs.		Hrs.	Hrs.
VAM 205-1	-			+		√	-		
VAM 205-2	+		√	+		√	-		
VAM 205-5	-			-			-		
VAM 1004-2	-			-			-		
VAM 1502-4	-			+	√		-		
VAM 1502-6	-			+	√		-		
VAM 1502-7	-			+		√	-		
VAM 4906-3	-			-			-		
VAM 4906-5	-			-			-		

Cuadro 26. Resultados de las pruebas bioquímicas para las cepas del tratamiento 3.

Cepa	MacConkey		Citrato de Simmons	
	48 Hrs.	72 Hrs.	48 Hrs.	72 Hrs.
VML 513-1	-	-	-	+
VML 513-2	-	+	+	+
VML 513-5	-	+	+	+
VML 513-7	+	+	+	+
VML 953-8	-	-	+	+
VML 953-9	-	-	-	+
VML 953-10	-	-	-	+
VML 643-12	-	-	-	-
VML 643-13	-	-	-	-
VML 193-16	-	-	-	-

Cuadro 27. Relación del comportamiento bioquímico de cepas aisladas de rumen bovino, a las 24 y 48 horas de incubación para el tratamiento 4

Cepa	MacConkey		Citrato de Simmons	
	48 Hrs.	72 Hrs.	48 Hrs.	72 Hrs.
VLI 932-1	-	-	-	+
VLI 932-2	-	-	-	-
VLI 932-3	+	-	+	
VLI 932-4	-	-		+
VLI 932-5	-	+	-	+
VLI 332-1	-	+	-	+
VLI 332-3	-	+	-	+
VLI 572-3	+		-	+
VLI 572-4	-	+	-	+
VLI 652-2	-	+	-	+

Agar Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar). Es una de las pruebas empleadas usado para diferenciar enterobacterias, el crecimiento consume el ácido y como consecuencia se produce un incremento de pH en el medio y el indicador vira de verde a azul rey o azul de prusia.

La utilización del citrato como única fuente de carbono se detecta mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza como el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7.6.

Se realizó la caracterización bioquímica de las primeras 9 cepas puras con la prueba bioquímica citrato de Simmons, donde se puede observar que las cepas 1003-2, 2606-2, 3505-3, 1003-3, 2606-3, 901-3, 1003-5, 3505-5 y 2506-3 no hubo crecimiento microbiano (Cuadro 24 y Figura 30).



Figura 30. Prueba bioquímica Citrato de Simmons para las cepas del tratamiento 1.

Para el tratamiento 2 (Cuadro 25), en la Figura 31 el tubo azul pertenece a la cepa VAM 205-2 que fue la única que se observó citrato positivo a las 48 horas y hubo un cambio de vire en el indicador azul de bromotimol modificando el pH del medio, por lo que es posible que esta cepa sea un *Streptococcus*. Se ha demostrado que los *Streptococcus* son microorganismos importantes de la flora del rumen. Briggs *et al.* (1966), mediante exámenes serológicos detallados de los estreptococos del rumen, demostró que la bacteria principal presente en el rumen de bovino es *Streptococcus bovis* del grupo D de Lancefield. Hay detalles que indican que los *Streptococcus* del rumen son anaerobios facultativos.



Figura 31. Cepa VAM 205-2 del metabolismo microbiano (Citrato de Simmons)

En esta misma prueba para el tratamiento 3, la cepa 2 es citrato positivo y lactosa positiva hasta las 72 h, ya que la hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo.

La cepa 5 es lactosa positiva a partir de las 72 h y citrato positivo (Figura 32), lo cual significa que la cepa posiblemente sea una *Enterobacteria*.



Figura 32. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo cepa 5.

La cepa 7 es lactosa y citrato positiva, lo cual nos indica que la cepa probablemente se trate de una *Enterobacteria* que hidroliza lactosa.

La cepa 8 es lactosa negativo y citrato positivo (Figura 33) lo cual nos indica que es una *Enterobacteria* que no hidroliza lactosa.



Figura 33. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo cepa 8.

La cepa 9 es citrato positivo y lactosa negativo, por lo que los resultados coinciden con la literatura, ya que el Citrato de Simmons es medio diseñado principalmente para bacterias Gram negativo (Bergey, 2005), por lo que muchas Gram positivas, como es el caso de esta cepa, tienden a dar un resultado negativo en esta prueba. La cepa 10 es lactosa negativo y citrato positivo con crecimiento a partir de las 72 h, como se muestra en la Figura 34.



Figura 34. Prueba bioquímica Citrato de Simmons positivo cepa 10.

Las cepas 12, 13 y 16 probablemente no sean *Enterobacterias*, ya que las tres resultaron lactosa y citrato negativo.

Considerando los resultados obtenidos podemos mencionar que en la literatura se manejan diferentes microorganismos predominantes en el rumen bovino que podían relacionarse con los datos metabólicos detectados.

Streptococcus bovis es una bacteria que normalmente se encuentra en bajo número en el rumen (Mantovani y Russell, 2001), pero su número puede aumentar rápidamente si se cambia bruscamente la dieta del animal de forrajera a concentrado. Esta bacteria tiene una actividad amilasa muy elevada, crece rápidamente y puede desplazar al resto de las bacterias cuando la dieta es rica en almidón. Además *S. bovis* produce acetato, formato, y etanol cuando las concentraciones de carbohidratos en la dieta son bajas, pero cuando la disponibilidad de hidratos de carbono altamente fermentables es elevada, tiene

una fermentación homoláctica, debido a la inhibición de la enzima piruvato formatoliasa a pH's ácidos (Slyter, 1976).

Por otra parte, las especies utilizadoras de lactato, como pueden ser *Megasphaera elsdenii*, *S. ruminantium* spp. *lactylitica*, pueden reducir el riesgo de acidosis convirtiendo parte del lactato a acetato y propionato. *M. elsdenii* es una bacteria Gram negativa que se encuentra en el rumen principalmente de animales jóvenes (Hobson, 1958) y en animales que reciben raciones altas de concentrado, en la que la producción de lactato asume principal importancia. Esta bacteria contribuye en $74\pm 13\%$ a la fermentación de lactato, aunque está influenciado por el tipo de dieta administrada y por el animal (Counotte, 1983). Además, su actividad no está sujeta a la represión por parte de la glucosa o maltosa, y su contribución al metabolismo del lactato incrementa como respuesta a la administración de carbohidratos solubles, los cuales reprimen la función de *Selenomonas* y otras bacterias utilizadoras de lactato (Counotte, 1981). Sin embargo, el crecimiento de *M. elsdenii* es más lento que el de *S. bovis*.

Existen varios trabajos y revisiones acerca de los efectos de la inclusión de levaduras vivas en las raciones de rumiantes y se han descrito varios mecanismos de acción (Newbold, 1996). Por un lado, resulta de un incremento en el número total de microorganismos, el cual se explica por un aporte de nutrientes (principalmente malato, además de aminoácidos, vitamina B, etc.), por parte de las levaduras, y al consumo del oxígeno para su respiración. Este medio (rumen) más rico en nutrientes y a la vez más anaeróbico, propicia el aumento de bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*, el de bacterias utilizadoras de ácido láctico (Nisbet, 1991) y el de hongos celulolíticos como *Neocallimastic ffontalis* (Chaucheyras, 1995). Además, las levaduras disminuyen la concentración de lactato: por un lado parecen estimular la utilización de lactato por parte de *S. ruminantium* y el de *M. elsdenii* (Chaucheyras, 1996) resultando en un aumento de propionato (Lila, 2004), y por otra parte, disminuyen la producción de lactato por parte de *S.*

bovis, ya que las levaduras compiten con esta bacteria por la glucosa (Chaucheyras, 1996).

El mecanismo de acción de los cultivos de levaduras no se basa en los efectos de la levadura como organismo vivo, y es debido a su alto contenido de nutrientes (β -glucanos, nucleótidos, ácidos orgánicos, aminoácidos y/o vitaminas). Por consiguiente se ha mostrado que estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas y de bacterias utilizadoras de ácido láctico, con el consiguiente descenso de lactato en el medio (Nisbet, 1991).

En el caso del tratamiento 4 (Cuadro 27) para esta prueba bioquímica, la cepa 932 colonia 2 no tuvo crecimiento; la cepa 932 colonia 3 tuvo crecimiento a las 48 horas y en todas las demás cepas se observaron crecimiento a las 72 horas, lo que indica que las bacterias que hidrolizan citrato reaccionan a las 72 h.

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de *Enterobacterias*. Esta se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH de 7.6 El medio contiene citrato sódico, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador; este se tornará azul cuando el medio se alcaliniza. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que este se alcalinice y el indicador vire a azul. Por lo tanto esto indica que las bacterias que fueron positivas son *Enterobacterias* que reaccionan a las 72 hrs o que empiezan a liberar amonio al medio en ese tiempo.

En la Figura 35 se muestran los tubos con los medios empleados y el crecimiento microbiano obtenido, como se puede observar, en el medio citrato de Simmons hay un cambio de color el indicador tira de verde a azul de bromotimol, esto es a consecuencia que el crecimiento de *Enterobacterias*

liberan iones amonio al medio (degradación de fosfato amonio), produciendo un incremento de pH en el medio.

Considerando los resultados obtenidos se puede mencionar que en la literatura se manejan diferentes microorganismos predominantes en el rumen bovino que podrían relacionarse con los datos metabólicos detectados.

Streptococcus bovis, es una de las bacterias que podría encontrarse entre estas cepas, por los mismos motivos citados con anterioridad en explicaciones de este misma prueba bioquímica.

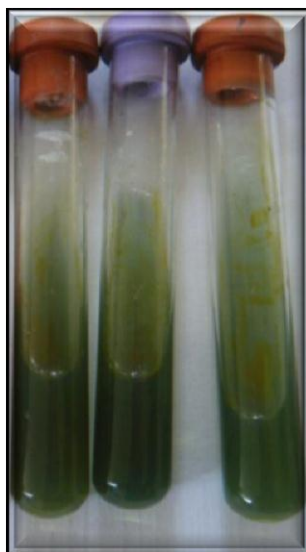


Figura 35. Pruebas bioquímicas para citrato de Simmons realizadas a las cepas puras.

Agar Hierro Lisina (Agar LIA o Lisyne Iron Agar). Esta prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Durante la primer etapa de la inoculación el fondo virara el indicador de pH de medio al acido (amarillo) (Figura 36), por la fermentación de la glucosa. Se obtuvo un resultado negativo.



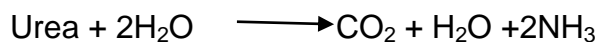
Figura 36. Prueba bioquímica Agar LIA

Y los resultados para el tratamiento 2 (Cuadro 25) que se obtuvieron, fueron de que las cepas VAM 205-1, VAM 205-2 y, VAM 1502-7, a las 48 horas obtuvieron la desanimación positivas así como también las cepas VAM 1502-4 y, VAM 1502-6 solo que fueron positivas a las 24 horas dando como resultado un color rojo intenso como se muestra en la Figura 37; esta desaminación produce un ácido y un NH_3 y se visualiza en la superficie mediante la aparición de un color rojo intenso y la producción de H_2S a partir de tiosulfato visualizado por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro. Sin embargo, las demás cepas fueron negativas quedando de color amarillo.



Figura 37. Cepa VAM 1502-4 del metabolismo microbiano (Agar de Hierro y Lisina)

Caldo Urea. La urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciéndose alcalinización y aumento de pH del medio. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea de acuerdo a la siguiente reacción química:



Las 9 cepas puras del tratamiento 1, dieron urea negativa (Figura 38), esto significa que los microorganismos no producen la enzima ureasa.

En el tratamiento 2, las nueve cepas puras dieron urea negativa, de igual manera que en el tratamiento 1 (Cuadro 25).



Figura 38. Prueba bioquímica caldo urea

Medio Movilidad-Indol-Ornitina (Medio MIO o Motility Indole Ornithine Médium). Se empleó la prueba MIO para determinar la movilidad, presencia de una actividad de las enzimas ornitina de carboxilasa y la producción de indol. Los resultados de ornitina de carboxilasa fueron negativos de color amarillo (Figura 39).



Figura 39. Pruebas bioquímicas en medio MIO

Agar SIM (Sulfide Indole Motility Medium). Es el medio que permite poner en evidencia la producción de indol, ácido sulfhídrico y movilidad de las bacterias. Los resultados son:

Cepas móviles: produjeron turbidez del medio, que se extendieron más allá de la línea de siembra. Cepas SH₂ positivas: ennegrecimiento en todo el medio. Indol: sin cambio de color. De las del tratamiento 1 en su mayoría fueron positivas a esta prueba bioquímica, a excepción de dos cepas que dieron negativa, las cuales fueron 1003-3 VC y 2606-3 (Cuadro 24 y Figura 40).



Figura 40. Pruebas bioquímicas en medio SIM

Agar MacConkey. La prueba bioquímica MacConkey cuando es positiva indica la hidrólisis de la lactosa produciendo ácidos orgánicos y las colonias que hidrolizan lactosa adquieren un color rojo, pero aunque las colonias lactosas negativas permanecen incoloras el medio se torna amarillo debido a un

incremento en el pH del medio provocada por la alcalinización derivada de la utilización de compuestos proteicos (peptona).

Para el tratamiento 3 (Cuadro 26), la cepa 1 es lactosa negativa (Figura 41), y citrato negativo a las 48 h y positivo a las 72 h, ya que se observó un cambio de vire en el indicador azul de bromotimol. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que este se alcalinice y el indicador vire a azul.



Figura 41. Prueba bioquímica Agar MacConkey negativo (cepa 1).

Los resultados obtenidos para el tratamiento 4 (Cuadro 27); se hizo la caracterización bioquímica de 10 cepas puras con la prueba bioquímica MacConkey donde se puede observar que las cepas 932 colonia 1, 2 y 4 no presentaron crecimiento bacteriano en las 48 y 72 horas, la cepa 932 colonia 3 y la cepa 572 colonia 3, en caso contrario si se observó crecimiento a las 48 horas y las demás cepas crecieron a las 72 horas, es cuando se observaron cambios de color en las pruebas bioquímicas (Figura 42).



Figura 42. Pruebas bioquímicas para citrato de Simmons realizadas a las cepas puras.

Identificación Molecular

Extracción de ADN de Bacterias del Rumen Bovino. Según Concepción y Ureña (2005), la biología molecular constituye una poderosa herramienta ampliamente utilizada tanto en la investigación básica como aplicada dentro del ámbito de las ciencias biológicas y biomédicas. Adicionalmente, con el desarrollo de múltiples proyectos genomas de organismos, no sólo de interés médico sino también biotecnológico, y el advenimiento de las iniciativas Transcriptoma, Proteóma, Metaboloma e Interactoma entre otras.

Es debido a esto que se consideró la identificación molecular de los microorganismos con los que con anterioridad tuvieron una identificación macroscópica, microscópica y bioquímica, de tal forma a contar con una identificación completa para la cual de las 38 bacterias analizadas, en su totalidad se consiguió realizar la extracción.

Para el trabajo de extracción se tuvo que buscar técnicas que extraigan adecuadamente el ADN, para los que se utilizaron 2 técnicas unas para las bacterias gram negativas y otra para las Gram positivas

En el trabajo de extracción siempre se buscó observar en el gel de agarosa bandas sin barridos como los que se pueden observar en las muestras codificadas en la Figura 43, con los siguientes números, 30 a la 38, lo cual nos garantiza una extracción de ADN con calidad para la posterior elaboración de PCR, pero también se pueden observar en la misma figura que en el transcurso de las extracciones iban apareciendo barridos como en las muestras 20, 27 y 28, los que eran de nuevo sometidos a una extracción de ADN, en el caso de que las bandas sean más tenues, eran tratados con ARNasa ó Proteinasa K.

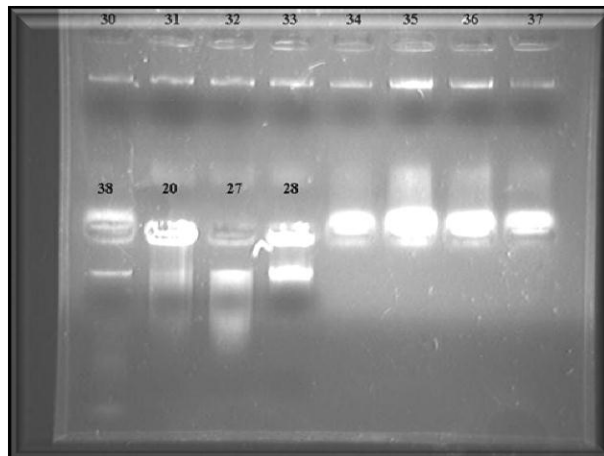


Figura 43. Gel de agarosa con ADN en cada carril para corroborar calidad de extracción.

Técnica de PCR. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), considerada hoy en día como una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética, la cual busca disponer de una cantidad suficiente de una parte de la cadena de ADN como para utilizarlo con fines diversos, utilizando una pequeña cantidad de ADN (Luque y Herráez, 2001), fue utilizada para que a partir de ella las 38 muestras fuesen enviadas a Macrogen Inc. para realizar la secuencia de las mismas.

En la elaboración de PCR, se realizaron ajustes necesarios en la cantidad de reactivos utilizados y en los programas manejados en el termociclador, ya que lo que se buscaba eran bandas específicas lo que aseguraba que la PCR estaba en condiciones para una secuencia apropiada. En la Figura 44 se puede observar la calidad de PCR un gel de agarosa, realizado en algunas muestras con sus respectivas codificaciones con los números que se encuentran arriba de cada banda, las deseadas son las 24, 30, 31, 32 y 33 en cambio las 20 y 27 son indeseadas por sus bandas específicas las cuales eran sometidas a una nueva elaboración de PCR.

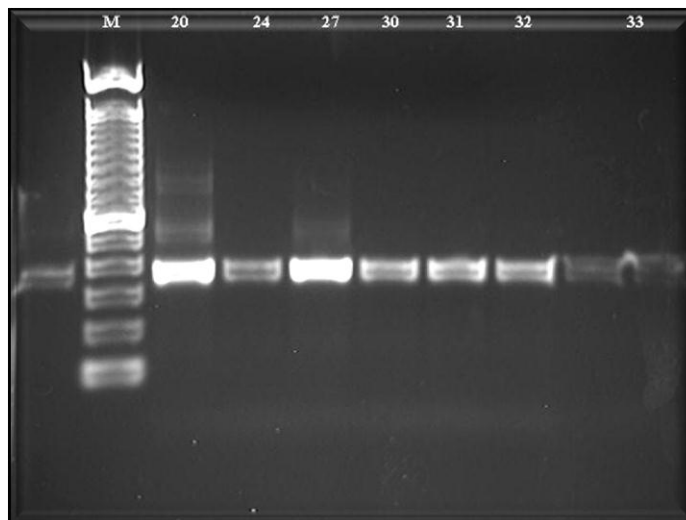


Figura 44. Gel de agarosa con ADN en cada carril para verificar la calidad de PCR realizado de cada muestra.

Secuencia. La secuencia resultante del análisis realizado por la empresa Macrogen Inc. se puede apreciar en el Cuadro 28, las cuales se pueden observar que no son las 38 analizadas con anterioridad ya que para la identificación se consideró un porcentaje como mínimo de 95% de similitud en la secuencia, sólo 20 bacterias presentaron esta similitud, las demás 18 cepas bacterianas, se recomienda realizar un nuevo proceso de identificación molecular. El análisis de comparación se llevó a cabo mediante la página de internet del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en dicha página existe un link de buscadores de secuencia, el que se utilizó fue el Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), la búsqueda fue hecha en base a la lista o base de datos de nucleótidos, las muestras fueron analizadas en conjunto, para realizar este tipo de búsqueda se debe contar un archivo en formato Blast, para lo cual se requirió de un programa, el que se utilizó fue el Bioedit, posterior a eso se subió el archivo en dicho formato y la búsqueda o comparación fue hecha en Blastn.

Cuadro 28. Resultados de las comparaciones de cada muestra para la identificación

MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE BACTERIA C/ MAX. IDENTIDAD	ACCESO	TOTAL DE ANOTACIÓN	VALOR DE ERROR	% MAX. DE IDENTIDAD
513-1 VML	<i>Bacillus sp. bD3(2011)</i>	JF772468.1	600	3e ⁻¹⁶⁸	99%
1502-6 VAM	<i>Bacillus sp. bD3(2011)</i> 16S	JF772468.1	576	3e ⁻¹⁶¹	99%
205-2 VAM	<i>Bacillus sp. KZ AalM</i> Mm3	GU726185.1	585	6e ⁻¹⁶⁴	100%
1502-7 VAM	<i>Bacillus sp. KZ AalM</i> Mm3	GU726185.1	578	8e ⁻¹⁶²	99%
932-1 VLI	<i>Bacillus sp. KZ AalM</i> Mm3	GU726185.1	576	3e ⁻¹⁶¹	100%
932-2 VLI	<i>Bacillus sp. KZ AalM</i> Mm3	GU726185.1	583	2e ⁻¹⁶³	99%
932-4 VLI	<i>Bacillus sp. KZ AalM</i> Mm3	GU726185.1	583	2e ⁻¹⁶³	99%
932-5 VLI	<i>Bacillus sp. L74</i>	AM913938.1	578	8e ⁻¹⁶²	100%
4906-3 VAM	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378697.1	560	2e ⁻¹⁵⁶	98%
1003-2 VC	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378666.2	576	3e ⁻¹⁶¹	100%
2606-2 VA	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378666.2	583	2e ⁻¹⁶³	100%
2606-3 VA	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378666.2	585	6e ⁻¹⁶⁴	100%
901-3 VC	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378666.2	585	6e ⁻¹⁶⁴	99%
1003-5 VC	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378666.2	576	3e ⁻¹⁶¹	99%
2506-3 VC	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N11	FJ378666.2	590	1e ⁻¹⁶⁵	99%
953-9 VML	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N42	FJ378697.1	531	1e ⁻¹⁴⁷	96%
1004-2 VAM	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N42	FJ378697.1	540	2e ⁻¹⁵⁰	97%
652-2 VLI	<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-N42	FJ378697.1	531	1e ⁻¹⁴⁷	96%
3505-3 VC	<i>Enterococcus faecium</i> strain IMAU60169	FJ749883.1	567	2e ⁻¹⁵⁸	100%

3505-5 VC	<i>Enterococcus sp. DME</i>	EU522077.1	583	$2e^{-163}$	100%
-----------	-----------------------------	------------	-----	-------------	------

La secuencia de la identificación se encuentra en el Anexo 13

Según la comparación de la secuencia de las muestras con los diferentes tipos de secuencias encontrados, se pueden apreciar 7 tipos de microorganismos:

- a) *Bacillus sp. bD3(2011)*
- b) *Bacillus sp. KZ AaIM Mm3*
- c) *Bacillus sp. L74*
- d) *Enterococcus faecium strain HN-N11*
- e) *Enterococcus faecium strain HN-N42*
- f) *Enterococcus faecium strain IMAU60169*
- g) *Enterococcus sp. DME*

De los cuales son dos géneros encontrados: *Bacillus* y *Enterococcus*. Entre las alternativas actuales para manipular la fermentación ruminal y mejorar la eficiencia alimenticia de las dietas de bovinos, se encuentra el uso de enzimas fibrolíticas. Los productos enzimáticos son extractos de la fermentación de bacterias (*Bacillus sp.*) o de hongos (*Trichoderma* y *Aspergillus sp*) que originan y contienen determinado perfil de actividades enzimáticas (Beauchemin y Rode, 1997). Algunos autores han reportado los efectos benéficos de las enzimas sobre la digestión de los componentes de la dieta. Beauchemin *et al.*, (1999), encontraron un incremento de la digestibilidad en los forrajes henificados y concentrados. Zinn y Salinas (1999) observaron aumento de la digestibilidad ruminal de 23 y 5% en la de la fibra detergente neutro (FDN) y del nitrógeno (N) respectivamente, con el uso de enzimas fibrolíticas.

Aunque existe una gran variabilidad de productos enzimáticos comercializados para el ganado, estos se derivan fundamentalmente de sólo cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* y *Streptococcus faecium*), tres especies de hongos (*Aspergillus oryzae*,

Trichoderma reesei y *Saccharomyces cerevisiae*) (Muirhead, 1996). Otras especies de hongos, incluyendo *Humicola insolens* y *Thermomyces amiginosus*, están siendo comercializadas en una menor medida. Es importante mencionar que *Streptococcus faecium* es el nombre antiguo de *Enterococcus faecium*, según Schleifer y Kilper (1984), los miembros de este género eran clasificados como *Streptococcus* Grupo D hasta 1984 cuando los análisis de ADN genómicos indicaron que un género separado era más apropiado (*Enterococcus*).

Al concluir el trabajo de identificación molecular mediante el Cuadro 29, se resume la identificación completa de 20 bacterias de las 38 existentes.

Cuadro 29: Resumen de bacterias identificadas del rumen de vacas Holstein alimentadas con subproductos de cervecera en Saltillo, Coahuila, México.

Codificación	Identificación Macroscópica									Identificación Microscópica	Identificación Bioquímica	Identificación Molecular
	Color y Tamaño	Forma	Elevación	Superficie	Aspecto	Bordes	Luz Reflejada	Luz Transmitida	Consistencia			
513-1 VML	Beige	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	Cocobacilos Gram-	MacConkey: - C. Simmons: + (72 Hrs)	<i>Bacillus sp. bD3(2011)</i>
1502-6 VAM	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	Bacilos Gram-	C. Simmons y C. Urea: - Agar LIA: + (24 Hrs)	<i>Bacillus sp. bD3(2011) 16S</i>
205-2 VAM	Beige	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave y viscosa	Bacilos Gram-	C. Simmons y Agar LIA: + (48 Hrs) C. Urea: -	<i>Bacillus sp. KZ AalM Mm3</i>
1502-7 VAM	Beige	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave y viscosa	Bacilos Gram-	C. Simmons y C. Urea: - Agar LIA: + (48 Hrs)	<i>Bacillus sp. KZ AalM Mm3</i>
932-1 VLI	Anaranjado (6 mm)	Circular	Convexa	Rugosa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	Bacilos Gram-	MacConkey: - C. Simmons: + (72 Hrs)	<i>Bacillus sp. KZ AalM Mm3</i>
932-2 VLI	Anaranjado (14 mm)	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	Bacilos Gram-	MacConkey y C. Simmons: -	<i>Bacillus sp. KZ AalM Mm3</i>
932-4 VLI	Beige (5 mm)	Circular	Umbonada	Rugosa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	Bacilos Gram-	MacConkey: - C. Simmons: + (72 Hrs)	<i>Bacillus sp. KZ AalM Mm3</i>
932-5 VLI	Beige	Irregular	Umbonada	Rugosa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave	Bacilos Gram-	MacConkey y C. Simmons: + (72 Hrs)	<i>Bacillus sp. L74</i>
4906-3 VAM	Amarillo opaco	Circular	Convexa	Rugosa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA y C. Urea: -	<i>Enterococcus faecium strain HN-N11</i>
1003-2 VC	Beige claro	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Traslúcida	Cremosa	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N11</i>
2606-2 VA	Amarillo	Circular	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Opaca	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N11</i>
2606-3 VA	Beige	----	Plana	Lisa	Seco	Regulares	Brillante	Opaca	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio y	<i>Enterococcus</i>

											Agar Sim:-)	<i>faecium strain HN-N11</i>
901-3 VC	Beige	----	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Traslúcida	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N11</i>
1003-5 VC	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Regulares	Brillante	Traslúcida	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N11</i>
2506-3 VC	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Traslúcida	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N11</i>
953-9 VML	Blanco (1 mm)	Circular	Pulvinada	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Opaca	Suave	Cocos Gram+	MacConkey: - C. Simmons: + (72 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N42</i>
1004-2 VAM	Blanco	Circular	Convexa	Lisa	Húmedo	Enteros	Mate	Traslúcida	Suave y viscosa	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA y C. Urea: -	<i>Enterococcus faecium strain HN-N42</i>
652-2 VLI	Café pálido	Irregular	Convexa	Lisa	Húmedo	Irregulares	Brillante	Opaca	Suave	Cocos Gram+	MacConkey y C. Simmons: + (72 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain HN-N42</i>
3505-3 VC	Blanco	----	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Opaca	Cremosa	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus faecium strain IMAU60169</i>
3505-5 VC	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Húmedo	Enteros	Brillante	Transparente	Suave	Cocos Gram+	C. Simmons, Agar LIA, C. Urea y Agar Mio: - Agar Sim: + (24 y 48 Hrs)	<i>Enterococcus sp. DME</i>

Etapas III

Creación de un cepario de bacterias ruminales de bovinos.

Purificación y mantenimiento de las cepas obtenidas

Purificación de los microorganismos aislados. Las treinta y ocho cepas purificadas se inocularon en primer lugar en AS para comprobar crecimiento homogéneo de la misma cepa y luego en tubos con tioglicolato, dando como resultado diferentes tiempos de crecimiento uniforme, los cuales fueron entre las 24 h. y 72 h, para ambos medios. En el tratamiento 1, se obtuvieron colonias de coloración blanca y redondas, el medio se mantuvo normal no hubo cambios de coloración ni rompimiento.

En el tratamiento 2, se observó una de las características importantes de las cepas VAM 1502-4, VAM 1502-6 y VAM 1502-7 es que rompieron el medio, esto es un signo de que son productoras de gas, lo cual puede ser debido por un proceso fermentativo de azúcares presentes en el medio o bien por la utilización de compuestos azufrados que generan ácido sulfúrico.

En el tratamiento 3, se observó un oscurecimiento en el color del medio en la VML 513, cepas 3 y 10, esto se debe a que sus cepas pudieron arrojar pigmentos.

En el tratamiento 4, se observó en la colonia 5 de la cepa codificada con el número 932 una producción de gases probablemente por fermentación de las fuentes de carbono presentando en el medio, dejando el medio partido en pedazos.

Una vez que se constató el crecimiento homogéneo y que ya había crecido en tioglicolato de Na, se procedió a liofilizarlos, en donde el paso anterior de congelamiento a liofilización es de vital importancia, como cerciorarse de que el aparato esté haciendo un adecuado vacío. Después de que el aparato esté realizando todo el trabajo de liofilización los microorganismos fueron

almacenados y etiquetados adecuadamente, para poder mantener cepas puras, que sirvan para futuras investigaciones.

Etapa IV

Producción de Enzimas como Prospectivas Biotecnológicas

Producción de Proteasa, de la Cepa 2506-3 VC del Tratamiento 1. En la figura 45 se muestra la curva de crecimiento en medio líquido de tioglicolato de sodio, un medio específico para anaerobios, el cual aporta los nutrientes y las condiciones necesarias para su crecimiento. Para escoger la cepa se requirió antes hacer pruebas entre las cepas del mismo tratamiento de tal forma a ver cuál era la que mejor producción de enzima poseía, y la que presentó la mayor producción fue con la que se trabajó

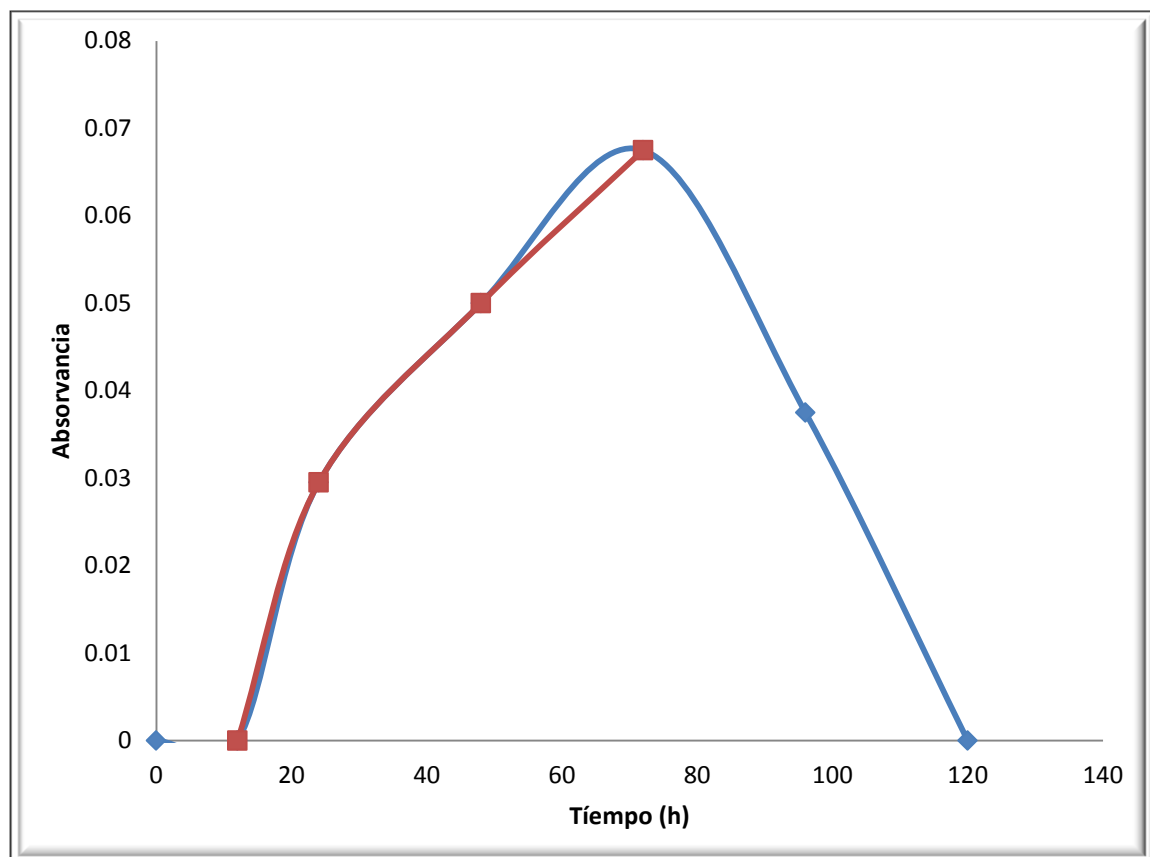


Figura 45. Curva de crecimiento de la cepa VC 2506-3 en medio de tioglicolato de sodio a 40° C.

Se puede observar que el microorganismo tardó 12 horas en adaptarse a los nutrientes del medio, sin olvidar que no existe oxígeno para su crecimiento, por lo tanto en las primeras 12 horas entra en una fase de latencia y el crecimiento exponencial se registra de las 12 horas hasta las 72 horas de fermentación. Posteriormente se observa un descenso de la curva, esto ocurre después de las 72 h presentándose una fase de muerte. La velocidad específica de crecimiento fue 0.001 DO/h.

Varela (2002), menciona que las células se dividen a una velocidad constante determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio, por lo tanto existe un marcado aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial, el número de bacterias viables disminuye, ocasionado por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de desechos tóxicos lo cual la tasa de muerte se incrementa.

En la figura 46 se puede observar el crecimiento de la cepa aislada VC 2506-3 en el medio líquido específico; en la cual se puede observar una fase de adaptación o latencia de 12 horas, posteriormente la cual comienza la fase de crecimiento exponencial o logarítmica que dura hasta las 144 horas; durante esta fase se determinó una velocidad específica de crecimiento de 0.006 DO/h. Después 144 horas de cultivo se detectó una disminución drástica en la lectura de absorbancia.

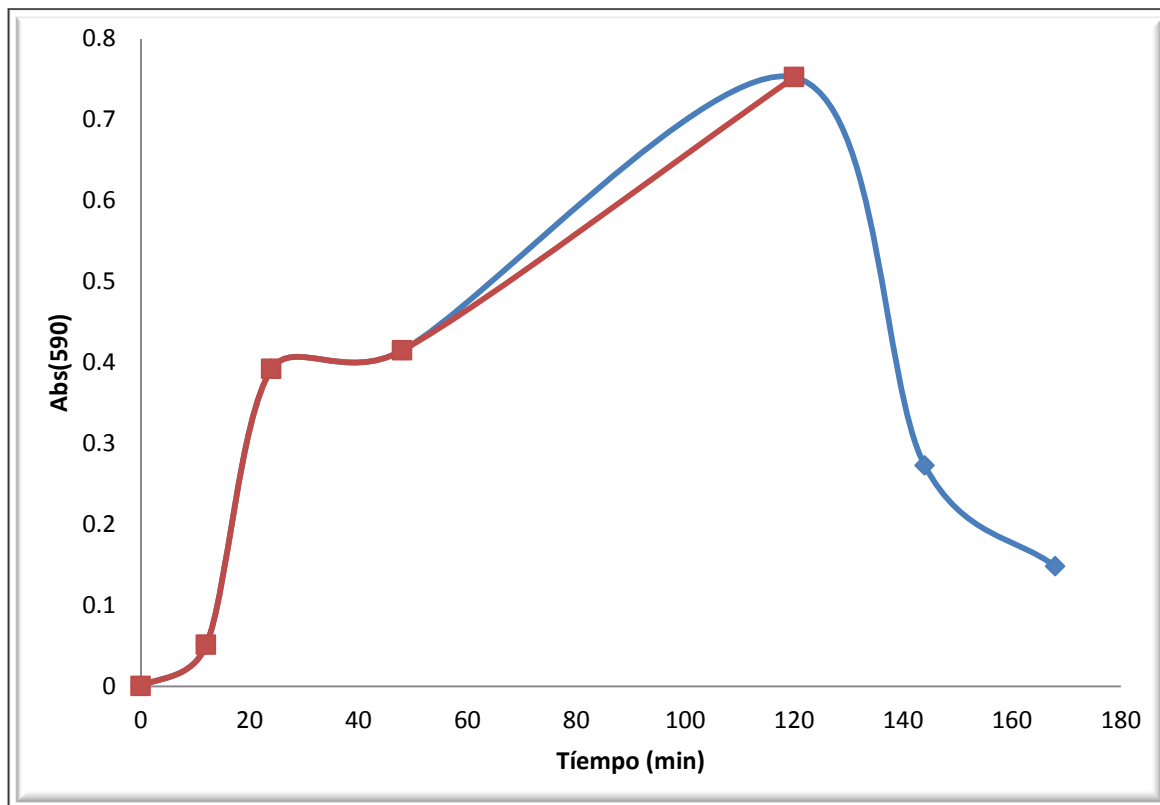


Figura 46. Curva de crecimiento en medio específico de la cepa VC 2506-3 empleando como fuente de carbono caseína.

Determinación y Cuantificación de la Actividad Proteasa Mediante Técnicas Espectrofotométricas. En la figura 47 se aprecia que la mayor actividad enzimática se presentó a las 168 h de reacción con una actividad de 0.043U, la actividad enzimática es similar a las 120 h de fermentación pero este presenta la máxima actividad a los 15 min de reacción con un valor de 0.578 U, en la curva se observó que en todos los tiempos después de los 60 min ya no hubo crecimiento lo cual nos indica que hasta este punto llega el ciclo de vida del microorganismo.

Las enzimas proteolíticas se localizan periplasmáticamente, asociadas a la membrana celular, excepto en *Butyrivibrio fibrisolvens* que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace y Cotta, 1988). Para degradar la proteína insoluble, las bacterias deben adherirse al sustrato, por lo que tendrán rápido acceso a los productos de degradación (Owens y Zinn, 1988).

En datos de literatura se menciona con mayor frecuencia a la bacteria proteolítica *Prevotella ruminicola*, como la más abundante en todo tipo de dietas, la que tiene varias actividades proteolíticas, y que puede incorporar péptidos de un determinado tamaño directamente a su síntesis proteica, es incapaz de utilizar aminoácidos libres (Cotta y Hespell, 1986).

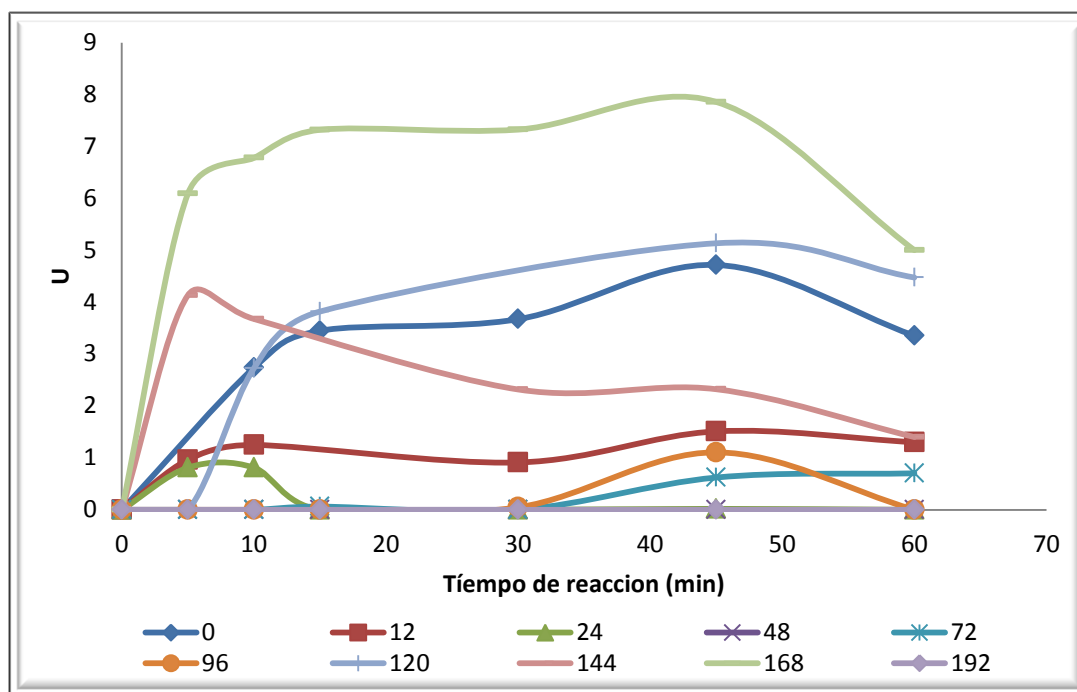
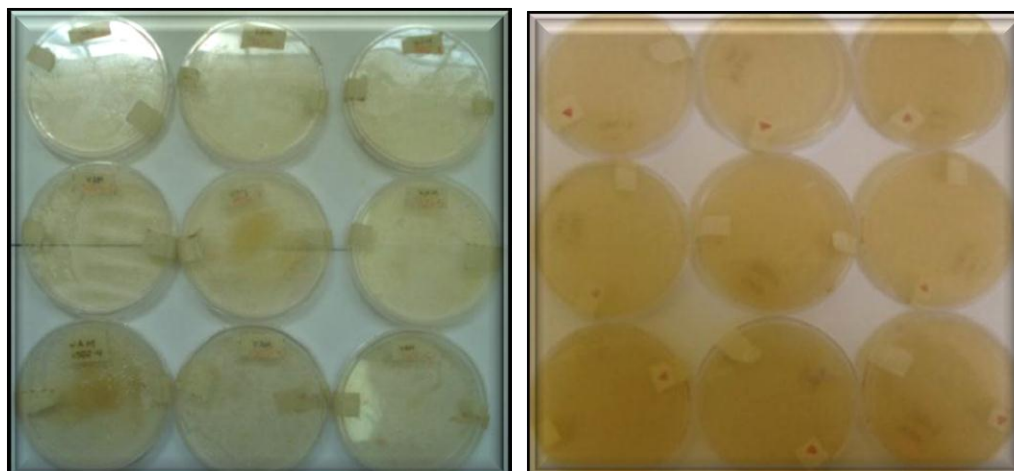


Figura 47. Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de cepa 2506-3.

Producción de la Enzima Quitosanasa. En la Figura 48 se muestra el crecimiento obtenido empleando el medio sólido 1 y 2 en los cuales no se observa crecimiento después de 144 h de incubación; por lo tanto, ninguna de las nueve cepas tiene la capacidad de emplear al oligosacáridos de quitosán como fuente de carbono y producir la enzima quitosanasa, por lo que se sugiere se realice una inducción de la enzima, ya que reportes en la literatura mencionas que los microorganismo ruminales son capaces de producir quitinasas.



A)

B)

Figura 48. Fotografía de cajas empleando quitosan como fuente de carbono con A) Medio Sólido sin buffer y B) Medio sólido con Buffer (AAANA 50 mM).

Producción de la Enzima Pectinasa. En la Figura 49 no se observa un crecimiento tras 120 h de incubación, por lo que se sugiere que los microorganismos seleccionados no tienen la capacidad de hidrolizar la pectina; o bien, es necesario modificar las condiciones del medio de cultivo específico probado en esta etapa y realizar una inducción de la enzima pectinasa.



Figura 49. Fotografía de cajas con medio sólido y pectina como única fuente de carbono

Producción de la Enzima Xilanasa. En el tratamiento 2 se produjo la enzima xilanasa, pero antes, para poder elegir la cepa se tuvo que realizar unas pruebas para ver que cepa era la que producía la enzima xilanasa, pero como no se encontró considerable producción, se optó por escoger la que tenía más alta entre todas las probadas en el tratamiento ya mencionado. En la Figura 50 se muestran las cajas con medio sólido específico empleando como única fuente de carbono la xilosa donde la cepa VAM 1502-4 fue la única que presentó un crecimiento después de 35 días de haberse incubado en placa y posteriormente se pasó a tubo.

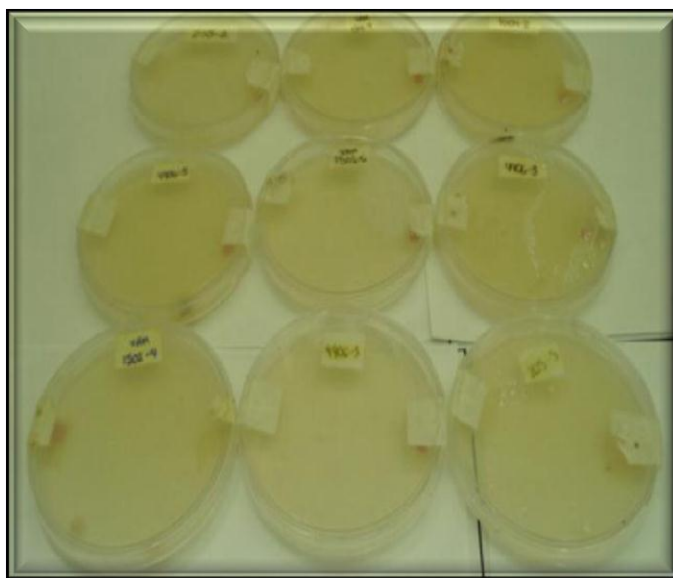


Figura 50. Fotografía de cajas con medio sólido y xilosa.

Inducción de la Actividad Xilanasa en Medio Líquido Específico. Se utilizó la cepa pura VAM 1502-4 para la inducción en medio líquido inductor 1 y 2.

En el medio líquido inductor 1, se presentó poco crecimiento celular, por lo que fue una característica determinante para trabajar con el medio inductor 2.

En la Figura 51 se observa que en el medio líquido inductor 2 se formó un botón (biomasa) por lo que se dedujo la cepa bacteriana VAM 1502-4 presentaba la capacidad para producir la enzima xilanasa ya que hidrolizó a la

xilosa empleándola como única fuente de carbono e incorporándola a su metabolismo celular.



Figura 51: Fotografía de medio líquido inductor 2.

Curva de Crecimiento en Medio Líquido de Tioglicolato de Sodio. En la Figura 52 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en tioglicolato de sodio; el cual es un medio que se utiliza para determinar el efecto del oxígeno sobre el crecimiento microbiano, puede observarse que a las 12 horas el microorganismo empieza con su fase exponencial hasta las 48 horas, lo cual representa según Varela (2002), que las células se dividan a una velocidad constante determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio, por lo tanto existe un marcado aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial.

Es decir hay un crecimiento constante de las bacterias, ya que abundan los nutrientes y el microorganismo es capaz de completar el ciclo celular incrementando su número de manera exponencial (2^n), presentando una velocidad específica de crecimiento de 0.0158 DO/h.

Durante esta fase los microorganismos crecen y se multiplican a una velocidad exponencial, gracias al proceso de fisión binaria, ya que en esta etapa del cultivo celular existe abundancia de nutrientes, por lo que los microorganismos son capaces de orientar sus procesos metabólicos

principalmente a la multiplicación y crecimiento celular. Su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas durante esta fase: por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, 1996).

En la curva de crecimiento (Figura 52) se puede observar que el microorganismo tardó 12 horas en adaptarse a los nutrientes del medio, sin olvidar que no existe oxígeno para su crecimiento, por lo tanto en las primeras 12 horas entra en una fase de latencia y el crecimiento exponencial se da después de las 12 horas de fermentación.

Posteriormente se observa un descenso de la curva, lo que indica según Varela (2002), que el número de bacterias viables disminuye, ocasionado por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de desechos tóxicos lo cual la tasa de muerte se incrementa; esto ocurre después de las 48 horas, presentándose una fase denominada fase de muerte y ocurre a las 108 hrs de fermentación

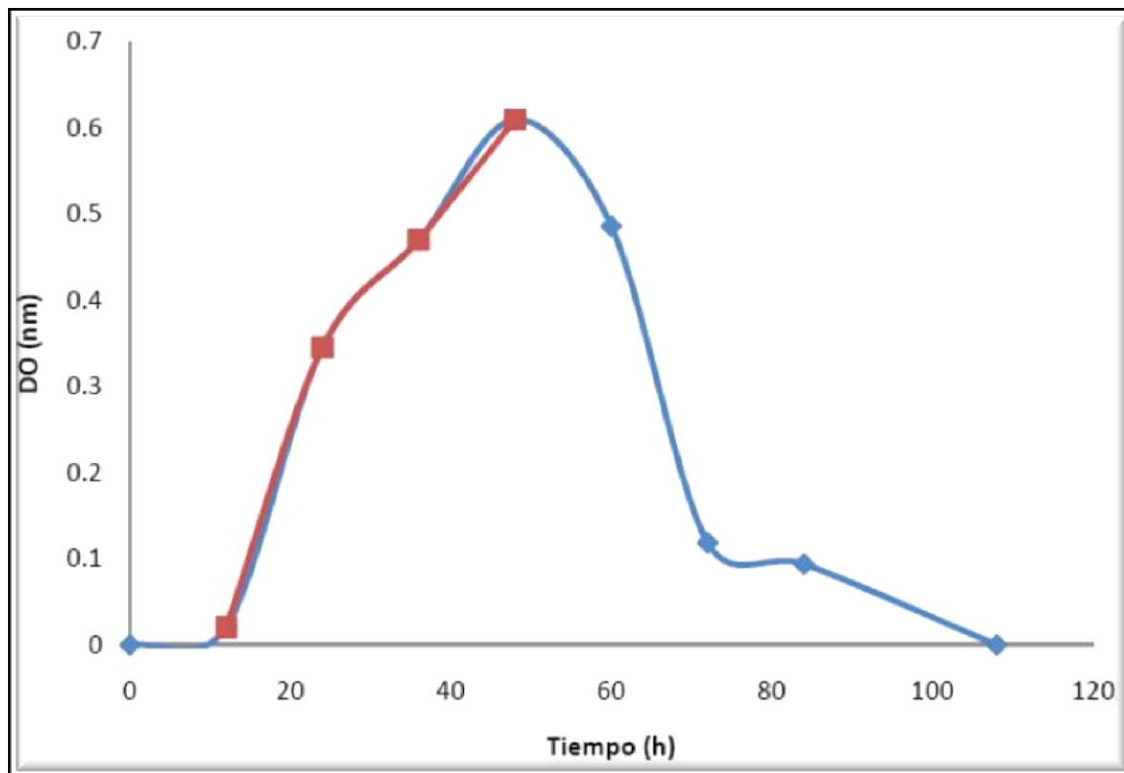


Figura 52: Curva de crecimiento de la cepa VAM 1502-4 en medio de tioglicolato de sodio a 40°C.

Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico 2. Se diseñó un medio específico para la producción de la enzima xilanasa, empleando como única fuente de carbono la xilosa. En la Figura 53 se muestra el crecimiento de la cepa aislada VAM 1502-4 en el medio líquido específico; en la cual se puede observar una fase de adaptación o latencia de 12 horas, posterior a la cual comienza la fase de crecimiento exponencial o logarítmico que dura hasta las 60 horas; durante esta fase se determinó una velocidad específica de crecimiento de 0.0008DO/h. Después de 60 horas de cultivo se detecta una disminución drástica en la lectura de absorbancia, para posteriormente estabilizarse permitiendo decir que se trata de una fase estacionaria donde el crecimiento microbiano desacelera debido al agotamiento de nutrientes y acumulación de residuos tóxicos; esta estabilización comienza a decrecer a las 132 horas, lo que podría significar el comienzo de la fase celular; sin embargo, es necesario seguir la cinética por un periodo de tiempo más largo para poder

definirlo ya que no se siguió después de las 156 horas de incubación. Es importante mencionar que la primera parte del crecimiento que se presenta es debido al uso de la glucosa como fuente de carbono, posteriormente disminuye y luego cuando el microorganismo se adapta toma la segunda fuente de carbono, que es la xilosa, para poder meter a su metabolismo y realizar los pasos necesarios para su proceso normal pero ya con una fuente de carbono diferente.

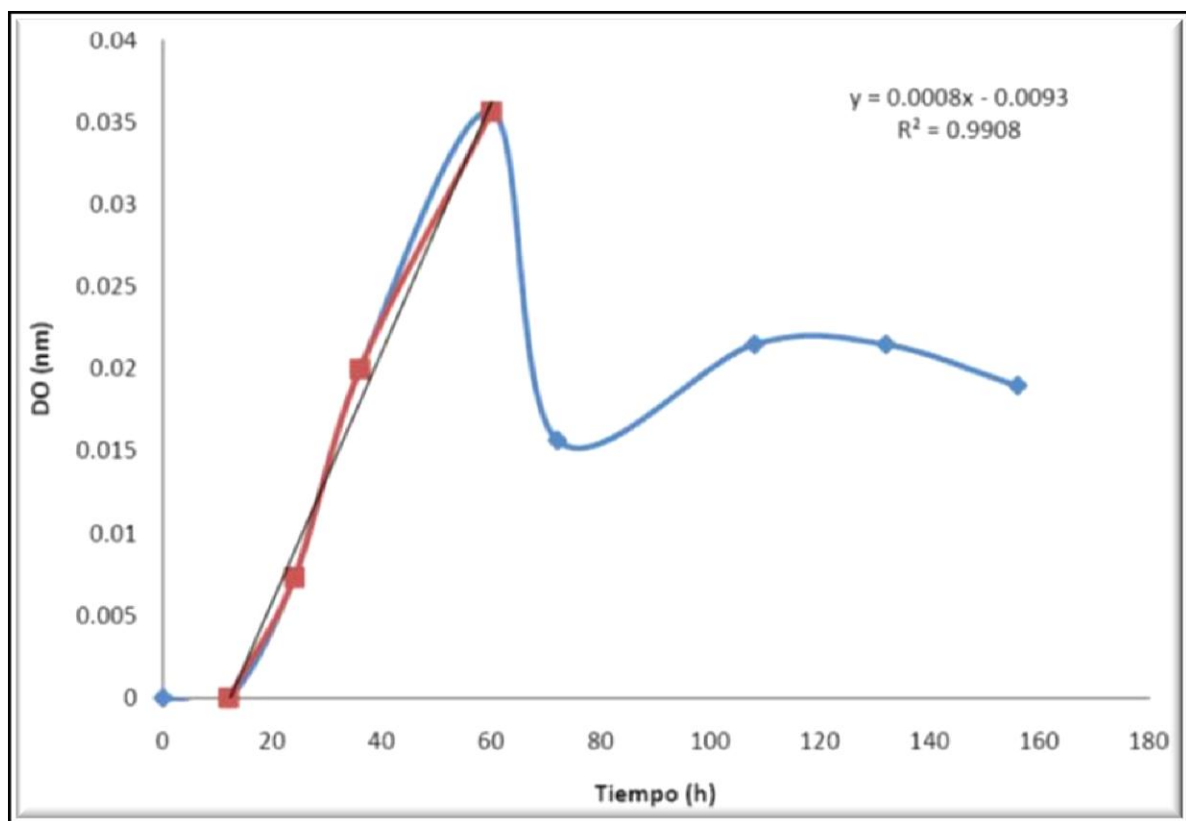


Figura 53: Curva de crecimiento de la cepa 1502-4 en medio líquido específico con xilosa incubados a 40°C.

Determinación de Proteína Extracelular por el Método de Biuret. Las enzimas xilanasas son enzimas que hidrolizan, que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos β 1-4, presentes en los polisacáridos (Gallardo R. 2007) como la xilosa.

Proteína extracelular se define como la cantidad de enzima xilanasa en mg/mL. En la figura 54, se puede observar que la mayor cantidad de enzima xilanasa producida es de 68.2723 mg/mL en un tiempo de fermentación de 60 minutos.

La literatura reporta que dentro de las bacterias productores de xilanasas son: *Cellulomonas avigenea* (Cazemier, et al., 1999), *Bacillus subtilis* (Gallardo R. 2007), *Brevibacillus brevis* y *Geobacillus pallidus* (Quintero, 2007).

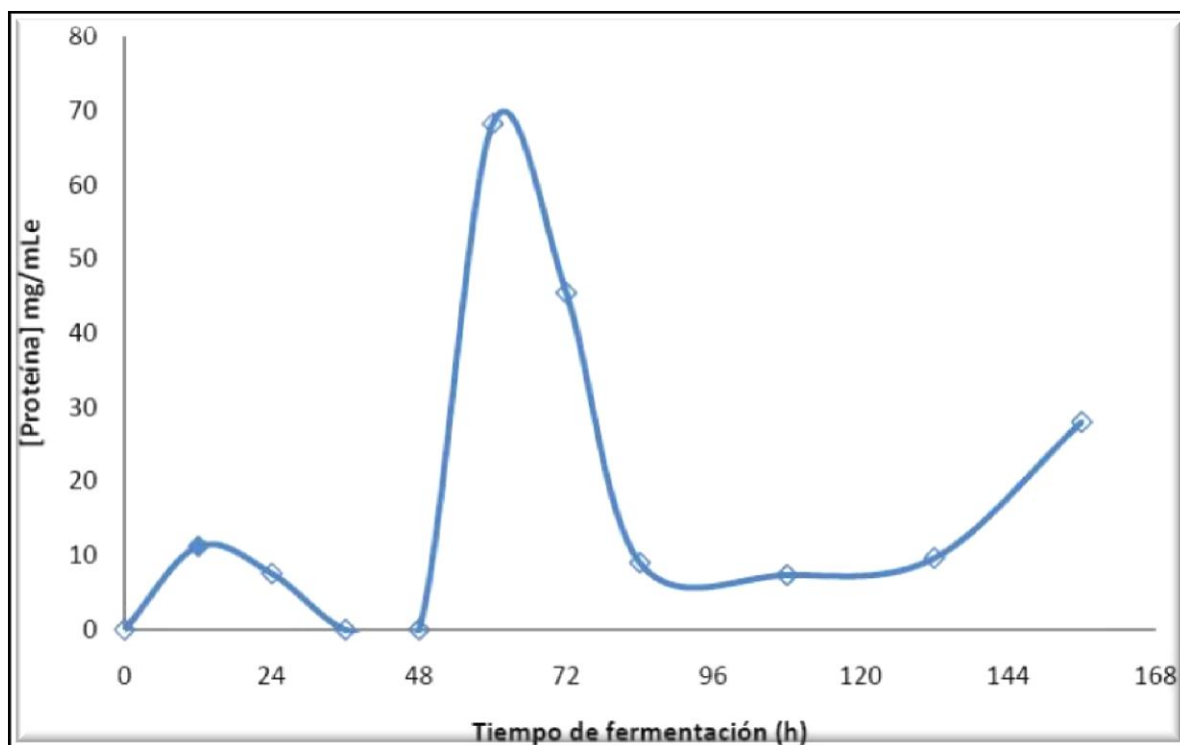


Figura 54. Determinación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa VAM 1502-4

Determinación de Actividad Enzimática Mediante la Técnica de Azúcares Reductores (Somogyi-Nelson). Badui (2006), explica el funcionamiento de una enzima como catalizador, siendo uno de los más aceptados el desarrollo de Michaelis y Menten en 1913, este modelo aplica a esta investigación considerando, que cuando el reactivo o sustrato (S); en este caso la xilosa, está en contacto con la enzima (E); xilanasa, rápidamente se combinan para formar

un complejo enzima sustrato (ES). Posteriormente, de este complejo se libera tanto el producto; moléculas de xilooligosacaridos (Gallardo, 2007), así como la enzima; xilanasas, dejándola disponible para combinarse con una nueva molécula de sustrato.

Gallardo. R. (2007), señala que las enzimas xilanasas son biocatalizadores por lo tanto incrementan la velocidad de las reacciones químicas al reducir la energía de activación necesaria para transformar los sustratos en productos.

Gong *et al.* (1979), describen que la inducción para producir xilanasas se lleva a cabo por el sustrato natural xilosa, mediante un nivel basal; el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas las cuales son las que inician la hidrólisis del sustrato xilosa y producen pequeños oligosacáridos que entran en la célula siendo los verdaderos inductores que inician la transcripción de los genes.

En la Figura 55 se observa la mayor cantidad de enzima xilanasas que actúa sobre el sustrato xilosa (U) hidrolizándolo, en un tiempo de fermentación de 60 horas de fermentación y a los 45 minutos de haber transcurrido la reacción donde se produce una cantidad de 2.1194 U.

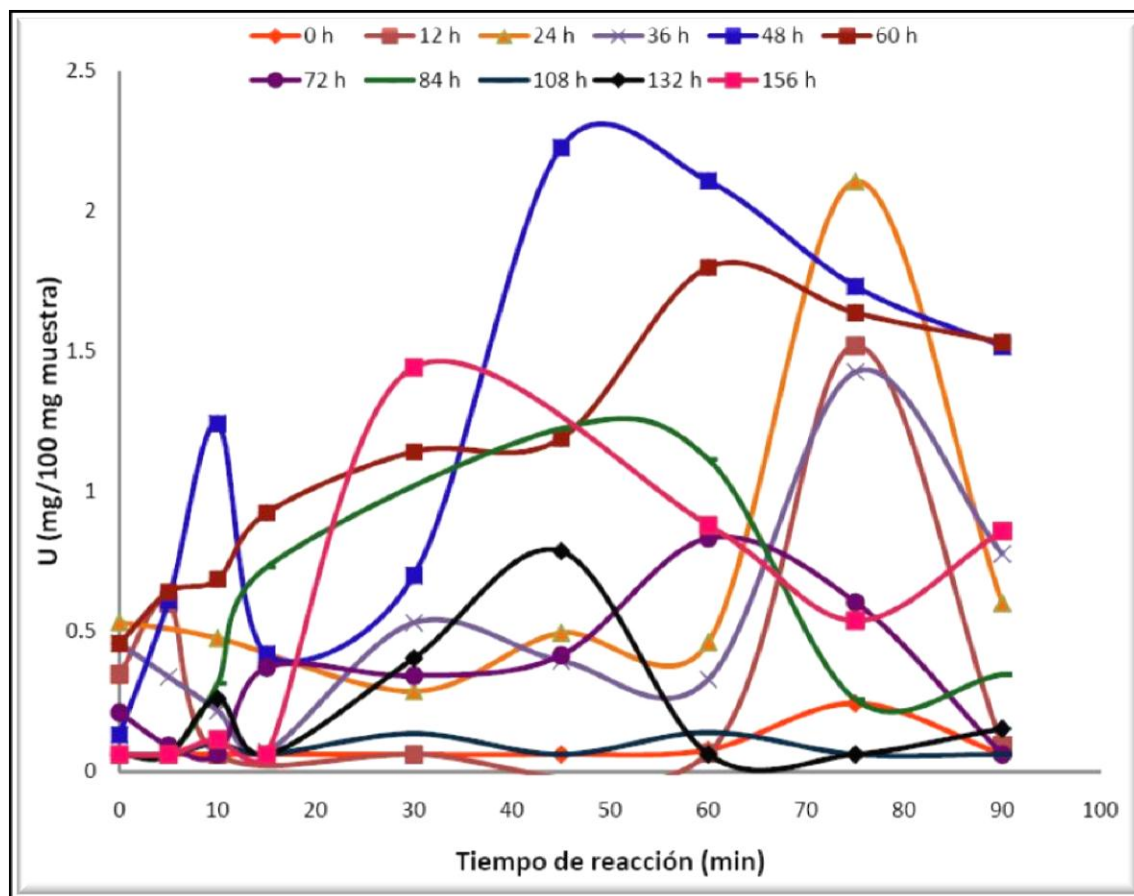


Figura 55. Determinación de la actividad xilanasa de la cepa VAM 1502-4 en medio específico a 40°C empleando xilosa al 2%.

Producción de la enzima celulasa. Las bacterias enfrentan constantes condiciones que limitan o impiden su crecimiento. La habilidad para colonizar un ambiente requiere de la capacidad del microorganismo para alternar periodos de rápida división celular y de crecimiento nulo. La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases principales: a) fase de latencia o adaptación (lag), 2) fase de desarrollo logarítmica o exponencial (log), 3) fase de transición o estacionaria, y 4) fase declinación o muerte celular (Pérez-Del Ángel, 2009).

Con la finalidad de observar el comportamiento cinético de crecimiento de los microorganismos estudiados, se procedió a determinar las curvas de crecimiento empleando el medio adecuado y siguiendo el procedimiento

descrito en la metodología. Únicamente se seleccionó una cepa para el estudio enzimático donde el criterio de selección fue: crecimiento homogéneo, menor tiempo de crecimiento, no productora de gas ni de pigmentos. La cepa seleccionada fue la # 2 en el tratamiento 3.

Determinación de la Curva de Crecimiento Microbiano en Medio Líquido (TGN_a). En la Figura 56 se muestra el crecimiento típico de la cepa aislada en tioglicolato de sodio, observándose que antes de las 24 horas el microorganismo empieza con su fase exponencial lo cual representa un crecimiento adecuado, ya que abundan los nutrientes y el microorganismo es capaz de completar el ciclo celular incrementando su número de manera exponencial (2^n), presentando una velocidad específica de crecimiento de 0.0253 DO/h.

Durante esta fase los microorganismos crecen y se multiplican a una velocidad exponencial, gracias al proceso de fisión binaria, ya que en esta etapa del cultivo celular existe abundancia de nutrientes, por lo que los microorganismos son capaces de orientar sus procesos metabólicos principalmente a la multiplicación y crecimiento celular.

Su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas durante esta fase: por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, 1996).

En la curva de crecimiento (Figura 56), podemos observar que el microorganismo no tardó en adaptarse a los nutrientes del medio, por lo que no se observa una fase de adaptación, y el crecimiento exponencial se da de inmediato (en las primeras 12 h de fermentación). Posteriormente se observa una disminución en la turbidez, lo que indica un deterioro ambiental ocasionado por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de desechos tóxicos que conllevan a la disminución del número de células viables, característica

distintiva de la fase de muerte celular. La muerte de una población microbiana, como su crecimiento durante la fase exponencial, es usualmente logarítmica (esto es, una proporción constante de células muere cada hora). Este patrón se mantiene incluso cuando el número total de células permanece constante debido a que las células simplemente fallan en lisarse después de morir (Bergey, 2005).

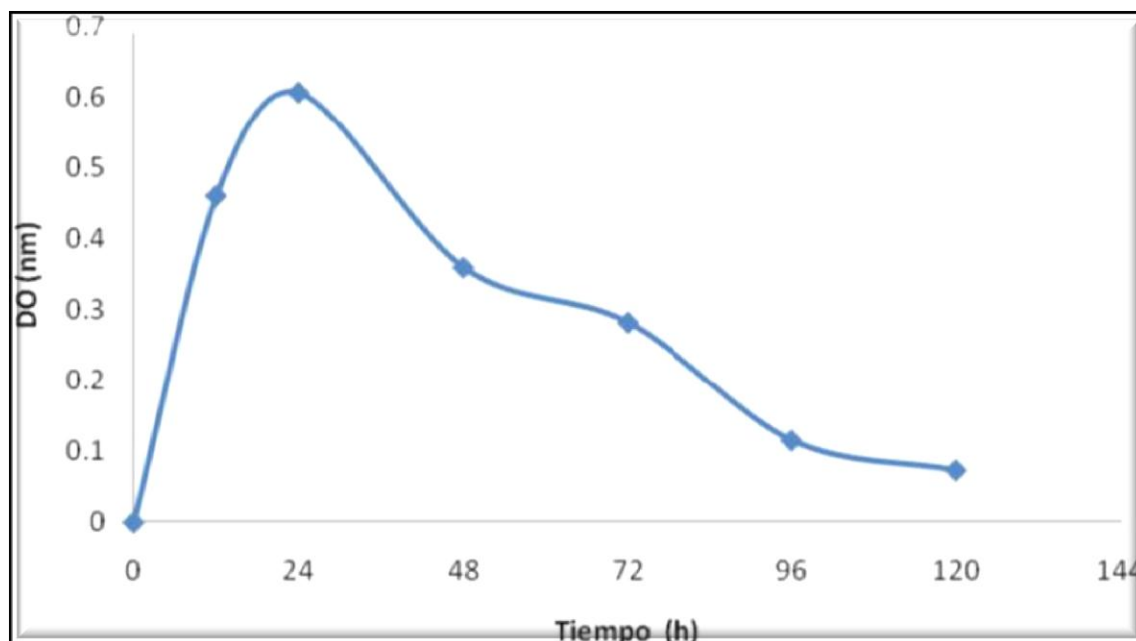


Figura 56. Curva de crecimiento de la cepa # 2 aislada en TGNa a 40° C

Curva de Crecimiento en Medio Líquido Específico para la Producción de una Celulasa. Se diseñó un medio específico para la producción de la enzima celulasa, empleando como única fuente de carbono carboximetil celulosa. En la Figura 57 se muestra el crecimiento de la cepa aislada en el medio líquido específico; en la cual se puede observar que alcanza su fase exponencial en las primeras horas de fermentación (24 h) con una $\mu = 0.0427\text{DO/h}$; su fase estacionaria que comienza a apreciarse después de las 24 h y finalmente se observa un descenso gradual durante el resto del estudio cinético.

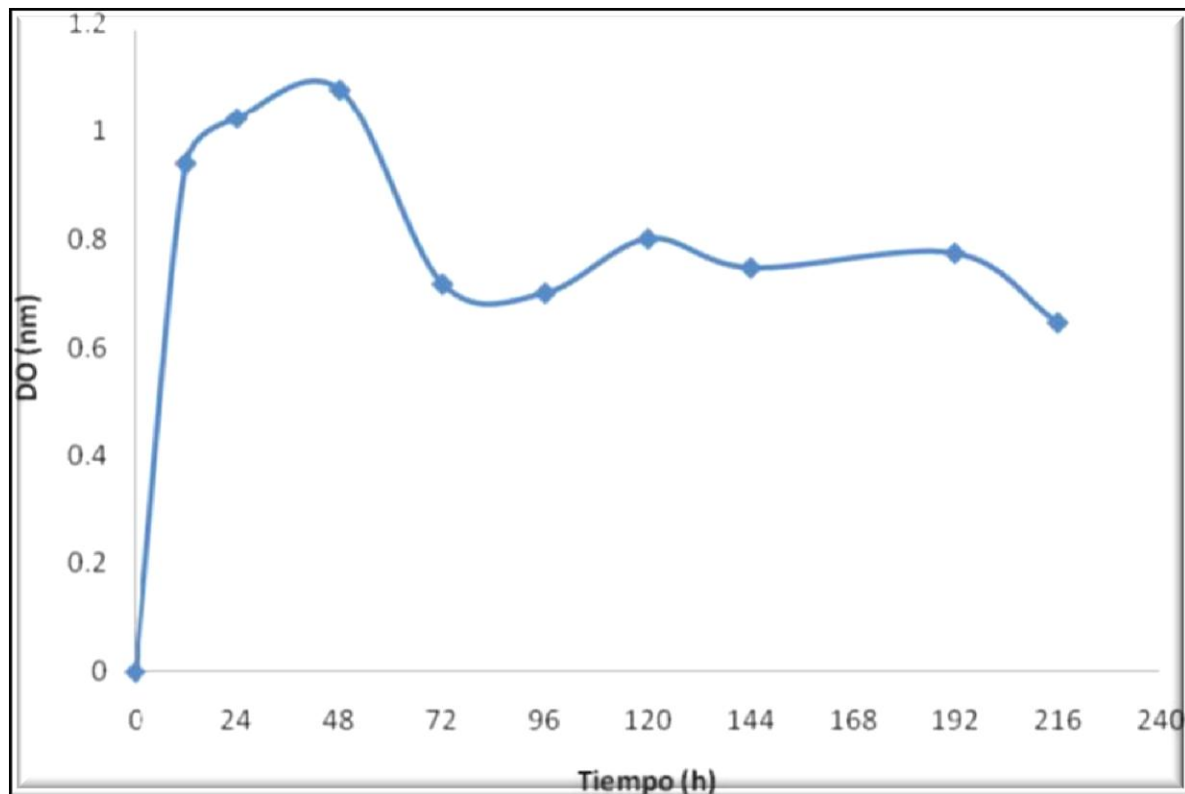


Figura 57. Curva de crecimiento de la cepa # 2 en medio líquido específico a 40° C.

Determinación de Proteína Extracelular por el Método de Biuret. Las bacterias son responsables de hidrolizar o degradar las macromoléculas que componen los sustratos presentes en los alimentos, como celulosa, hemicelulosa, almidón, grasas y aceites, y pectina.

El principal aporte de los microorganismos en el rumen son las celulasas microbianas. La celulosa es la más importante fuente de carbono y energía en la dieta del rumiante, pero el animal por sí mismo no produce las enzimas necesarias para digerir la celulosa. Como los microorganismos usan celulosa y otros carbohidratos presentes en las plantas como sus propias fuentes de energía y carbono, ellos aportan gran cantidad de productos ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales son usados por el animal como fuente de carbono y energía (Grudsky y Arias 1983); por lo tanto, al microorganismo en estudio se le determinó proteína extracelular, mediante turbidimetría, ya que cuando un haz

de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz se dispersa, parte se refleja y parte se absorbe. Esta dispersión puede ser medida por turbidimetría ya que proporcionará un resultado en base a la concentración de proteína concreta, ya que se compara la cantidad de la luz dispersada, o la tasa de aumento de la dispersión, con los valores de estándares proteicos conocidos (Gorina *et al.*, 1980).

La Figura 58 muestra el comportamiento de la máxima producción de la enzima celulasa (extracto enzimático), donde se puede apreciar que la mayor concentración de proteína extracelular se obtiene a las 24 h de fermentación (65.74 g/L) transcurridos 15 minutos de reacción, sin embargo, la cantidad de proteína disminuye considerablemente después de 30 minutos de reacción. A las 72 h de fermentación se obtienen concentraciones de proteína extracelular de 60.61 g/L y se mantienen valores similares hasta los 45 minutos de reacción. A las 96 h de fermentación se observa que a los 45 min de reacción se incrementa nuevamente la concentración de proteína, la cual puede ser debido a que los microorganismos en condiciones de estrés (medios de cultivo específicos) producen proteasas que son liberadas al medio de cultivo provocando diferentes grados de proteólisis (Dominguez, 2002). Además es necesario conocer los mecanismos de acción enzimática de hidrólisis sobre el sustrato.

Reportes en la literatura mencionan que la microflora ruminal no se adapta rápidamente a la utilización de celulosa, por lo que la producción de la enzima se ve limitada (Weimer *et al.*, 1999).

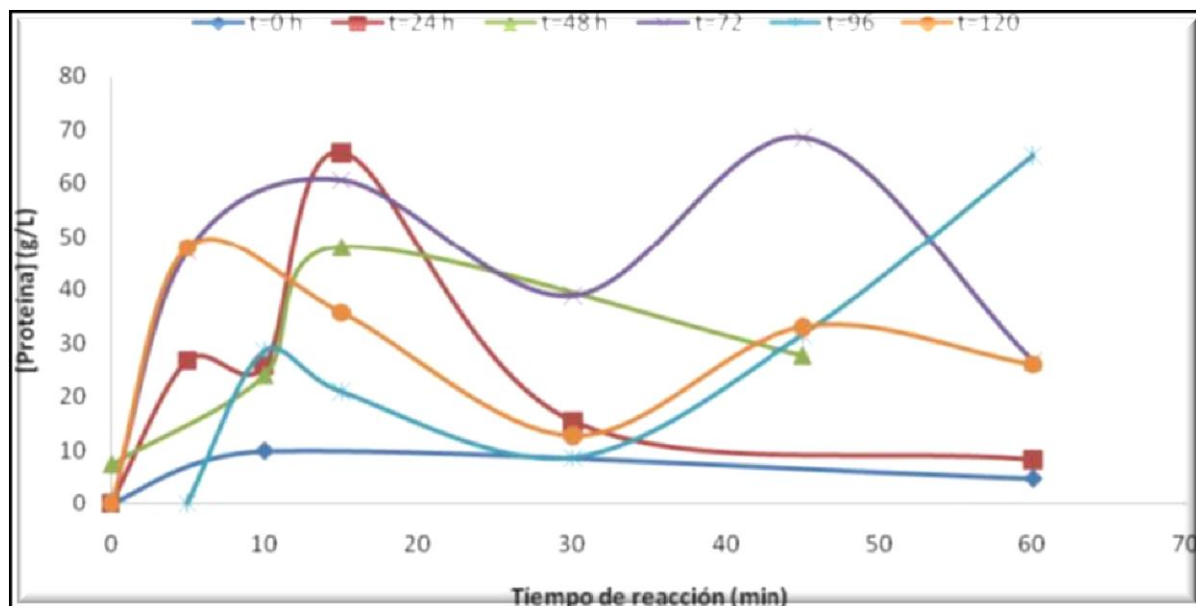


Figura 58. Cuantificación de proteína extracelular por el método de Biuret de la cepa # 2

Determinación de Actividad Celulasa por Somogyi-Nelson. La Figura 59 muestra los resultados obtenidos de actividad celulasa, donde se observa que a las 24 h de fermentación se obtiene la mayor actividad enzimática con valores de 858 U; sin embargo, durante los tiempos posteriores los valores de actividad son muy bajos (0.10 U) comparados con el tiempo de 24 con velocidades iniciales (V_0) de 35.4 y 0.16 mg/mL respectivamente; esto puede ser debido a que el microorganismo presentó su máximo crecimiento a este mismo tiempo, lo que indica que el metabolismo se encuentra a su máxima expresión produciendo todas las enzimas necesarias para poder aprovechar el sustrato o fuente de carbono disponible. La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático; el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; endoglucanasa, que ataca al azar enlaces β -1, 4-glicosídicos de la cadena de celulosa; exoglucosanasa, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y β -glucosidasa, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Lucas *et al.*, 2008). Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región

cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucosidasa y exoglucosidasa (Beldman, 1988).

Reportes en la literatura mencionan que los microorganismos ruminales capaces de producir celulasas son: *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium lochheadii* y *Cillobacterium cellulosolvens* (Grudsky y Arias, 1983).

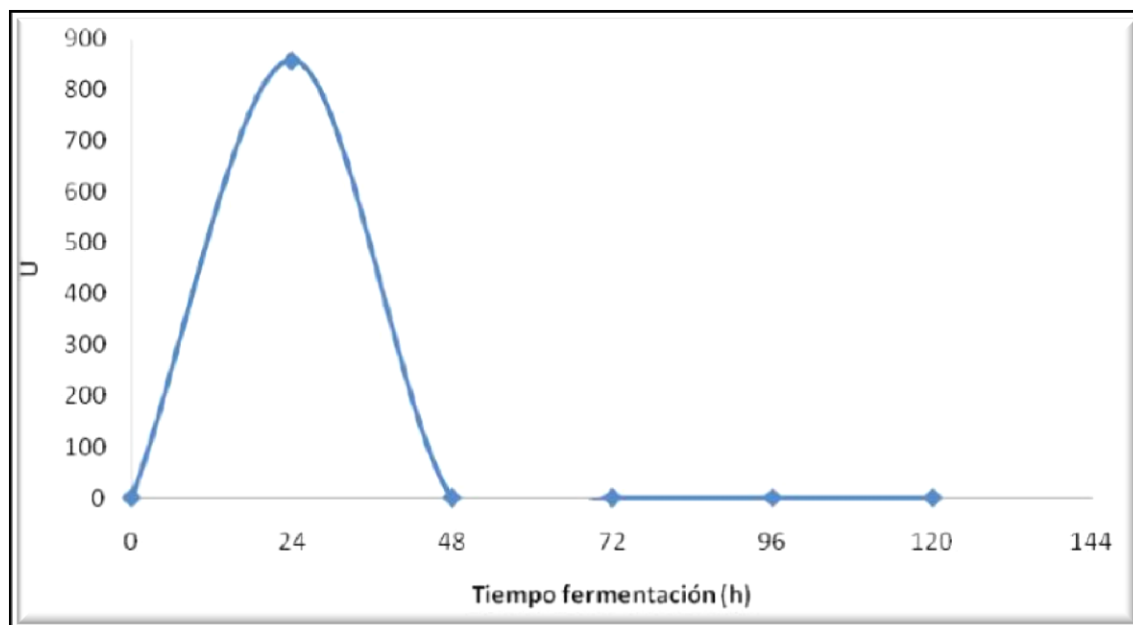


Figura 59. Cuantificación de la actividad enzimática de la cepa # 2.

Producción de la Enzima Proteasa, de la Cepa 652-2 VLI del Tratamiento 4.

En la Figura 60 se puede observar el comportamiento bacteriano presentando una fase de crecimiento logarítmico a las 24 horas con una velocidad específica de 0.0715 DO/h; durante esta fase, su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas: por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, 1996), y presentando una fase estacionaria después de las 24 horas, prolongándose hasta las 72 horas, como también se puede apreciar que hay un ligero descenso del número de bacterias

después de las 72 horas, probablemente esto sea el momento previo a la aparición de la fase de muerte celular, ya que esta todavía no se detecta en la curva, puesto que las lecturas se mantienen hasta las 144 h por falta de nutrientes o la posible acumulación de desechos tóxicos que conllevan la disminución de células viables. Este patrón se mantiene incluso cuando el número total de células simplemente disminuye por falta de nutrientes y después se mueren (Bergey, 2005).

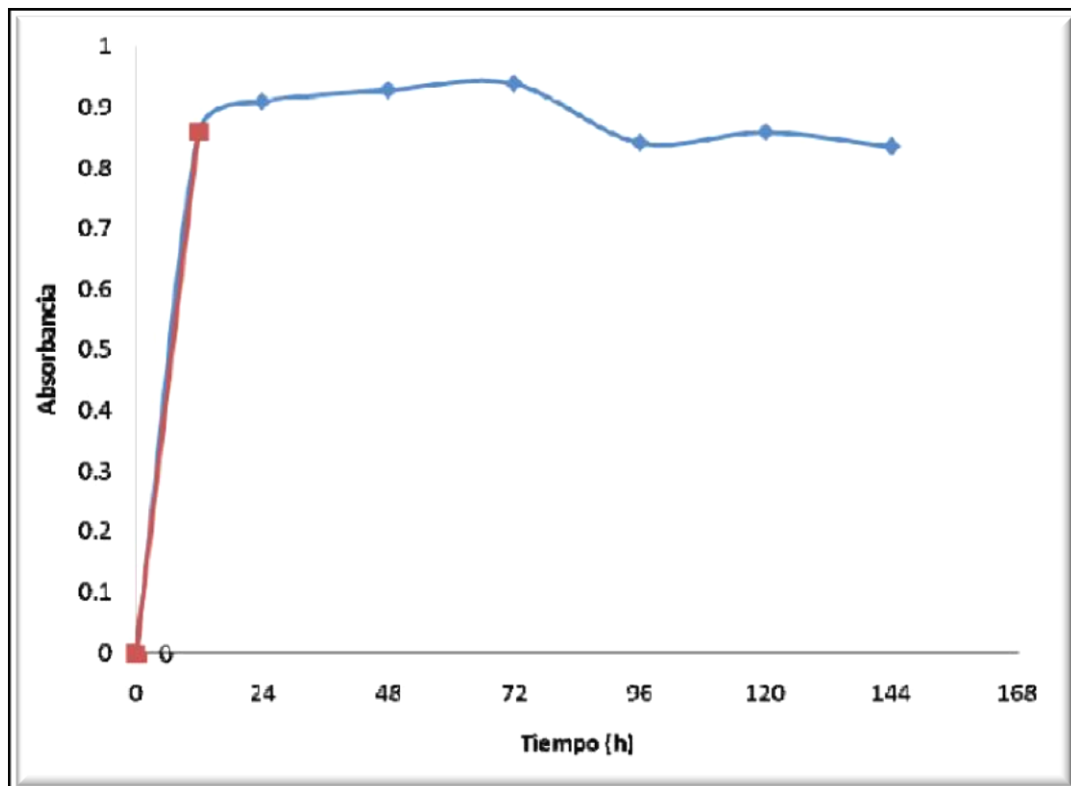


Figura 60. Curva de crecimiento de la cepa 2 de la VLI # 652 cultivada en tioglicolato de sodio.

Se preparó un medio específico para inducir al microorganismo a la producción de la enzima proteasa empleando como única fuente de carbono leche descremada. En la Figura 61 se puede observar que a las 24 horas el microorganismo alcanza su máximo crecimiento con una velocidad específica de $\mu=0.0692$ DO/h, pero después de ese tiempo el crecimiento microbiano tiende a disminuir, el comportamiento del microorganismo por el descenso,

puede ser que entre en un momento de estrés porque es obligado a adaptarse a un medio específico para que este nos produzca la enzima deseada, pero después de adaptarse al medio este empieza a reproducirse o incrementar otra vez el número de células microbianas, posterior a producir la enzima de manera natural.

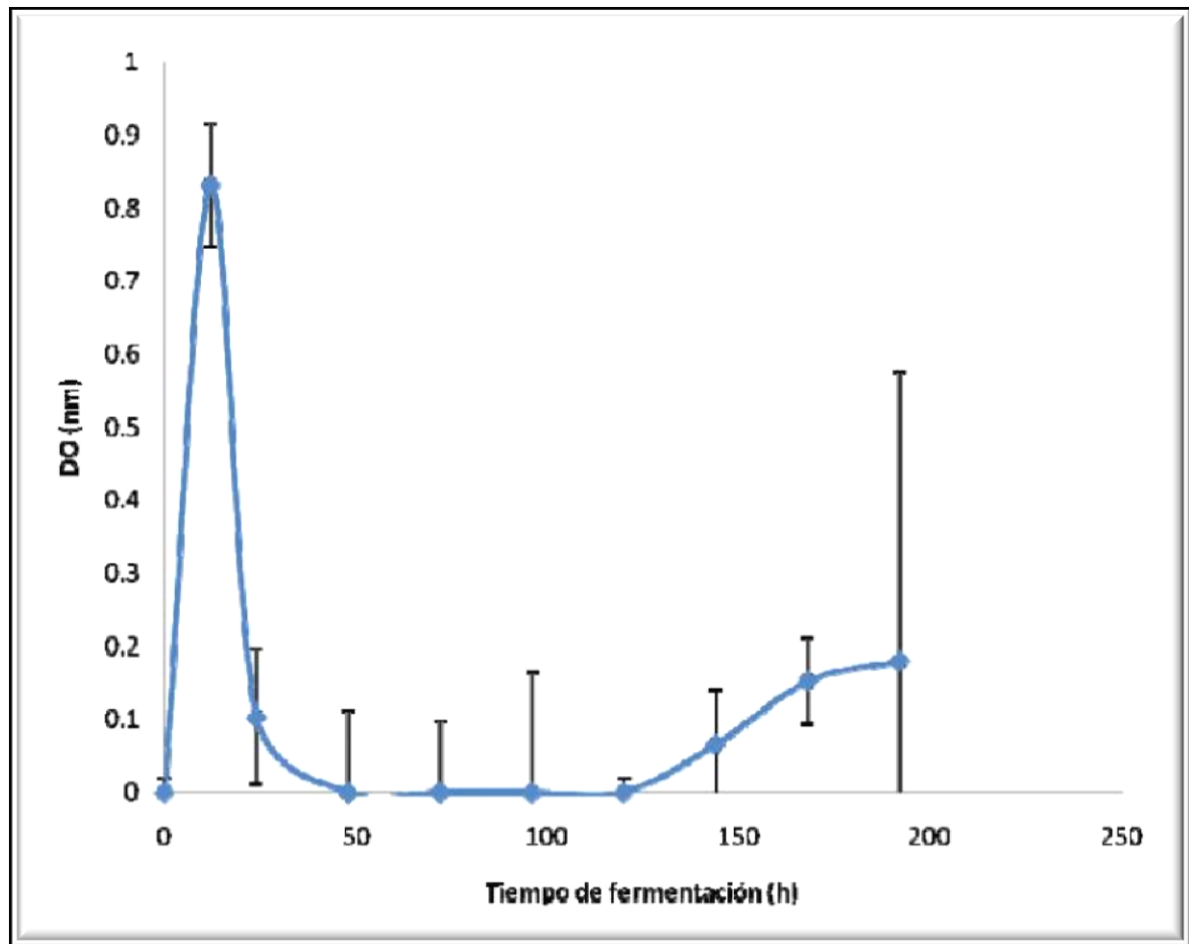


Figura 61. Curva de crecimiento en medio específico de la cepa 2 de la VLI #652 empleando como fuente de carbono caseína

Determinación y Cuantificación de la Actividad Proteasa Mediante Técnicas Espectrofotométricas. Las bacterias son responsables de hidrolizar o degradar las macromoléculas que componen los sustratos presentes en los alimentos, como celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos (Yakohamo y Johnson, 1988). Son el grupo de

microorganismos más abundantes y representan más de la mitad de la biomasa ruminal y una mayor proporción de la actividad metabólica ruminal, que esta inversamente relacionado con el tamaño del microorganismo. (Orskov, 1992). Aproximadamente el 75 % de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimentos y son responsables en mayor parte de la degradación ruminal, así mismo hay bacterias que subsisten a partir de nutrientes solubles del líquido ruminal y bacterias anaeróbicas facultativas que están asociadas al epitelio ruminal están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir activamente en la degradación del sustrato. También tienen gran actividad proteasa y ureasa (Cheng y Costerton, 1980).

Empleando alícuotas de tiempo cero de fermentación se tiene casi nula concentración de proteína extracelular lo cual es debido a que el microorganismo se encuentra en fase de adaptación al medio y aún no expresa su metabolismo, en esta etapa se presenta una velocidad de formación de producto de $V_0 = 0.002 \text{ mg/mL.h}$.

Al tiempo de fermentación 24 horas se puede apreciar que el microorganismo que tiende a reaccionar en 5 minutos de haber iniciado la reacción; sin embargo, la máxima actividad se presenta tras 30 minutos de haber iniciado la reacción con una V_0 de 0.0126 mg/mL.h . En la Figura 62 se puede apreciar que el máximo crecimiento celular se obtuvo a las 48 h de fermentación, por lo que el microorganismo se encuentra en su máxima expresión metabólica lo que indica la máxima capacidad de producción de enzima.

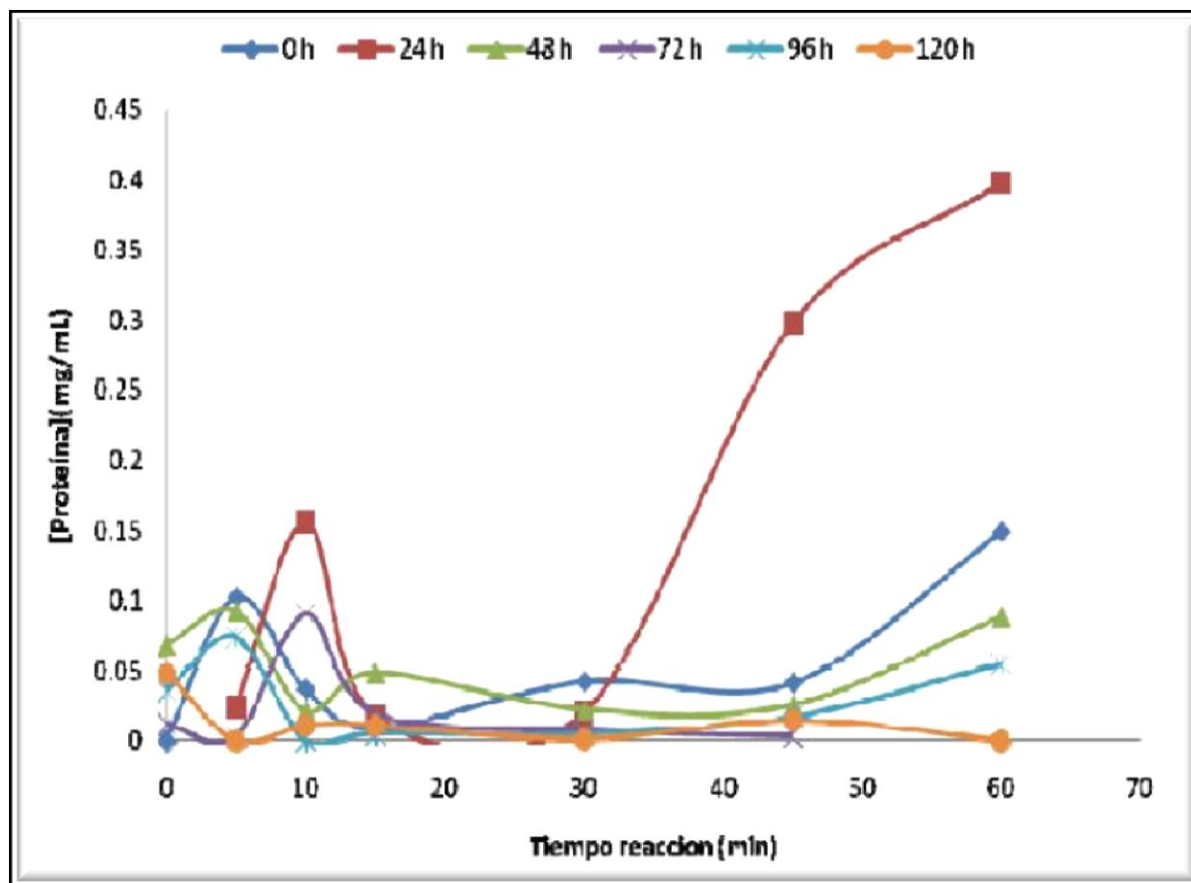


Figura 62. Concentración de proteína extracelular en mg/mL a diferentes tiempos de reacción cuantificada por el método de Biuret de la cepa 2 de la VLI #652

En el tiempo de fermentación de 48 hrs y al minuto 0 cero de reacción se puede ver que ya hay concentración de proteína extracelular por que la bacteria empieza a adaptarse al medio y a producir la proteasa, pero también hay una disminución de actividad a los 10 minutos hasta después de 30 min de reacción empieza a reaccionar otra vez teniendo una velocidad de formación de $V_o = 0.001 \text{ mg/mL.h}$

Tiempo de fermentación 72 hrs hay una mínima reacción al minuto 0, teniendo más concentración de proteína a los 10 min de reacción, pero después de 15 min se puede observar que tiene una mínima concentración de proteína con una velocidad de formación de $V_o = 0.009 \text{ mg/mL.h}$

Tiempo de fermentación 96 hrs se puede apreciar que hay reacción desde a los min 0 a 5 min de reacción después de 10 minutos hay una disminución de concentración de proteína extracelular hasta después de 30 minutos hay otra vez una reacción de enzima con una velocidad de formación $V_o = 0.0008$ mg/mL.h

Tiempo de fermentación 120 hrs, se puede apreciar que la concentración de proteína es muy poco, es a lo mejor porque la bacteria ha producido las proteínas necesarias en los tiempos anteriores y a este tiempo se termina, también se puede observar que los nutrientes del medio después de los 60 minutos tiende a disminuir la línea, lo cual indica que ya no hay producción de enzima, la velocidad de formación del producto es de $V_o = 0.0003$ mg/mL.h

Las enzimas proteolíticas se localizan periplasmáticamente, asociadas a la membrana celular, excepto en *Butyrivibrio fibrisolvens*, que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace y Cotta, 1988). Para degradar la proteína insoluble, las bacterias deben adherirse al sustrato, por lo que tendrán rápido acceso a los productos de degradación (Owens y Zinn, 1988).

En datos de literatura se menciona con mayor frecuencia a la bacteria proteolítica *Prevotella ruminicola*, como la más abundante en todo tipo de dietas, la que tiene varias actividades proteolíticas, y que puede incorporar péptidos de un determinado tamaño directamente a su síntesis proteica, es incapaz de utilizar aminoácidos libres (Cotta y Hespell, 1986).

Como se puede apreciar en la Figura 63 la mayor actividad enzimática se presenta a las 24 h de reacción con una actividad de 0.7469 U, formando una campana de Gausse, la actividad de enzima es similar a las 72 h de fermentación pero este presenta la máxima actividad a los 15 min de reacción con un valor de 0.5205 U, al tiempo de fermentación de 0 h la actividad se mantiene hasta los 45 min de reacción, después como se puede observar en la Figura 98, la línea tiende a elevarse lo que indica que después de este tiempo

la actividad enzimática aumenta, por lo que se recomienda realizar un monitoreo por más tiempo de reacción para seguir el curso de la reacción.

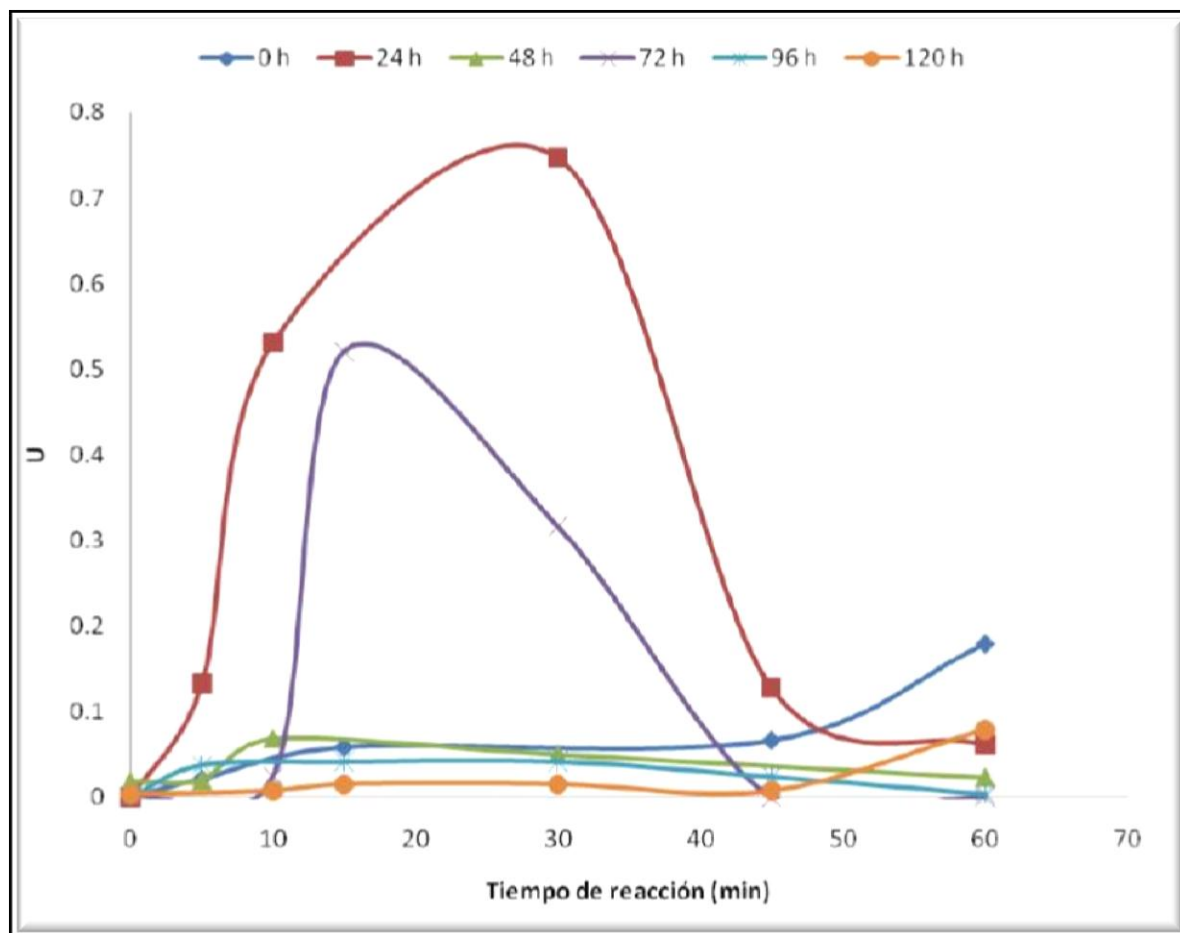


Figura 63. Actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación de la cepa 2 de VLI # 652

Como se mencionó anteriormente en la gráfica de la Figura 60, la mayor concentración de proteína expresada en mg/mL.h se obtuvo a las 24 h de fermentación obteniendo una velocidad inicial de $V_0 = 0.0126$ mg/mL.h (Cuadro 30) y con una actividad enzimática de 0.7469 U.

Cuadro 30: Velocidades de formación del producto

Tiempo de Fermentación	V_0 (mg/mL.h)
0	0.002
24	0.0126
48	0.001
72	0.009
96	0.0008
120	0.0003

Producción de la Enzima Fitasa. Se trabajó con las cepas mencionadas en el apartado de materiales y métodos para la extracción de esta enzima, las cuales no presentaron alguna actividad fitásica, por lo cual no se realizó alguna medición para esta enzima, pero también se podría probar las demás bacterias si presentan alguna actividad o inducir a que las bacterias produzcan dicha enzima.

Propuestas Biotecnológicas para Algunos Biotipos

La cepa 513-2 VML, se convierte en una muy viable propuesta biotecnológica, ya que los resultados en cuanto a la producción y actividad de la enzima celulasa, fue sobre los niveles reportados en la literatura, y eso considerando que fue con un medio de cultivo que contenía carboximetil celulosa, es decir, si se cuenta con un medio más disponible como la celulosa para este microorganismo, ayudaría a dar mejores resultados. Si se encuentran buenos resultados en pruebas con animales sería un gran avance para la biotecnología ruminal.

Así también se podría buscar actividad y producción de la enzima fitasa con los microorganismos trabajados en esta investigación, ya que esta enzima posee una gran importancia en la industria pecuaria para monogástricos, y con las bacterias probadas no se tuvo éxito, para lo que se recomienda buscar actividad con las demás bacterias o inducir a la producción de la fitasa.

La cepa 652-2 VLI (*Enterococcus faecium* strain HN-N42, Cuadro 28) y 2506-3 VC (*Enterococcus faecium* strain HN-N11, Cuadro 28), para la producción de proteasa y la VC 1502-4 para la enzima xilanasa, también son cepas que pudieran tener muy buenos resultados en varias industrias por los buenos resultados obtenidos, las cuales también podría ampliarse más el estudio con dichas bacterias, que podrían ayudar no sólo a la industria del sector agropecuario sino también a otras.

Enterococcus faecium CECT 4515 es uno de los microorganismos utilizados como aditivo prebiótico para animales de producción. Como componente habitual de la flora intestinal (mayor afinidad por el medio), goza de dos capacidades fundamentales para su efecto probiótico (Fernández *et al.*, 2002):

- Capacidad de fijarse en la pared intestinal.
- Alta velocidad de multiplicación, gracias a su afinidad por el medio.

Estas dos cualidades, le permiten una rápida colonización del tracto intestinal, y la formación junto a la flora láctica endógena de una barrera biológica (Vandelle *et al.*, 1990; Holzapfel *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000; Rolfe, 2000; Ouwehand *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2002), que sirve de defensa frente a enterobacterias patógenas. Se podría decir que su mecanismo de acción es la creación un medio hostil para los microorganismos patógenos (Fernández *et al.*, 2002).

Una vez que *E. faecium* CECT 4515 llega al intestino se producen los siguientes efectos, como resultado de su activación metabólica:

Alta producción de enzimas: Esta demostrado que *E. faecium* CECT 4515 produce durante su multiplicación una cantidad alta de amilasas y proteasas, cantidad suficiente para mejorar la digestibilidad de los nutrientes del pienso (Depto. I+D Norel&Nature, 2000). También produce disacaridasas y en concreto dos tipos: invertasa (encargada de la asimilación de sacarosa y rafinosa) y α -glucosidasa (encargada de la asimilación de la maltosa) (Depto. I+D

Norel&Nature, 2000). Este hecho es importante, ya que los disacáridos no hidrolizados pueden actuar como factores coadyuvantes en procesos diarreicos.

Estimula la inmunidad local: La estimulación del sistema inmunitario ha sido demostrada en varios trabajos, incrementando las IgA (inmunoglobulinas A, que actúa a nivel local en el intestino) e Interleucina-2 (Begmark, 1998b; Yasui *et al.*, 1999; Matsuzaki y Chin, 2000; Umesaki y Setoyama, 2000; .Perdigon *et al.*, 2001).

Inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos: Este es uno de las acciones más importantes de *E. faecium*. Los mecanismos principales mediante los cuales se controla el excesivo crecimiento de microorganismo patógenos son: Capacidad de adherencia a la pared intestinal (evitando la adhesión de microorganismos patógenos), importante producción de ácido láctico (acidificando el medio intestinal e inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli* y *Clostridium* spp.) y gran capacidad de multiplicación a nivel intestinal (compitiendo con los microorganismos patógenos por el espacio y los nutrientes) (Fernández *et al.*, 2002).

Estimula la producción enzimática endógena de animales jóvenes: Otra consecuencia de esta acidificación es que, en animales jóvenes, mejora la digestibilidad de las proteínas de origen no lácteo en las primeras edades (Depto. I+D Norel&Nature, 2000). El pH ácido es el que activa las enzimas para su funcionamiento (paso de pepsinógeno a pepsina activa). Sin embargo, en las primeras semanas de vida los animales producen poco ácido clorhídrico en el estómago, por lo que esta acidez se la proporciona la leche materna, al pasar la lactosa de la leche a ácido láctico. Con la introducción de las dietas sólidas, con gran capacidad tampón, aumenta significativamente el pH gástrico, por lo que la digestión de los nutrientes se ve comprometida (Fernández *et al.*, 2002).

5. CONCLUSIÓN

Se aislaron e identificaron 38 bacterias del rumen bovino y se caracterizaron de manera macroscópica, microscópica y bioquímicamente, mientras que molecularmente se identificaron 20 bacterias.

Se creó un cepario de bacterias aisladas del rumen de vacas Holstein alimentadas con subproductos de cervecería, liofilizadas, para su utilización en la investigación.

Se crearon prospectivas biotecnológicas, demostradas mediante resultados efectivos, y así también se dejó la posibilidad de continuar con varias investigaciones con los microorganismos para incursionarse específicamente en una industria y cepa.

La producción de enzimas, a partir de las diferentes bacterias del rumen bovino encontradas en la investigación, se constituye como un aliciente para investigaciones que podrían ayudar a encontrar soluciones en forma directa para los productores. Las cepas identificadas como VLI 652-2 (*Enterococcus faecium strain HN-N42*) y 2506-3 VC (*Enterococcus faecium strain HN-N11*), producen proteasa, la 1502-4 VC para la enzima xilanasa, la 513-2 VML la enzima celulasa. La identificación como se mencionó en los resultados de la investigación, en algunos casos es necesaria una nueva identificación.

La adición de subproductos de cervecería, (masilla y levadura), provenientes de la cervecería propia y no comercial o enriquecidos, a la dieta de ganado Holstein, aumenta la población bacteriana de tipo Gram negativas.

Las bacterias con las cuales se trabajó son anaerobias facultativas.

6. LITERATURA CITADA

- Aghdamshahriar, H., Nazer, A. y Ahmadzadeh, A. 2006. The effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), in replacement fish meal and poultry by product protein in broiler diets. XII Conferencia Porcina Europea, Verona, Italia.
- Aguilera, B.A. 1988. Evaluación del efecto de la suplementación de rastrojo amoniado sobre la cinética ruminal y digestibilidad en borregos pelibuey. Tesis de Maestría. México, D.F., FES-C, UNAM.
- Akin, D. E. 1987. Association of rumen fungi with various forage grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16:273-285.
- Akin, D. E. y Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1117-1125.
- Akin, D. E. y Rigsby, L. L. 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1987 - 1995.
- Akin, D. E.; Gordon, G. L. R. y Hogan, J. P. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:738-748.
- Allison, M. J., Dawson, K. A., Mayberry, W. R. y Foss, J. G. 1985. *Oxalobacter formigenes* gen. nov. sp. nov.: oxalate degrading anaerobes that inhabit gastro-intestinal tract. *Arch. Microbiol.*, 141, 1-7.
- Annison. E. F., y Dyfed Lewis. M. A. 1966. El metabolismo en el rumen. Editorial Hispano Americana. México. Pp. 2-6:10-21.
- Badui, D. S. 2006. Química de los alimentos. 4 Ed. Editorial Pearson. México. Pp. 75-78:301-302:324:330:332.
- Barichievich, E. M. y Calza, R. E. 1990. Media carbon induction of extracellular cellulase activities in *Neocallimastix frontalis* isolate EB-188. *Current Microbiol.* 20:265-271.
- Bauchop, T. 1979a. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:148-158.
- Bauchop, T. 1979b. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Ann. Rech. Vét.* 10:246-248.

- Bauchop, T. 1981a. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agriculture and Environment*. 6:339-348.
- Bauchop, T. 1981b Rumen anaerobic fungi and the utilization of fibrous feeds. *Reviews in Rural Science* 6: 118-123.
- Beauchemin K. A. y L. M. Rode. 1997. Feed enzymes for ruminants - feature article. *Manitoba agriculture and food*. University Crescent, Winnipeg, Canada.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang y L. M. Rode. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:378-390.
- Beldman G., Voragen A. G. J., Rombouts F. M y Pilnik W. 1988. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*. Journal 31:173-178
- Bengmark, S. 1998b. Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria. *Nutrition*. 14:585-594.
- Bergen, W.G. 1979. Factors affecting growth yields of microorganisms in the rumen. *Trop. Anim. Prod.* 4:13-20.
- Bergey, E. A., 2005. How protective are refuges? Quantifying algal protection in rock crevices. *Freshwater Biology* 50:1163–1177.
- Blanch, M., Calsamaglia, S. y Castello, A. 2009. Quantification of *Streptococcus bovis* and *Megasphaera elsdenii* in ruminal fluid of dairy cows and beef heifers by real time PCR technique. *Journal of Dairy Science* 90 (Suppl I): 339
- Braune, R. 1913. Untersuchungen uber die in Wiederkauernagen vorkommenden protozoen. *Arch. Protist.* 32:111-170.
- Briggs, W. R. y H. P. Chon. 1966. The physiological versus the spectrophotometric status of phytochrome in corn coleoptiles. *Plant Physiol.* 41:1159-66.
- Bryant, M. P. 1963. Symposium on microbial digestion in ruminants: Identification of groups of anaerobic bacteria active in the rumen *J. Anim. Sci.* 22:801-813.
- Bryant, M. P. 1986. *Ruminococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ed. Sneath, P. H. A.), Williams and Wilkins, Baltimore, 2:1093–1097.
- Bryant, M. P. y Burkey, L. A. 1953. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cow fed different rations. *J. Dairy Sci.*, 36, 218–224.

- Bryant, M. P. y L. A. Burkey. 1953. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations. *J. Dairy Sci.* 36:218-224.
- Bryant, M. P. y Small, N. 1956. Characteristics of two new genera of anaerobe curved rods isolated from the rumen of cattle. *J. Bacteriol.*, 72, 22–26.
- Bryant, M. P., Small, N., Bouma, C. and Robinson, I. M. 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.*, 41, 1747–1767.
- Burgstaller, G. 2007. Levadura de cerveza, un ingrediente proteico de alto valor para los animales domésticos. Boletín informativo. Unión de cerveceros Bávaros. Escuela Superior General de Kassel, Witzenhausen, Inglaterra.
- Callaway, E. S., y S. A. Martin. 1997. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035–2044.
- Calsamiglia S., Cardozo, P. W., Ferret, A. y Banch A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science.* 86: 702-711.
- Calsamiglia, S., A. Bach y A. Ferret. 2004. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos. II. Subproductos Húmedos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 28 pp.
- Calsamiglia, S., L. Castillejos y M. Busquet. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI Curso de especialización FEDNA. Madrid, España.
- Cazemier A. E., Verdoes J. C., van Ooyen A. J. y Den Camp H. J. M. 1999. Molecular and biochemical characterization of two xylanase-encoding genes from *Cellulomonas pachnodae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9):4099-4107.
- Certes, A., 1889. Protozoaires. Appendice : organismes divers appartenant à la faune microscopique de la Terre de Feu. In : Mission scientifique du Cap Horn (1882-1883), Tome 6, Zoologie. Paris, Gauthier-Villars : L 45-L 50.
- Chaucheyras F., G. Fonty, P. Gouet, G. Bertin y J. M. Salmón. 1996. Effects of a strain of *S. cerevisiae* (Lerucell SCI), a microbial additive of ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Canadian Journal of Microbiology.* 42:927:933.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G. y Gouet, P. 1995. Effects of live *S. cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Current Microbiol.* 31:201-205.

- Cheng, K. J., y J. W. Costerton, 1980. Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. Digestive physiology metabolism in ruminants. Ed. RUCKEBUSCH, Y. & THIVEND, P., 227-250. Lancaster: MTP Press.
- Concepción, J. P. B. y C. P. Ureña P. 2005. Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Cotta, M. A. y R. B. Hespell. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butirivibrio fibrisolvens*. Appl. Environ. Microbiol. 52:51-58.
- Counotte, G. H. M., Lankhorst, A. y Prins, R. A. 1983. Role of DLlactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. Journal of Animal Science. 56:1222-35.
- Counotte, G.H.M., R. A. Prins, R.H.A.M. Janssen y M.J.A. de Bie. 1981. The role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL- (2, -13 C)-lactate in the rumen of dairy cattle. Appl. Environ. Microbiol. (In press).
- Dawson, K. A., Newman, K. E., Boling, J. A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. J. Anim. Sci. 68:3392-3398.
- Dehority, B. A. 1986. Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. Insect Sci. Appl. 7, 279-296.
- Dehority, B. A. y Scott, H. W. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. J. Dairy Sci., 50:1136-1141.
- Demeyer, D. I. 1981. Introductory lecture: rumen microbes and digestion of plant cell walls. Agriculture and Environment. 6:295-337.
- Depto. I+D, Norel&Nature, SA. 2000. Caracterización de las propiedades probióticas de *E. faecium* CECT 4515.
- Dhiman, T.R., Bingham, H. R. y Radloff, H. D. 2003. Production Response of Lactating Cows Fed Dried Versus Wet Brewers' Grain in Diets with Similar Dry Matter Content¹, 2. J. Dairy Sci. 86(9):2914.
- Dominguez de Luna, J., 2002. Producción comparativa de proteasas por *Streptomyces spp.* en cultivo en medio sólido y cultivo líquido. Tesis de Lic. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Eadie, J. M. 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J. Gen. Microbiol. 29:563-578.
- Elsden, S. R. y D., Lewis, 1952. The production of fatty acids by a gram negative coccus. Biochem. Journal. 55:183-189

- Engels, F. M. y Brice, R. E. 1985. A barrier covering lignified cell walls of barley straw that resists access by rumen microorganisms. *Curr. Microbio.* 12:217-224.
- FAO, 2010. Situación actual y opciones en relación con las biotecnologías ganaderas en los países en desarrollo. Conferencia Técnica Internacional de la FAO sobre las biotecnologías agrícolas en los países en desarrollo (ABDC-10). Guadalajara, México.
- Fernandez, J.; Mesia, J.; Crespo, N. P. 2002. Nuevos avances en la aplicación de prebióticos: *E. faecium* CECT 4515, efecto directo sobre la flora intestinal. *Anaporc (España)*, 22(226):77-78, 80, 82-88
- Gallardo Roman Oscar. Octubre 2007. Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de *Paenibacillus Barcinonensis*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona.
- Garciarena, A. D. 2010. Subproductos en la alimentación de rumiantes. VI Jornada Ganadera INTA – AIANER. INTA EEA. Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.
- Gedek, B., Enders, C., Ahrens, F., Roques, C. 1993. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF Sc 47) on ruminal flora and rumen fermentation pattern in dairy cows. *Ann Zootech.* 42:175.
- Gong. Ch., Tsao. G.T. 1979. *Ann. Rep. Ferment. Process.* 3. Pp. 111.
- Gordon, G. L. R. 1985. The potential manipulation of rumen fungi. In *Reviews in Rural Science*, Ed. Leng, R. A.; Barker, J. S. F.; Adams, D. B.; Hutchinson, K. J., Armidale, Australia: University of New England, publications Office. 6:124-128
- Gordon, L. R. y Phillips, M.W. 1989a. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1703-1710.
- Gorina I. A., y I. V. Yakovleva. 1980. Rapid method for measuring protein content in microbial cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* XVI:936–939.
- Grudsky P. Roberto., Arias B. José Luis. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 5(2).
- Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A.; Harmon, R. J., Barker, K. B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
- Hobson, P. N. y Howard, B. H. 1969. Microbial transformations. In *Handbuch der Tierernährung*, Verlag Paul Parey, Hamburg, I:130.

- Hobson, P. N., 1989. *The Rumen Microbial Eco-system*, Elsevier Applied Science, London.
- Hobson, P. N., Mann, S. O. y Oxford A. E. 1958. Some studies of the occurrence and properties of a large Gram negative coccus from the rumen. *Journal of General Microbiol.* 19:462-472
- Holzappel, WH; Haberer, P; Snel, J; Schillinger, U; Huis int't Veld, JH. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41.85-101.
- Hungate, R. E. 1944. Studies on cellulose fermentation. The culture and physiology of an anaerobic cellulose digesting bacterium. *J. Bacteriol.*, 48:499-513.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 14:1-49.
- Hungate, R. E. 1966, *The rumen and its microbes*. 1ra. Edición. Academic Press, New York.
- Jin, LZ; Marquardt, RR; Zhao, X. 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66.4200-4204.
- Joblin, K. N. 1988. Physical disruption of plant fibre by the rumen fungi of the *Sphaeromonas* group. In the roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Nolan, J. V.; Leng, R. A.; Demeyer, D. 1. Editors. Armidale, NSW. 2351, Australia: Penambui Books. Proceedings of an International Seminar OECD, 26-29. September, p. 159-260. 1989.
- Joblin, K. N., Naylor, G. E. y Williams, A. G. 1990. Effect of *Methanobrevibacter smithii* on xylanolytic activity of anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2287-2295.
- Joblin, K. N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1119-1122.
- Johnson, C. O. L. E., Hurber, J. T., y King, K. J. 1997. Storage and utilization of brewers grains in diets for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 66:73-79.
- Jouany, J.P. 1988. Effects of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In: Nolan, J. V., Leng, R.A. and Demeyer, D.I. Armidale Eds. *The roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. : Penambui Books p 59-74.
- Jouany, J.P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech.* 43:49

- Kamra, D. N. 1989. Rumen microbial ecosystem. *Current science*.89:1-10
Hobson, P. N., *The Rumen Microbial Eco-system*, Elsevier Applied Science, London.
- Kamra, D. N., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current science*.89:1-10
- Kennedy, RJ; Kirk, SJ; gardiner, KR. 2002. Mucosal barrier function and the commensal flora. *Gut*. 50. 441-442.
- Kolattukudy, P. E. 1985 Enzymatic penetration of plant cuticle by fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 223- 250.
- Kumar, V. K., Sareen, P. K. y Singh, S. 1994. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture supplements on ruminal metabolism in buffalo calves given a high concentrate diet. *Brit Soc. Anim Sci.* 59:209-215.
- Latham. M. J., Sharpe, E. y Weiss, N. 1979. Anaerobic cocci from the bovine alimentary tract, the amino acids of their cell wall peptidoglycans and those of various species of anaerobic *Streptococcus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 47:209–221.
- Liebetanz, E. 1910. Die parasitischen protozoen der wiederkauermagens. *Arch. Protist.* 19:19.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanada, S., y Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *S. cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *Journal of Animal Science.* 82:1847-1854.
- Lucas, A.; Cañizares P.; Valverde, J. 2008. Hidrólisis enzimática de celobiosa. Universidad de Castilla. Departamento de Ingeniería Química.
- Luque, J., A. Herráez. 2001. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Editora ELSEVIER. Madrid, España.
- Mantovani, y C. Russell, 2001. Nisi resistance of *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 808-813
- Mateo-Sánchez, J. M., Cobos-Peralta, M. A., Trinidad, S. V., Cetina, A., Vargas, H. J. 2002. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de aserrín. *Agrociencia.* 36:523-529.
- Matsuzaki, T; Chin, J. 2000. Modulating immune response with probiotic bacteria. *Immunol. Cell. Biol.* 78. 67-73.
- McLeod, M. N. y Minson, D. J. *J. Animal Science* 66:992-1988.
- McAllister TK, Bae HD, Muir A, Yanke LJ, Cheng KJ. 1994. Effect of birdsfoot condensed tannins on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Can J Microbiol* 40:298–305.

- Montero, G. 2009. Respuesta productiva de vacas lactantes alimentadas con dietas adicionadas con subproductos de cervecería. Tesis Maestría Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Pp. 102.
- Muirhead, S. 1996. Direct feed microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium, 3rd edn. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, 391 pp.
- Mullis, K. B., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn y H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*51:335-350.
- Muñoz, M. A. 2006. Biotecnología. Editorial Universidad de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaption on the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375–380.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. y McIntosh, M. 1996. Mode of action of the yeast *S. cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition.* 76:249-261.
- Nisbet, D. J., y S. A. Martin. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 694628.
- Obispo, N. E. 1990. Most-probable-number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting numbers in the rumen. Master Thesis, the Ohio State University, Ohio, USA.
- Odenyo, A. A., Mackie, R. I., Stahl, D. A. y White, B. A. 1994. The use of 16S rRNA probes to study competition between rumen fibrolytic bacteria: development of probe for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:3688–3696.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The Lactic Acid Bacteria*. Copenhagen: Host and son.
- Orpin, C. G. 1974. The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does the sequestration occur *J. Gen. Microbio.* 84: 395-398.
- Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91:249-262.
- Orpin, C. G. 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 94:270-280.
- Orpin, C. G. 1977b. The rumen flagellate *Piromonas communis*: Its life-history and invasion of plant material in the rumen. *J. Gen. Microbiol.* 99:107-117.

- Orpin, C. G. 1978a. Carbohydrate fermentation in a defined medium by the rumen Phycomycete *Neocallimastix frontalis*. Society for General Microbiology: Proceedings 5:98-99.
- Orpin, C. G. y Joblin, K. N. 1988. The rumen anaerobic fungi. In the rumen microbial ecosystems. Ed. P. N. Hobson. p. 129-150. Eisevier Science Publisher.
- Orpin, C. G. y Munn, E. 1986. *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the Neocallimasticaceae in habiting the rumen of sheep. Trans. Br. Mycol. Soc. 86: 178-181.
- Orpin, C.G. 1977c. Short communications: the occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organism *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. J. Gen. Microbiol. 99: 215-218.
- Orskov. E. R. 1992. Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited. 24-28 Oval Road. London NW17DX. UK.
- Ouwehand, AC; Grasten, S; Niemi, P; Mykkanen, H; Salminen, S. 2000. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. Lett. Appl. Microbiol. 31.30-33.
- Owens, F. N. y R. Zinn. 1988. Protein metabolism of ruminant animals. Pp. 227-249. In D. C. Church, (Ed.). The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. Prentice. Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Perdigon, G; Fuller, R; Raya, R. 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2:27-42.
- Perdomo, M., Vargas, R., Campos, G. 2004. Valor nutritivo de la levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar. Arch. Latinoam. Prod. Animal. 12(3):89-95.
- Pérez del Angel, L. A., 2009. Estudio del efecto bactericida y/o bacteriostático de oligosacáridos de quitosán sobre *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de licenciatura. Div. de Ciencia Animal. Departamento de ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,. Saltillo, Coahuila, México.
- Prescott, C.E. 1996. Influence of forest floor type on rates of litter decomposition in microcosms. Soil Biol. Biochem. 28:1319–1325.
- Quintero, D.; Velasco, Z.; Valbuena, O.; Contrera, I. 2007. Identificación de actividad total de xilanasas en bacterias termófilas del centro termal las trincheras. Universidad de Carabobo.
- Reed, G. y T.W. Nagodawithana, 1991. Yeast technology (2nd edn), Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 315–368.

- Richardson, A. J., Stewart, C. S., Campbell, G. P., Wilson, A. B. y Joblin, K. N. 1986. Influence of coculture with rumen bacteria on the lignocellulolytic activity of Phycomycetous fungi from the rumen. In Microbial Ecology Section. XIV International Congress of Microbiology, 7 -13 September (Manchester, England).
- Rodríguez, A. y Valencia E. 2008. Microbiología Ruminal. Ruminantia. 3(1).
- Rodríguez, H. R., 2010, Manual de Laboratorio: Biología Molecular. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Pp. 30.
- Rodríguez S. G., Prado B. L., Huerta S., Saucedo C. G. 1999. Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.
- Rogers, H. J. y Peakinis, H. A. 1968. Cell walls of filamentous fungi. In Cell Walls and Membranes. p.153-160. London, E. & F. N. Sponsons.
- Rolfe, RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J. Nutr. 130 Suppl. 2S:396-402.
- Schleifer KH; Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Sys. Bacteriol. 34:31-34.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. Journal of Animal Science. 43:910-929.
- Smith, G., Kapteyn, J., Eno, H y Klis, F. 1999. Cell wall dynamics in yeast. Curr. Opin. Microbiol. 2:348-352.
- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195:19-23.
- Stewart G.J. 1992. Transformation in natural environments In: Wellington EMH, van Elsass JD (eds) Genetic interactions among microorganisms in the natural environment. Pergamon Press, Oxford.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. y Decker, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev., 91:100-180.
- Theodorou, M. K., Longland, A. C., Dhanoa, M. S., Lowe, S. E. y Trinci, A. P. 1989. Growth of *Neocallimastix* sp. strain R1 on italian ryegrass hay: removal of neutral sugars from plant cell walls. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1363-1367.
- Theodorou, M. K.; Lowe, S. E. y Trinci, A. P. J. 1988. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. Biosystem 21:371-376.

- Umesaki, Y; Setoyama, H. 2000. Structure of the intestinal flora responsible for the development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* 11:1345-1351.
- Ushida, K.; Tanaka, H. y Kojima, Y. 1989. A simple in situ method for estimating fungal population size in the rumen. *Letters in Appl. Microbio.* 9:109-111.
- Vandelle, M; Teller, E; Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Tierernahr.* 40:543-567.
- Varela, G. y Grotiuz, 2002. Temas de bacteriología y virología médica. *Fisiología y metabolismo bacteriano.* Pp. 43-57
- Wallace, R. J. y M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen containing compounds. In: *The Rumen Microbial Ecosystem.* Hobson PN, ed. Elsevier Applied Science, London, 217-250
- Warner, A. G. I., 1962. Some factors influencing the rumen microbial population. *J. Gen. Microbiol.* 28:129-146.
- Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L. y Mertens, D.R. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122-134.
- Whindham, W. R. y Akin, D. E. 1984. Rumen fungi and forage fiber degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:473-476.
- Wiedmeier R. D., Arambel, M. J., Welters, J. L. 1987. Effect of yeastculture and *Aspergillusoryzae*fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2068.
- Williams, A. G. y Orpin, C. G. 1987a. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocaltimastixpatriciarum*, *Piromonas communis*, and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. *Can. J. Microbio.* 33:427-434.
- Williams, A. G. y Orpin, C. G. 1987b. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrates substrates. *Can. J. Microbiol.* 33:418-426.
- Williams, A.G. Coleman, G.S. 1988. The rumen protozoa. In: P.N. Hobson (Ed). *The Rumen Microbial Ecosystem.* Elsevier Applied Sci. London and New York. pp 77-128.
- Wilson, J. R. y Engels, F. M. 1989. Do rumen fungi have a significant direct role in particie size reduction? In the roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. J. V. Nolan; R. A. Leng; D. 1. Demeyer Editors. Armidale NSW 2351, Australia: Penambui Books. *Proceedings of an Internacional Seminar OECD 26-29 September, 1988.* p. 255-257.

- Wood, T. M., Wilson, C. A., McCrae, S. y Joslin, K. N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbio. Letters* 34:37-40.
- Yasui, H; Shida, K; Matsuzaki, T; Yokokura, T. 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76.383-389.
- Yokohama, M. T., y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. Pag. 137-158 en: *el rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.
- Zhang, A., Lee, B., Lee, K., An, G., Song, K., Lee, C. 2005. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*, 84(7):1015-1021
- Zinn, R. A. y J. Salinas. 1999. Influence of Fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78% concentrate growing diet. In: *Biotechnology in the feed industry 15th annual symposium*. United Kingdom. Nottingham university press. pp. 313-319.

7. ANEXOS

Anexo 1: Elaboración de Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Para ello se tomó una azada del cultivo y se suspendió en un portaobjetos que poseía una gota de agua destilada, se homogenizó la suspensión de bacterias y se extendió un poco en el portaobjetos; posteriormente se fijó la muestra con calor. Una vez fijada y seca la preparación, se cubrió por completo la superficie, donde se encontraba la muestra, con cristal violeta durante 1 minuto y se enjuagó suavemente al chorro del agua. Todas las células se tiñen de color azul-violeta. Se añadió la solución de lugol (I2IK) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con una solución de alcohol-acetona (50/50 v/v) por unos cuantos segundos para después enjuagarse de inmediato. Las células Gram positivas siguen de color azul-violeta, mientras que las Gram negativas se decoloran. Finalmente se cubrió la superficie de la preparación con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para finalmente enjuagar con agua destilada. Las células Gram positivas (G+) se vuelven azul-violeta y las Gram negativas (G-) rosas o rojas.

Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos, empleando un microscopio óptico (WESTOVER) a100X con aceite de inmersión.

Anexo 2 .Fundamentos pruebas bioquímicas

➤ **Agar Triple Hierro-Triple Azúcar (Agar TSI o Triple SugarIron)**

Este medio se emplea para detectar la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas y, también para detectar la producción de ácido sulfhídrico.

➤ **Agar Hierro Lisina (Agar LIA o Lisynelron Agar)**

Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.

➤ **Medio Movilidad-Indol-Ornitina (Medio MIO o MotilityIndoleOrnithine Médium)**

Se emplea para determinar la movilidad, presencia de una actividad de la enzima ornitina de carboxilasa y, la producción de indol.

➤ **Agar Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar)**

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

➤ **Agar SIM (Sulfide Indole Motility Medium)**

Medio que permite poner en evidencia la producción de indol, ácido sulfhídrico y movilidad de las bacterias.

➤ **Agar Mac Conkey**

Es un medio diferencial que permite distinguir entre enterobacterias que hidrolizan lactosa y las que no lo hacen. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo. La hidrólisis de la lactosa produce ácidos orgánicos y las colonias que la hidrolizan adquieren un color rojo. Las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aunque el medio tira a amarillo por la

subida de pH que origina la utilización de las proteínas (peptona) del medio.

Anexo 3. Preparación de Reactivos 1 y 2 para la técnica de Somogyi-Nelson

➤ **Reactivo 1 (Somogyi):**

Solución A: 25 g de carbonato de sodio anhidrido (Na_2CO_3), 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNa}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 200 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) se disolvieron en agua destilada y se aforó a 1 litro.

Solución B: en 200 mL de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

El reactivo 1 se preparó mezclando 1 mL de solución en 25 mL de solución A.

➤ **Reactivo 2 (Nelson):**

Solución A: en 450 mL de agua destilada se disolvió 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(\text{CNH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Solución B: 3 g de arsenato de sodio heptahidratado ($\text{Na H As O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

El reactivo 2 se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforaron a 500 mL. Posteriormente se calentó a 55°C durante 30 min.

Anexo 4. Preparación de reactivo de Taussky-Shorr.Solución Stock Molibdato de Amonio 10%

(Para 100 mL)

Se agrega 10 g de Amonio Heptamolibdato ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$), luego 100 mL de H_2SO_4 10 N.

Preparación de Ácido Sulfúrico 10 N

Se añade 51 mL de ácido sulfúrico 96,1% p/p (19,596 N). Luego se aforar a 100 mL con H_2O . Para después disolver el Amonio Heptamolibdato con agitación constante para prevenir solidificación.

Nota: Guardar en frasco oscuro.

Reactivo de Taussky-Shorr

(Para 200 mL)

La solución a usar en las mediciones debe ser fresca. Se pone 20 mL de Solución Stock Molibdato de Amonio 10%. Luego se diluye a 150 mL con H_2O . Se grega 10g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Se Agita hasta la disolución. Y por último se afora a 200 mL con H_2O .

Anexo 5: Preparación de Buffer de extracción CTAB

Disolver en 620 mL de agua destilada 280 mL de Na Cl 5M, 50 mL de Tris-HCL 2M (pH 8), 40 mL de EDTA 0.5 M y 20 g de CTAB. Luego disolver en baño maría sin agitar.

Anexo 6: Preparación de Albumina Sérica Bovina al 20%

La relación es de peso:volumen, en 100 mL de agua DDE se agrega 20 g. de Albumina Sérica Bovina. La marca que se utilizó fue AMBRESKO (Código: 0332-25G, Lote: 1929B414).

Anexo 7: Preparación de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)

En un frasco ámbar de 5,000 mL, limpio y estéril, colocar 480 mL de cloroformo y 20 mL de alcohol isoamílico. Mezclarlo homogéneamente y guardar a temperatura ambiente. Se debe preparar en una campana de extracción.

Anexo 8: Preparación de TE 1X

De una solución Tris (1M con un pH 7.6), tomar 100 mL y agregar 20 mL de una solución EDTA (0.5M a un pH 8.0), diluirlo con 880 mL de agua DDE y ajustarlo a un pH de 7.6.

Anexo 9: Preparación de EDTA 0.5M

Disolver 186.1 gr. de EDTA dibásico, en 800 mL de agua, disolver en baño maría, no agitar, ajustar el pH a 8 con Na OH 5M: y aforar a 1,000 mL. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 Lbs. de presión.

Anexo 10: Preparación de Lauril Sulfato de sodio (SDS) al 14%

Disolver 14 gr. de SDS en 56 mL de agua DDE, calentar a 68°C en baño maría, no agitar, una vez a temperatura ambiente se ajusta al pH a 7.2, agregando unas gotas de HCl concentrado y aforar a 100 mL. No necesita esterilización.

Anexo 11: Preparación de Proteinasa K al 0.1%

Se utiliza la relación peso:volumen, es decir, en 100 mL de agua DDE se agrega 0.1 gr. de Proteinasa K, la que se utilizó para la investigación fue de la marca Bioline, código #: PK-103J.

Anexo 12: Preparación de TE 0.1X

Se realiza una dilución a partir del Buffer TE 1X, en 90 mL de agua DDE se agrega 10 mL de TE 1X.

Anexo 13: Secuencia de Identificación

513-1 VML

>[gb|JF772468.1](#) Bacillus sp. bD3(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1514

Score = 600 bits (664), Expect = 3e-168
Identities = 335/337 (99%), Gaps = 0/337 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 5      CTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTA 64
             |||
Sbjct 1505    CTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTA 1446

Query 65     CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 124
             |||
Sbjct 1445    CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 1386

Query 125    GGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAG 184
             |||
Sbjct 1385    GGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAG 1326

Query 185    TCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAC TGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCG 244
             |||
Sbjct 1325    TCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAC TGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCG 1266

Query 245    GCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCA 304
             |||
Sbjct 1265    GCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCA 1206

Query 305    TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTATG 341
             |||
Sbjct 1205    TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTATG 1169

```

953-9 VML

>[gb|FJ378697.1](#) Enterococcus faecium strain HN-N42 16S ribosomal RNA gene, complete
sequence
Length=1524

Score = 531 bits (588), Expect = 1e-147
Identities = 313/323 (97%), Gaps = 2/323 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CCTTGT-ACGACTTCACCCCA-TCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGT 58
             |||
Sbjct 1517    CCTTGTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGT 1458

Query 59     TACCTACCGACTTCGGGGTTACAAACTCTCGGGGGTGACGGGCGGGGTGTACAAGGC 118
             |||
Sbjct 1457    TACCTACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC 1398

Query 119    CCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACAACCGATTCCGGCTTCATGC 178
             |||
Sbjct 1397    CCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGC 1338

Query 179    AGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAC TGAGAGAAGCTTTAAAAAATTAGCTTAGCCTCG 238
             |||
Sbjct 1337    AGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAC TGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCG 1278

Query 239    CGACTTCGCAACTCGTTGTA CTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGG 298
             |||
Sbjct 1277    CGACTTCGCAACTCGTTGTA CTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGG 1218

Query 299    CATGATGATTTGACGTCATCCCC 321
             |||
Sbjct 1217    CATGATGATTTGACGTCATCCCC 1195

```

205-2 VAM

>[gb|GU726185.1](#) Bacillus sp. KZ_Aa1M_Mm3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1541

Score = 585 bits (648), Expect = 6e-164
Identities = 324/324 (100%), Gaps = 0/324 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1   TACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC 60
          |||
Sbjct 1499 TACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC 1440

Query 61   ACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGA 120
          |||
Sbjct 1439 ACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGA 1380

Query 121  ACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGA 180
          |||
Sbjct 1379 ACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGA 1320

Query 181  GTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCT 240
          |||
Sbjct 1319 GTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCT 1260

Query 241  CGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGAT 300
          |||
Sbjct 1259 CGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGAT 1200

Query 301  GATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 324
          |||
Sbjct 1199 GATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 1176

```

1502-6 VAM

>[gb|JF772468.1](#) Bacillus sp. bD3(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1514

Score = 576 bits (638), Expect = 3e-161
Identities = 324/326 (99%), Gaps = 2/326 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 3   CCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCCGGCGGCTGGCTCCAAAAGG 62
          |||
Sbjct 1506 CCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTT--CGGCGGCTGGCTCCAAAAGG 1449

Query 63   TTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG 122
          |||
Sbjct 1448 TTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG 1389

Query 123  CCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACG 182
          |||
Sbjct 1388 CCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACG 1329

Query 183  CAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTC 242
          |||
Sbjct 1328 CAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTC 1269

Query 243  GCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGG 302
          |||
Sbjct 1268 GCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGG 1209

Query 303  GCATGATGATTTGACGTCATCCCCAC 328
          |||
Sbjct 1208 GCATGATGATTTGACGTCATCCCCAC 1183

```

1502-7 VAM

>[gb|GU726185.1](#) Bacillus sp. KZ_AaIM_Mm3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1541

Score = 578 bits (640), Expect = 8e-162
Identities = 324/325 (99%), Gaps = 1/325 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 4      CTTGT-ACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTT 62
            |||
Sbjct 1504   CTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTT 1445

Query 63     ACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 122
            |||
Sbjct 1444   ACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 1385

Query 123    CGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCA 182
            |||
Sbjct 1384   CGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCA 1325

Query 183    GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGATTGTTGGGATTGGCTAAACCTTGC 242
            |||
Sbjct 1324   GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGATTGTTGGGATTGGCTAAACCTTGC 1265

Query 243    GGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC 302
            |||
Sbjct 1264   GGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC 1205

Query 303    ATGATGATTTGACGTCATCCCCACC 327
            |||
Sbjct 1204   ATGATGATTTGACGTCATCCCCACC 1180

```

4906-3 VAM

>[gb|FJ378697.1](#) Enterococcus faecium strain HN-N42 16S ribosomal RNA gene, complete
sequence
Length=1524

Score = 560 bits (620), Expect = 2e-156
Identities = 318/323 (98%), Gaps = 0/323 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      ACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTCA 60
            |||
Sbjct 1510   ACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTCA 1451

Query 61     CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGGTGTACAAGGCCCGGGAA 120
            |||
Sbjct 1450   CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 1391

Query 121    CGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACAAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCAAG 180
            |||
Sbjct 1390   CGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 1331

Query 181    TTGCAGCCTGCAATCCGAACAGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 240
            |||
Sbjct 1330   TTGCAGCCTGCAATCCGAACAGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 1271

Query 241    GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 300
            |||
Sbjct 1270   GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 1211

Query 301    ATTTGACGTCTTcccccccTTCC 323
            |||
Sbjct 1210   ATTTGACGTCTTcccccccTTCC 1188

```

1004-2 VAM

>[gb|FJ378697.1](#) Enterococcus faecium strain HN-N42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1524

Score = 540 bits (598), Expect = 2e-150
Identities = 315/324 (97%), Gaps = 1/324 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 2      CTTGTTACGACTTCACCCCA-TCATCTATCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTT 60
              |||
Sbjct 1516   CTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTT 1457

Query 61     ACCTCACCGACTTCGGGGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGGTGTACAAGGCC 120
              |||
Sbjct 1456   ACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 1397

Query 121    CGGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACAACCGATTCCGGCTTCATGCA 180
              |||
Sbjct 1396   CGGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCA 1337

Query 181    GGCAAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTAAAGAGCTTTAAAAAATTAGCTTAGCCTCGC 240
              |||
Sbjct 1336   GGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTAAAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGC 1277

Query 241    GACTTCGCAACTCGTTGTAATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC 300
              |||
Sbjct 1276   GACTTCGCAACTCGTTGTAATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC 1217

Query 301    ATGATGATTTGACGTCATCCCCAC 324
              |||
Sbjct 1216   ATGATGATTTGACGTCATCCCCAC 1193

```

652-2 VLI

>[gb|FJ378697.1](#) Enterococcus faecium strain HN-N42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1524

Score = 531 bits (588), Expect = 1e-147
Identities = 309/319 (97%), Gaps = 0/319 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTC 60
              |||
Sbjct 1511   TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCTC 1452

Query 61     ACCGACTTCGGGGTTACAAACTCTCGGGTGTGACGGGCGGGTGTACAAGGCCCGGAA 120
              |||
Sbjct 1451   ACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA 1392

Query 121    ACGTATTCACCGCGGCGTGTGACCCGCGATTACAAGCGATTCCGGCTTCATGCGGGCGA 180
              |||
Sbjct 1391   ACGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCGGGCGA 1332

Query 181    GTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTAAAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTT 240
              |||
Sbjct 1331   GTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTAAAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTT 1272

Query 241    CGCAACTCGTTGTAATCCATTGTAGCACGTGTGTGGCCAGGTCATAAGGGGCATGAT 300
              |||
Sbjct 1271   CGCAACTCGTTGTAATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGAT 1212

Query 301    GATTTGACGCTTCCCCAC 319
              |||
Sbjct 1211   GATTTGACGTCATCCCCAC 1193

```

932-1 VLI

>[gb|GU726185.1](#) Bacillus sp. KZ_AaIM_Mm3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1541

Score = 576 bits (638), Expect = 3e-161
Identities = 319/319 (100%), Gaps = 0/319 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC 60
            |||
Sbjct 1499   TACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTC 1440

Query 61     ACCGACTTCGGGTGTTGCAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA 120
            |||
Sbjct 1439   ACCGACTTCGGGTGTTGCAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA 1380

Query 121    ACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGA 180
            |||
Sbjct 1379   ACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGA 1320

Query 181    GTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCT 240
            |||
Sbjct 1319   GTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCT 1260

Query 241    CGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT 300
            |||
Sbjct 1259   CGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGAT 1200

Query 301    GATTTGACGTCATCCCCAC 319
            |||
Sbjct 1199   GATTTGACGTCATCCCCAC 1181

```

932-2 VLI

>[gb|GU726185.1](#) Bacillus sp. KZ_AaIM_Mm3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1541

Score = 583 bits (646), Expect = 2e-163
Identities = 324/325 (99%), Gaps = 0/325 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CCTTGNTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGT 60
            |||
Sbjct 1505   CCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGT 1446

Query 61     TACCTCACC GACTTCGGGTGTTGCAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC 120
            |||
Sbjct 1445   TACCTCACC GACTTCGGGTGTTGCAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC 1386

Query 121    CCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGC 180
            |||
Sbjct 1385   CCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGC 1326

Query 181    AGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTG 240
            |||
Sbjct 1325   AGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTG 1266

Query 241    CGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGG 300
            |||
Sbjct 1265   CGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGG 1206

Query 301    CATGATGATTTGACGTCATCCCCAC 325
            |||
Sbjct 1205   CATGATGATTTGACGTCATCCCCAC 1181

```


932-4 VLI

>[gb|GU726185.1](#) Bacillus sp. KZ_AalM_Mm3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1541

Score = 583 bits (646), Expect = 2e-163
Identities = 324/325 (99%), Gaps = 0/325 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 3      CTTGNTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTT 62
             |||
Sbjct 1504    CTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTT 1445

Query 63      ACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 122
             |||
Sbjct 1444    ACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 1385

Query 123     CGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCA 182
             |||
Sbjct 1384    CGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCA 1325

Query 183     GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGC 242
             |||
Sbjct 1324    GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGC 1265

Query 243     GGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC 302
             |||
Sbjct 1264    GGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC 1205

Query 303     ATGATGATTTGACGTCATCCCCACC 327
             |||
Sbjct 1204    ATGATGATTTGACGTCATCCCCACC 1180

```

932-5 VLI

>[emb|AM913938.1](#) Bacillus sp. L74 partial 16S rRNA gene, isolate L74
Length=1493

Score = 578 bits (640), Expect = 8e-162
Identities = 320/320 (100%), Gaps = 0/320 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 5      GTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCT 64
             |||
Sbjct 1493    GTACGACTTCACCCCAATCATCTGCCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCT 1434

Query 65      CACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG 124
             |||
Sbjct 1433    CACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG 1374

Query 125     AACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCG 184
             |||
Sbjct 1373    AACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCG 1314

Query 185     AGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGC GGTC 244
             |||
Sbjct 1313    AGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGC GGTC 1254

Query 245     TCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGA 304
             |||
Sbjct 1253    TCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGA 1194

Query 305     TGATTTGACGTCATCCCCAC 324
             |||
Sbjct 1193    TGATTTGACGTCATCCCCAC 1174

```

1003-2 VC

>[gb|FJ3378666.2](#) Enterococcus faecium strain HN-N11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1523

Score = 576 bits (638), Expect = 3e-161
Identities = 319/319 (100%), Gaps = 0/319 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 3      TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 62
             |||
Sbjct 1510   TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 1451

Query 63     CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 122
             |||
Sbjct 1450   CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 1391

Query 123    CGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 182
             |||
Sbjct 1390   CGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 1331

Query 183    TTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 242
             |||
Sbjct 1330   TTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 1271

Query 243    GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 302
             |||
Sbjct 1270   GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 1211

Query 303    ATTTGACGTCATCCCCACC 321
             |||
Sbjct 1210   ATTTGACGTCATCCCCACC 1192

```

2606-2 VA

>[gb|FJ3378666.2](#) Enterococcus faecium strain HN-N11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1523

Score = 583 bits (646), Expect = 2e-163
Identities = 323/323 (100%), Gaps = 0/323 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 60
             |||
Sbjct 1510   TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 1451

Query 61     CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 120
             |||
Sbjct 1450   CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 1391

Query 121    CGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 180
             |||
Sbjct 1390   CGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 1331

Query 181    TTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 240
             |||
Sbjct 1330   TTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 1271

Query 241    GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 300
             |||
Sbjct 1270   GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 1211

Query 301    ATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 323
             |||
Sbjct 1210   ATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 1188

```

3505-3 VC

>[gb|FJ749883.1](#) Enterococcus faecium strain IMAU60169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1485

Score = 567 bits (628), Expect = 2e-158
Identities = 314/314 (100%), Gaps = 0/314 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 12  CTTACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGAC 71
          |||
Sbjct 1485 CTTACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGAC 1426

Query 72  TTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAT 131
          |||
Sbjct 1425 TTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAT 1366

Query 132  TCACCGCGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCA 191
          |||
Sbjct 1365 TCACCGCGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCA 1306

Query 192  GCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAAC 251
          |||
Sbjct 1305 GCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAAC 1246

Query 252  TCGTTGTA CTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG 311
          |||
Sbjct 1245 TCGTTGTA CTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTG 1186

Query 312  ACGTCATCCCCACC 325
          |||
Sbjct 1185 ACGTCATCCCCACC 1172

```

2606-3 VA

>[gb|FJ378666.2](#) Enterococcus faecium strain HN-N11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1523

Score = 585 bits (648), Expect = 6e-164
Identities = 324/324 (100%), Gaps = 0/324 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  TTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTAC 60
          |||
Sbjct 1514 TTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTAC 1455

Query 61  CTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGG 120
          |||
Sbjct 1454 CTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGG 1395

Query 121  GGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGG 180
          |||
Sbjct 1394 GGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGG 1335

Query 181  CGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGA 240
          |||
Sbjct 1334 CGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGA 1275

Query 241  CTTGCAACTCGTTGTA CTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCAT 300
          |||
Sbjct 1274 CTTGCAACTCGTTGTA CTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCAT 1215

Query 301  GATGATTTGACGTCATCCCCACCT 324
          |||
Sbjct 1214 GATGATTTGACGTCATCCCCACCT 1191

```

901-3 VC

>[|gb|FJ378666.2|](#) Enterococcus faecium strain HN-N11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1523

Score = 585 bits (648), Expect = 6e-164
Identities = 333/336 (99%), Gaps = 2/336 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1   CTTGT-ACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTA 59
          |||
Sbjct 1515 CTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTA 1456

Query 60  CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 119
          |||
Sbjct 1455 CCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC 1396

Query 120 GGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAG 179
          |||
Sbjct 1395 GGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAG 1336

Query 180 GCGAGTTGCAGCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCG 239
          |||
Sbjct 1335 GCGAGTTGCAGCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCG 1276

Query 240 ACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA 299
          |||
Sbjct 1275 ACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCA 1216

Query 300 TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTT 335
          |||
Sbjct 1215 TGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT-CCTCCGGTT 1181

```

1003-5 VC

>[|gb|FJ378666.2|](#) Enterococcus faecium strain HN-N11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Length=1523

Score = 576 bits (638), Expect = 3e-161
Identities = 326/329 (99%), Gaps = 1/329 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1   TACGACTTCACCCCA-TCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 59
          |||
Sbjct 1510 TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 1451

Query 60  CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 119
          |||
Sbjct 1450 CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 1391

Query 120 CGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 179
          |||
Sbjct 1390 CGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 1331

Query 180 TTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 239
          |||
Sbjct 1330 TTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 1271

Query 240 GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 299
          |||
Sbjct 1270 GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 1211

Query 300 ATTTGACGTCATCCCCACCTACCTCCAGT 328
          |||
Sbjct 1210 ATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGT 1182

```

3505-5 VC

>[gb|EU522077.1](#) Enterococcus sp. DME 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1510

Score = 583 bits (646), Expect = 2e-163
Identities = 323/323 (100%), Gaps = 0/323 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 10  TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 69
          |||
Sbjct 1509 TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 1450

Query 70  CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 129
          |||
Sbjct 1449 CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 1390

Query 130  CGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 189
          |||
Sbjct 1389 CGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 1330

Query 190  TTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 249
          |||
Sbjct 1329 TTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 1270

Query 250  GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 309
          |||
Sbjct 1269 GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 1210

Query 310  ATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 332
          |||
Sbjct 1209 ATTTGACGTCATCCCCACCTTCC 1187

```

2506-3 VC

>[gb|FJ337866.2](#) Enterococcus faecium strain HN-N11 16S ribosomal RNA gene, complete
sequence
Length=1523

Score = 590 bits (654), Expect = 1e-165
Identities = 329/330 (99%), Gaps = 0/330 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1  TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 60
          |||
Sbjct 1510 TACGACTTCACCCCAATCATCTATCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCA 1451

Query 61  CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 120
          |||
Sbjct 1450 CCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAA 1391

Query 121  CGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 180
          |||
Sbjct 1390 CGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAG 1331

Query 181  TTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 240
          |||
Sbjct 1330 TTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTC 1271

Query 241  GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 300
          |||
Sbjct 1270 GCAACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATG 1211

Query 301  ATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTT 330
          |||
Sbjct 1210 ATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTT 1181

```