

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

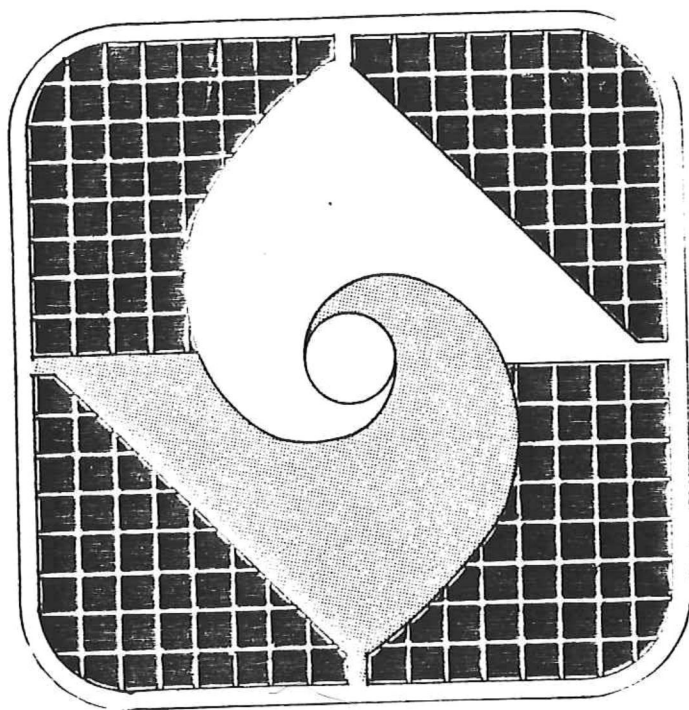


AISLAMIENTO Y CULTIVO DE BACTERIAS DEL RUMEN
PARA LA UTILIZACION DE CELULOSA COMO
MATERIA PRIMA EN PROCESOS
FERMENTATIVOS
TESIS
PROFESIONAL
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

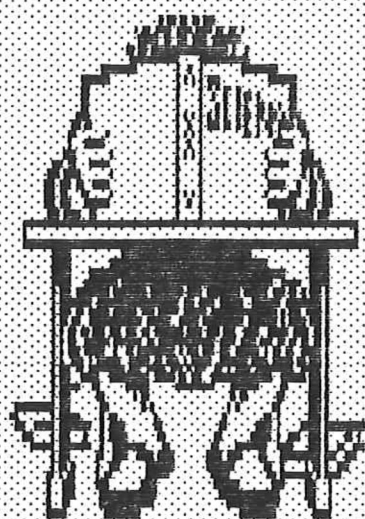
Presentan:
Ana Isabel Miramontes Bush
Jorge Sanchez Rodriguez
Ana Elsi Ulloa Perez

Ensenada, B. C.

Junio de 1989.

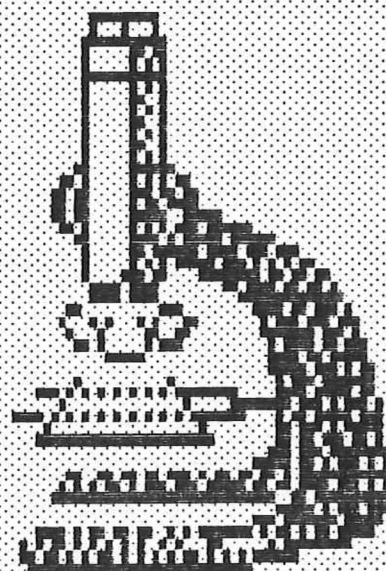


**Escuela
Superior
de Ciencias**



La ciencia constituye una forma de conocimiento eminentemente humana. Es una aventura interminable al filo de la incertidumbre. Nos hallamos siempre al borde de lo desconocido, tratamos de adelantarnos a lo esperado...

J. Bronowski.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO Y CULTIVO DE BACTERIAS DEL RUMEN PARA LA UTILIZACION DE CELULOSA COMO MATERIA PRIMA EN PROCESOS FERMENTATIVOS"

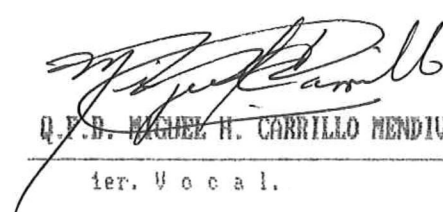
Tesis
Profesional
que Presentan:

ANA ISABEL MIRAMONTES BUSH.
JORGE SANCHEZ RODRIGUEZ.
ANA ELSI ULLOA PEREZ.

APROBADOS POR:


QUIM. CESAR A. MIGONI RAMIREZ.

Presidente.


Q.F.B. MIGUEL H. CARRILLO MENDIVIL.

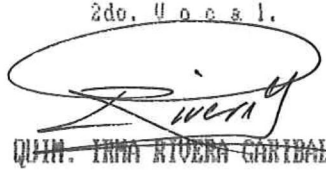
1er. Vocal.


Q.F.B. MANUEL MONTIJO ANTE.

3er. Vocal.


OC. MARIA VICTORIA OROZCO BORBON.

2do. Vocal.


QUIM. IRMA RIVERA GARIBALDI.

Secretario.

DEDICATORIA

A LUIS

Mi compañero, mi amigo. A quien he admirado siempre su disposición al trabajo, su vitalidad e inteligencia. Porque con él aprendí que ser Biólogo es una forma de vivir y no solo una profesión.

A MIS PADRES

Ha quienes he admirado siempre su señorío, su generosidad, su inteligencia y nobleza de espíritu.

Con amor a mi pequeña Sarai.

DEDICATORIA

A ORALIA

Con quien he experimentado éxitos y fracasos, por su infinito apoyo, paciencia y comprensión que me ha brindado. Muy especialmente en este trabajo está mi amor por ti, por que siempre estas en mi pensamiento.

A MIS PADRES

Sra. Apolonia Rodríguez López y al Sr. Manuel Sánchez Díaz. Por su gran apoyo durante todos mis estudios, dedico este mi primer trabajo profesional.

A MIS HERMANOS

Antonia, Refugio, Vicente, Ramón, Mercedes, Jesús, Felipe, Martha y José Trinidad.

GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Oralia Miramontes Bush de manera muy especial por su gran ayuda, por su comprensión y por sus muestras de amistad.

Al Biol. Luis Alberto Alvarez Aldaco por su ayuda incondicional en los momentos más necesarios, por su amistad, sus interminables críticas y el tiempo invertido para que este trabajo llegara a su fin.

A la Dc. Ma. Evarista Arellano Garcia por su gran ayuda, por brindarnos su experiencia, paciencia y profesionalismo. Al Dc. Pedro Ruiz Guzman por sus sugerencias, por brindarnos su amistad y darnos ánimos cuando lo necesitamos.

A el Q.F.B. Miguel H. Carrillo Mendivil por su dedicación a la solución de nuestras grandes dudas, por su apoyo y muestras de amistad, por aligerar nuestro trabajo con su buen humor y profesionalismo. Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A el Quim. César A. Migoni Ramirez por la confianza depositada en cada uno de nosotros para la realización de este trabajo, por ser el pionero en esta área de investigación en esta escuela y por dedicar parte de su tiempo a la revisión de este trabajo.

A el Q.F.B. Manuel Montijo Ante por sus atinadas sugerencias, su amabilidad y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Dc. Ma. Victoria Orozco Borbon por su ayuda y sugerencias prestadas a este trabajo.

A la Quim. Irma Rivera Garibaldi por sus sugerencias, por su ayuda y muestras de amistad.

A la Escuela Superior de Ciencias de la UABC por haber proporcionado los medios para la realización de esta tesis dentro del proyecto "Diseño de un Metodo Microbiológico para la Obtención de Alcohol a Partir de Celulosa a Nivel Industrial" bajo el programa No. 144 de la UABC, asignando a los catedráticos César A. Migoni Ramirez y Miguel H. Carrillo Mendivil.

La investigación realizada para la elaboración de esta tesis fueron realizadas en la Escuela Superior de Ciencias, durante el periodo comprendido entre enero de 1987 a noviembre de 1988. Durante este periodo se recibió apoyo económico, académico y administrativo de la institución por lo que agradecemos ampliamente todas las facilidades prestadas para el desempeño de nuestras labores de investigación y de nuestra preparación académica.

Hacemos extensivo este agradecimiento a todo el personal docente y administrativo de la institución, que de alguna u otra manera colaboraron en nuestra formación como profesionistas.

RESUMEN

Se utilizaron dos medios de cultivos: el medio celulosa de Hungate y el medio 98.5 donde fueron inoculadas las muestras obtenidas a partir del rumen de ganado vacuno.

Se utilizò como fuente de carbono papel filtro Whatman No. 1. Obteniendo como resultado la disminuciòn en el tiempo de incubaciòn cuando fue utilizado el medio 98.5 adicionado de papel filtro macerado.

Se obtuvieron 26 aislamientos de bacterias con actividad celulolítica, las cuales por medio de pruebas bioquímicas y morfológicas se agruparon en cuatro especies: *Clostridium clostridiiforme* con 11.53% del total de aislamientos, *Selenomonas ruminantium* con 61.53%, *Eubacterium ruminantium* con 3.84% y *Lachnospira multiparis* con 3.84% de los aislamientos logrados y un 19.23% correspondientes a 5 aislamientos que no fueron identificados.

Se utilizaron pruebas de actividad enzimática para cada una de las cuatro especies, empleandose como sustrato papel filtro tratado y no tratado, aumentando la actividad celulolítica cuando se empleò papel filtro tratado.

El rendimiento porcentual de transformaciòn global de celulosa a glucosa, se obtuvo en dos fases de crecimiento: fase log y fase estacionaria empleandose el medio 98.5 y CMC (carboximetilcelulosa) ò papel filtro tratado. Utilizando el papel tratado como sustrato *E. ruminantium* y *C. clostridiiforme* mostraron el mayor rendimiento porcentual durante la fase exponencial; al utilizar CMC como sustrato *E. ruminantium* y *L. multiparis* arrojaron el mayor rendimiento porcentual. Durante la fase estacionaria *S. ruminantium* y *C. clostridiiforme* mostraron el mayor rendimiento porcentual cuando se utilizò papel tratado y cuando fue empleado CMC como sustrato las cuatro especies mostraron un elevado porcentaje de rendimiento.

Se realizò la cinética de crecimiento, obteniendose tiempos de duplicaciòn (t_d) y velocidad específica de crecimiento (μ) para cada una de las especies reportadas.

ABSTRACT

The Hungate's cellulose medium and the 98.5 medium were inoculated with samples of rumen fluid obtained from cows.

Whatman paper No.1 was used as the only carbon source and found that the incubation time can be reduced when it was used milled and added to the 98.5 medium.

26 isolates of bacteria were obtained with evident cellulolytic activities. By biochemical and morphological means, these isolates were grouped in four species: *Clostridium clostridiiforme* (11.53%), *Selenomonas ruminantium* (61.53%), *Eubacterium ruminantium* (3.84%) and *Lachnospira multiparis* (3.84%) and the remainder 19.23% corresponding to five isolates not identified.

The four species were tested for enzymatic activity using filter paper in both forms: as it is, and milled as anzyme substrate. When the later form was used the enzymatic activity showed an enhancement in its behavior.

The porcentual yield of global cellulose to glucose transformation was measured in two growth phases: the log phase, and the stationary phase using. The 98.5 + carboxymethylcellulose (98.5 + CMC) medium or the 98.5 + milled filter paper.

Using milled filter paper as enzyme substrate; *E. ruminantium* and *C. clostridiiforme* showed the bigger porcentual yield through the exponential phase; when CMC were used as enzyme substrate, *E. ruminantium* and *L. multiparis* showed the major porcentual yield. Through the stationary phase, *S. ruminantium* and *C. clostridiiforme* showed the major porcentual yield when milled filter paper was used as substrate; and at tast, when CMC was used substrate, the four species showed high porcentual yield of conversion.

The kinetics of growth rate was also carried out, getting duplication times (dt) and specific growth speed (u) for each one of the reported species.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIG. 1.	Cinética de crecimiento correspondiente a <i>Selenomonas ruminantium</i> utilizando dos fuentes de carbono.....	30.
FIG. 2.	Cinética de crecimiento de <i>Clostridium clostridiiforme</i> , utilizando dos fuentes de carbono.....	31.
FIG. 3.	Cinética de crecimiento de <i>Eubacterium ruminantium</i> , utilizando dos fuentes de carbono.....	33.
FIG. 4.	Cinética de crecimiento de <i>Lachnospira multiparis</i> , utilizando dos fuentes de carbono.....	34.
FIG. 5.	Comparación del comportamiento en el crecimiento de las cuatro especies, cuando fue utilizado como fuente de carbono papel filtro.	35.
FIG. 6.	Comparación del comportamiento en el crecimiento de las cuatro especies, cuando fue utilizada como fuente de carbono CMC.....	36.
FIG. 7.	Curva patrón de glucosa, utilizando antrona como reductor de carbohidratos.....	67.
FIG. 8.	Curva patrón de metilcelulosa.....	69.
FIG. 9.	Curva patrón de glucosa, utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS).....	72.
TABLA I.	Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas con respecto a los 26 aislamientos con actividad	

celulolítica.....	28.
TABLA II. Actividad Enzimática detectada en los dos grupos de sustrato en las especies consideradas, mostrando el análisis con t de student a un nivel de 5% de significancia.....	38.
TABLA III. Rendimiento porcentual de celulosa a glucosa arrojado por cada una de las especies, durante la fase exponencial de crecimiento.....	39.
TABLA IV. Rendimiento porcentual global de transformación de celulosa a glucosa, para cada una de las especies durante la fase estacionaria de crecimiento.....	41.
APENDICE I. Medio Celulosa de Hungate (1966).....	57.
APENDICE II. Indicador Azul de Metileno para Anaerobiosis modificado por Smith	58.
APENDICE III. Medio 98.5.....	59.
APENDICE IV. Técnica del Rojo Congo.....	61.
APENDICE V. Almidón Hidrolizado.....	62.
APENDICE VI. Gelatina Digerida.....	64.
APENDICE VII. Medio Leche.....	65.
APENDICE VIII. Producción de Indol.....	66.
APENDICE IX. Producción de H ₂ S.....	68.
APENDICE X. Reducción de Nitratos.....	69.
APENDICE XI. Voges Proskauer.....	70.
APENDICE XII. Catalasa.....	71.
APENDICE XIII. Tinción Gram.....	72.

APENDICE XIV. Tinci3n de Esporas.....	73.
APENDICE XV. T3cnica de la Antrona.....	74.
APENDICE XVI. Determinaci3n de Celulosa.....	76.
APENDICE XVII. Determinaci3n de Actividad Enzim3tica.....	78.

INDICE

	No. de Página
APROBACION DEL TRABAJO.	I.
AGRADECIMIENTOS.	II.
RESUMEN.	VI.
ABSTRACT.	VII.
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.	VIII.
I.- INTRODUCCION.	1.
II.- ANTECEDENTES.	7.
III.- OBJETIVOS.	16.
IV.- METODOLOGIA.	17.
A.- Recolección de muestras.	17.
1.1.-Transporte de muestras.	17.
B.-Tratamiento de muestras.	18.
1.1.-Filtrado.	18.
1.2.-Centrifugado.	18.
C.-Tratamiento de papel.	18.
D.-Obtención de cepas celolíticas.	18.
I.- Etapa.	19.
II.-Etapa	20.
E.- Aislamiento.	20.
F.- Verificación de bacterias celolíticas aisladas	20.
G.-Características de la cepa celolítica.	20.
G.1.-Pruebas bioquímicas.	20.
1.1.-Almidon hidrolizado.	21.
1.2.-Gelatina digerida.	21.
1.3.-Leche.	21.
1.4.-Producción de indol.	21.
1.5.-Producción de ácido sulfhídrico.	21.
1.6.-Reducción de nitrato.	22.
1.7.-Voges Proskauer.	22.
1.8.-Catalasa.	22.
1.9.-Lecitinasas.	22.
1.10.-Coagulasa	23.
1.11.-Crecimiento en bilis.	23.
G.2.-Datos morfológicos.	23.
H.- Cinética de crecimiento de bacterias celolíticas aisladas y caracterizadas.	23.
I.- Cuenta viable en placa.	25.
J.- Pruebas de rendimiento.	25.
K.- Análisis estadístico	26.
V.- RESULTADOS.	27.
VI.-DISCUSION.	42.
VII.- CONCLUSION.	46.

VIII.-RECOMENDACIONES.	48.
IX.- BIBLIOGRAFIA	49.
X.- APENDICES.	57.

I.- INTRODUCCION

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria y que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio que nos rodea. (Bryant et al, 1962).

La actividad de estos microorganismos es variada, algunas suelen producir enfermedades a plantas y animales, sin embargo existen bacterias que debido a su metabolismo benefician a su hospedero, tal es el caso de los mamíferos rumiantes (los que mastican el contenido de la panza).

El estómago de los mamíferos herbívoros es mayor que el de los carnívoros y suele estar dividido en dos o más compartimentos. Los mamíferos rumiantes son los que lo poseen más complejo. Consta de cuatro cámaras: redécilla o retículo, rumen o herbario, librillo o omaso y abomaso (panza o cuajar), que es el verdadero estómago de los rumiantes (Weichert y Presch, 1975). El rumen es un saco musculoso que se extiende desde el diafragma a la pelvis al lado izquierdo de la cavidad abdominal y que por la parte anterior se comunica con el retículo y por la parte posterior con el omaso.

El rumen difiere de otros muchos habitats naturales en su consistencia relativa, y debe considerarse como un aparato de cultivo continuo y de gran eficacia para la propagación de microorganismos anaerobios debido a: la

actividad microbiana, el bajo porcentaje de oxígeno, las concentraciones moderadas de los productos de la fermentación, el contenido de humedad relativamente constante, a la temperatura que oscila entre los 38°C y 42°C y el pH que se encuentra comunmente entre 6 y 7. (Bryant, 1981).

El alimento de los rumiantes contiene altas proporciones de celulosa y consecuentemente bacterias celulolíticas que tienen un papel importante en el ecosistema microbioal del rumen. La mayoría de las bacterias celulolíticas que han sido aisladas pertenecen a los géneros: *Ruminococcus*, *Bacteroides* y *Eutyrvivbrio*, pero varias publicaciones han descrito el aislamiento de *Clostridium* (Sinha y Ranganathan, 1983; Kelly et al, 1987). Estas bacterias están adaptadas a vivir en una acidez entre 5.5 y 7.2, en ausencia de oxígeno, a temperaturas entre los 37°C y 42°C en presencia de concentraciones moderadas de productos de la fermentación (ácidos láctico, acético butírico, etanol y otros), y expuestos a los alimentos ingeridos por el rumiante, (Hungate, 1966). Muchos de estos microorganismos aislados tienen características en común, pero no son idénticos. El interés en el aislamiento de estas bacterias ha sido concentrado hacia su uso para la conversión de biomasa de sustratos celulósicos (Kelly et al, 1987), desde diferentes puntos de vista. Uno de ellos es utilizar la celulosa como substrato para la producción de

proteína de origen unicelular. Otros estudios intentan producir edulcorantes a partir de desechos lignocelulósicos, y otros más pretenden aumentar la eficacia de su utilización por los animales rumiantes, (Pérez, 1981).

Los desechos lignocelulósicos están constituidos, por los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, y lignina. Siendo de 40% a 60%, 15% a 50%, 10% a 30% respectivamente, dependiendo del tipo de vegetal, del tejido y edad del mismo. La celulosa es un polisacárido de alto peso molecular formado por unidades de glucosa con uniones 1-4- β -glucosídicas, en conformación de silla y los grupos hidróxilo en la posición ecuatorial estable. La molécula es alargada, plana y sin ramificaciones. La celulosa es poco soluble en la mayoría de los disolventes, con excepción de los ácidos minerales concentrados que causan rápidamente su despolimerización y es higroscópica, ya que absorbe agua hinchándose, pero no se disuelve. Las propiedades tan especiales de la celulosa se deben a la asociación de racimos de microfibrillas unidas paralelamente en una forma muy ordenada. La madera es la fuente más importante de celulosa y el algodón su forma comercial más pura. La hemicelulosa es insoluble en agua pero soluble en álcalis y se encuentra asociada a la celulosa, polímeros y pectinas que son polisacáridos que contienen arabinosa, galactosa y ácido galacturónico que actúa como un importante material de cementación entre dos células, formando grandes cadenas

a través de enlaces B-D-(1-4). (Conn y Stumpf, 1976; Devlin, 1980; Badui, 1984). Así mismo se encuentra constituida por un grupo de polisacáridos no tan homogéneo como el de la celulosa, a saber: xilenos, beta-mananos, galactanos y L-arabinanos. La lignina es un polímero estructural de las plantas vasculares formada por unidades fenólicas que proporcionan a la planta rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad del agua a través de las paredes celulares y protege a las células de invasiones de microorganismos (Leal, 1985).

Una pared celular típica de un tejido vegetal está constituida por una laminilla media, una pared primaria y otra secundaria. En la laminilla media se encuentra casi toda la lignina y su proporción disminuye conforme se acerca al lumen; la pared secundaria contiene muy poca lignina y se encuentra formada por polisacáridos. A cada capa de la pared secundaria se adhieren la celulosa en cantidades mínimas de otros constituyentes, formando estructuras longitudinales llamadas microfibrillas, dentro de cada una se encuentran las moléculas lineales de celulosa unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals. Los grados de ordenamiento de las moléculas de celulosa difieren, cuando están altamente ordenadas se les conoce como cristalinas; mientras que las regiones con menor grado de ordenamiento se denominan amorfas. Dentro de la pared secundaria, la lignina está

concentrada en los espacios localizados entre las microfibrillas y en las regiones amorfas, entre cristales de celulosa. Se sugiere que la asociación de la celulosa con la lignina es en gran parte física, formando un sistema de entrecruzamiento de polímeros. Esta íntima asociación física se considera responsable de su resistencia a la degradación biológica. En las regiones amorfas entre cristales de celulosa, se encuentran también hemicelulosas, minerales y otros materiales como grasas, aceites, resinas entre otros (Cowling, 1961; Gilbert y Tsao, 1983).

Aunque los desechos lignocelulósicos pueden ser utilizados como fuente de energía por los rumiantes, la lignina presente en los desechos vegetales impide que se utilicen como forrajes; su digestibilidad disminuye conforme aumenta el contenido de lignina, por lo que este polímero no solo representa una fuente de carbono orgánico considerable sino que controla la degradación de gran parte de los polisacáridos vegetales (Leal, 1985). Por lo que las investigaciones realizadas en este campo se han inclinado por la elaboración de técnicas de pretratamientos que degraden la lignina y permitan la utilización de los desechos lignocelulósicos. Es así que la conversión de celulosa a glucosa puede ser llevada a cabo por hidrólisis, cuyo producto puede ser colocado en una variedad de procesos como fuente alimentadora de fermentación; ahora, hay varios procesos de hidrólisis disponibles: la hidrólisis

enzimática que consta de varias técnicas para el pretratamiento del material celulósico, como lo son: por molienda, irradiación, tratamiento alcalino y tratamiento con dióxido de azufre. La hidrólisis ácida que consiste en la utilización de ácido sulfúrico al 1% a altas temperaturas dentro de un reactor de flujo continuo (Kosaric et al., 1980).

II.- ANTECEDENTES

La actividad celulolítica por los organismos del rumen fue detectada a fines del siglo pasado. Tappeiner en 1888, fué el primero en investigar el destino de la celulosa en los rumiantes, encontró que la pulpa de papel y el algodón cuando se encuentran en condiciones anaerobias, con el fluido del rumen se disuelven despacio. (Marston, 1947).

El rumen del ganado vacuno es un gran tanque de fermentación cuya capacidad oscila entre 110 y 220 litros, según el tamaño del animal, los materiales vegetales ingeridos por la vaca son degradados en el rumen por una amplia y diversa población de bacterias y protozoos. La celulosa que el hombre no puede digerir es fácilmente degradada en el rumen, y los productos resultantes - acetatos, butiratos y propionatos - son metabolitos fundamentales en la economía metabólica de los bóvidos (Patton, 1969).

La digestión de la celulosa por microorganismos del rumen, es un proceso estrictamente anaeróbico, caracterizado por una concentración activa de celulosa en el medio. Las celulasas bacteriales son primeramente absorbidas sobre el sustrato de la celulosa o son confinadas a las membranas de las bacterias celulolíticas que atacan al contacto de la superficie de la celulosa. La molienda incrementa la suceptibilidad de degradación ambas regiones, amorfa y cristalina, de la celulosa reflejándose posteriormente en

una mayor hidrólisis enzimática (Lin et al, 1985).

Hungate en 1950, logra el crecimiento de bacterias funcionales del rumen en cultivos puros mediante el empleo de medios similares en composición al ambiente ruminal, esto es, medio-habitat estimulantes. Luego, en 1960, utiliza el fluido del rumen como componente nutritivo para el cultivo y acoplamiento de las bacterias del rumen. (Hungate, 1966).

Los medios usados para el cultivo de bacterias ruminales son a menudo suplementados con fluido ruminal clarificado como fuente no específica de una variedad de nutrientes requeridos por estos organismos. Un ejemplo de nutrientes identificados en el fluido del rumen incluye a la hemina y a varios ácidos grasos volátiles para el crecimiento de muchas de las bacterias del rumen. (Stack y Cotta, 1986).

Los medios de cultivo de Hungate contienen agar y minerales, incluyendo iones amonio y bicarbonato, de forma que puede obtenerse una fase gaseosa de CO_2 a pH de 6.7. La celulosa finamente dispersa se agrega como fuente energética y el potencial óxido-reductor se mantiene bajo añadiendo pequeñas cantidades de agentes como la cisteína. (Bryant, 1981).

Utilizando la técnica de separación de bacterias para analizar los tipos y números de especies que atacan los sólidos de la digesta del rumen del ganado vacuno, nueve de las cepas representativas de las bacterias aisladas del

contenido ruminal fueron tentativamente seleccionadas, de las cuales siete de estas: *Eubacterium* sp., *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* y *Cellulomonas simi*, son bacterias celulolíticas. (Minato et al., 1966). *R. flavefaciens*, *B. succinogenes*, son dos de las tres especies mayores que atacan a la celulosa. (Scheinfinger y Wolin, 1973).

Las cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* requirieron de 21 a 71 días para producir degradación visible de papel filtro intacto mientras que las cepas de *R. albus* lo degradaron en un periodo de 1 a 8 días. (Teather y Wood, 1982).

Varel y Jung, (1986) utilizan cepas de *B. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* y *B. fibrisolvens* para determinar el efecto del ácido cinámico y la vanilina sobre la digestión de celulosa y el xileno. Para llevar a cabo esto, usaron el método de cultivo anaeróbico de Hungate modificado por Bryant, en donde el fluido del rumen fue colectado y filtrado por medio de cuatro capas de saco para queso agregándolo al medio como fuente de inóculo.

Oshio et al, (1987) realizan un estudio sobre la abundancia de bacterias ruminales, ensayando dos tipos de dietas (heno y cebada), utilizando el medio 98-5 y un periodo de incubación de 2 semanas, las bacterias fueron examinadas por su coloración al Gram, motilidad, pH final en caldo de azúcar al 1%, producción de ácidos orgánicos a partir de

maltosa, celobiosa, xilosa y glucosa, producción de H_2S , hidrólisis de almidón y celulosa. El conteo total máximo de bacterias fue de $3 \times 10^{10}/ml$ y el valor más bajo fue de $1 \times 10^{10}/ml$. La misma tendencia apareció en los conteos totales viables, cuando fue utilizado el medio 98.5.

La cuenta total y composición genérica de ciliados del rumen así como la microflora en muestras del rumen fue clasificada y enumerada de acuerdo al método microscópico directo, el cual agrupa los números de microorganismos en base a la tinción Gram, forma y tamaño. La microflora dominante en muestras ruminales fueron: cocos gram negativos ($0.3-1.0\mu m$); cocos gram positivos ($0.5-1.1\mu m$), pequeños bacilos gram negativos ($0.35-0.7 \times 0.9-2.0\mu m$), bacilos de tamaño mediano ($0.7-0.9 \times 1.2-3.0\mu m$) y bacilos pequeños gram positivos ($0.45-0.65 \times 0.65-1.2\mu m$). (Sakauchi y Hoshino, 1981).

El número total de bacterias por unidad de peso ó volumen, tal como se determina por los estudios de microscopia directa, se encuentran comprendidos entre los límites de 8×10^{10} a $15 \times 10^{10}/ml$, y varía dependiendo de la naturaleza de la dieta, el régimen de alimentación, del tiempo que ha pasado desde la ingestión de alimentos, del animal que se trate y de la presencia ó ausencia de protozoarios. (Sakauchi y Hoshino, 1981).

Smith et al, (1973) estudian los factores que influyen la digestión enzimática de celulosa molida

utilizando varias cepas de *R. albus*. El papel filtro molido la celulosa cristalina húmeda de algodón y la celulosa cristalina seca (sigmacel) fueron digeridas, pero decreciendo en rapidez, respectivamente. La enzima de esta especie se mostró activa en un rango de pH 6.0 a 6.8 y con una rápida digestión de celulosa a los 45°C.

Todas las bacterias celulolíticas ruminales son igual de sensibles a pequeñas bajas en el pH, y un bajo pH ruminal puede ser un factor crítico que limita la digestión de celulosa manteniendo a la vaca bajo alimentación comercial. La utilización de celulosa o celobiosa por *B. succinogenes* 585 fue severamente inhibida con valores de $\text{pH} < 5.7$.

La temperatura tiene gran efecto en el ataque de las bacterias a la celulosa, pues se ha visto que conforme se incrementa la temperatura, aumenta el número de bacterias que atacan a la celulosa, observándose una actividad óptima a los 38°C. Algunas de las especies que lo hacen son: *B. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus*. Otro de los factores que influyen en la habilidad para degradar los substratos sólidos como la celulosa, se supone que es la localización de las bacterias en el rumen. (Minato y Suto, 1981).

Se ha encontrado que las proporciones en los componentes que se utilizan en los medios de cultivo para bacterias ruminales son las siguientes: concentración del

fluido del rumen es de 30% (v/v), de los agentes reductores de 0.025% (w/v) como la cisteína hidratada y de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ de 0.025% (w/v). Los azúcares, vitaminas y agentes reductores fueron esterilizados por filtración y el resto de los ingredientes fueron esterilizados en autoclave a $121^\circ\text{C}/15\text{min}$. La turbidez del cultivo se determinó por turbidimetría a 640 nm. Donde la absorbancia fue directamente proporcional a la concentración celular (Marounek y Wallace, 1984).

Sinha y Ranganathan (1983) hacen un estudio sobre la distribución en porcentaje en rumen de búfalo de *R. albus* y *R. faveflaciens* encontrando que: cuando se consideraban juntos, el porcentaje fue de 59.8%; de *B. succinogenes* 19.2%; de *B. fibrisolvens* 11.1% y de *Clostridium locheadii* el 3.8%. Los tipos no identificados comprendieron un 4.7% del total de bacterias aisladas.

Posteriormente, Hespell et al., (1987) realizaron un trabajo sobre bacterias celulolíticas del rumen, encontrando que de todas las especies descritas *B. fibrisolvens*, *R. faveflaciens*, *Succinivibrio dextrinosolvens* y *Selenomonas ruminantium* las cuales existen en el ambiente natural, probablemente actúan sinergeticamente para degradar polisacáridos en células vegetales en base a los estudios con cultivos de especies puras mezcladas. El crecimiento en el cultivo fue seguido por mediciones de la densidad óptica a 660 nm. Las concentraciones de hexosas fueron determinadas

por el método del ácido sulfúrico-fenol, utilizando glucosa como estándar.

EL crecimiento de bacterias celulolíticas en medios de celobiosa fue seguido a través de mediciones de densidad óptica a 660 nm. La utilización de celulosa fue medida por la remoción de pequeñas muestras a partir de cultivos conteniendo celulosa a varios tiempos, con una determinación subsecuente de carbohidratos residuales por medio de la técnica de antrona, (Stack y Cotta, 1986).

El uso del rojo congo como un indicador para la degradación de β -D- glucosa en un medio agar, tiene las bases para un rápido y sensible ensayo para bacterias celulolíticas. El método es rapidamente adaptable para cualquier conteo directo de organismos celulolíticos viables, usando tubos de ensayo, ó para la caracterización de gran número de aislados, usando técnica de placas por duplicado. (Teather y Wood, 1982).

El crecimiento de microorganismos en laboratorio sobre la celulosa depende de la naturaleza del substrato, así, mientras que el crecimiento de microorganismos sobre celulosa natural es poco denso, el crecimiento en celulosa pretratada es abundante, de ahí que el pretratamiento del substrato para la fermentación microbial es importante. Los substratos generalmente utilizados como prueba para la mayoría de los experimentos son: la paja de arroz, el bagazo de caña de azúcar, celulosa de madera purificada, papel

filtro y papel impresor de computadora. (Han y Callihan, 1974).

La celulasa es un sistema único en el cual varias enzimas se activan juntas para llevar a cabo la hidrólisis de celulosa, la cual ni una de ellas, puede realizar, activándose por sí solas (separadamente). Por lo que muchos estudios parecen continuar sobre la separación y caracterización de las celulasas de varios microorganismos, encontrando un punto crítico para un proceso enzimático que convierta los substratos celulósicos a azúcares fermentables: la disponibilidad del substrato conveniente, el pretratamiento y el requerimiento alto de enzimas (Mandel, 1982).

Entonces, las consideraciones sobre el substrato a utilizar deben ser: disponible en cantidades grandes a través del año, fácil de coleccionar, alto en contenido de celulosa y que requiera poco o ningún tratamiento. A este respecto se ha encontrado que el pretratamiento físico como la molienda húmeda utilizada durante la sacarificación mejora la acción de la celulasa. Descubriéndose que la digestibilidad de la celulosa molida esta directamente relacionada con el tiempo de molienda (Kosaric et al., 1980).

Un motivo para el fracaso en el desarrollo de tecnología adecuada para el aprovechamiento de desperdicios agrícolas, lo constituye el enfoque unilateral con que se ha

atacado el problema. La íntima asociación de la lignina con la celulosa, representa el obstáculo más severo para el desarrollo exitoso de procesos para la utilización de desperdicios vegetales, ya que la digestibilidad disminuye conforme aumenta el contenido de lignina. En consecuencia la llave que dará acceso a estos recursos es el desarrollo de un proceso que permita la degradación selectiva de la lignina, el cual, dada la ineficiencia y elevados costos de los procesos químicos, debería de ser de tipo microbiológico. (Leal, 1985).

Los métodos empleados hasta ahora en México para obtener productos de la fermentación a partir de desechos agrícolas son: fermentación sólida para forrajes enriquecidos con proteína, fermentación en cultivo sumergido para proteína de origen celular, sacarificación y fermentación alcohólica en una sola etapa. (De la Torre, 1985).

Este trabajo intenta ofrecer una alternativa más en la utilización de desechos lignocelulósicos, siendo el papel uno de los materiales más usuales en la vida diaria y el cual es desperdiciado en cantidades enormes.

III.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Habilitar la técnica para un cultivo microbiológico en condiciones óptimas de laboratorio, capaz de utilizar celulosa como única fuente de carbono, con el máximo rendimiento posible.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aumentar la capacidad de degradación de celulosa de los microorganismos celulolíticos, en base a pretratamiento para facilitar el acceso de la enzima al sustrato.

Determinar el rendimiento porcentual de transformación global de celulosa a glucosa por el sistema, utilizando pruebas de cuantificación bioquímicas.

IV.- METODOLOGIA.

A.- RECOLECCION DE MUESTRAS.

Las muestras fueron tomadas de ganado vacuno recién sacrificado en el Rastro Municipal de Ensenada, B.C. Debido a que las bacterias celulolíticas se encuentran en el rumen, tanto en la digesta (alimento), como en las paredes dorsal y ventral se procedió a utilizar la técnica propuesta por Hungate (1966) que consiste en el raspado de las paredes del rumen con la boca de un matraz Erlenmeyer de 500 ml previamente esterilizado, esta técnica se complementó con la toma de muestra a partir de la digesta mediante el exprimido del alimento, captando el fluido ruminal en matraces Erlenmeyer de 500 ml previamente esterilizados.

Después de que los matraces fueron llenados totalmente por medio de ambas técnicas de recolección de muestra, se vació sobre la superficie del fluido ruminal una capa de aceite mineral.

Es importante señalar que el ganado muestreado fue alimentado con dietas de alimento concentrado.*

1.1 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.

El transporte de las muestras se llevó a cabo en bandejas de plástico y/o hielera, donde se colocaban las muestras y se cubrían con hielo, para bajar el metabolismo

* Com. per. Raúl Sanchez Z. veterinario encargado del rastro municipal.

de las bacterias durante el trayecto al laboratorio, transcurriendo un tiempo aproximado de 30 min., procediendo inmediatamente al tratamiento de las muestras.

B.- TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Las muestras se trabajaron de la siguiente manera:

1.1 FILTRADO.

El fluido ruminal fue filtrado a través de 2 capas de gasa por una de algodón por dos veces para eliminar el exceso de sólidos suspendidos en el fluido. Posteriormente el fluido ya filtrado fue sometido a burbujeo con CO_2 y fue almacenado a -4°C para usos posteriores.

1.2 CENTRIFUGADO.

A una parte del fluido previamente filtrado se sometió a centrifugación en una centrifuga (IEC HN-SII) a 15000 rpm (25 000 g) durante 20 min. para clarificarlo.

C.- TRATAMIENTO DEL PAPEL.

Se utilizó papel whatman No.1, el cual fue suspendido en exceso de agua destilada permaneciendo en reposo 48 hrs. Transcurrido ese tiempo el papel fue sometido a calentamiento hasta ebullición y posteriormente a maceración en una licuadora, repitiendo calentamiento y licuación consecutivamente hasta lograr una pasta homogénea, donde el papel se mantiene finamente disperso. El papel fue agregado a los medios de cultivo con un 81.9% de humedad.

D.- OBTENCION DE CEPAS CELULOLITICAS.

I ETAPA.

Se utilizó el medio celulosa de Hungate (1966) el cual consiste en una mezcla de sales minerales, cisteína, fluido ruminal tratado y la fuente de carbono (apendice I), la cual fue sustituida por papel filtro Whatman No.1 en tiras de 1x5 cm por cada tubo de ensayo que contenía 10 ml (aprox.) de medio de cultivo por 1 ml de inóculo. Mientras que para medios sólidos fue utilizada solo una asada, tomada a partir del fluido filtrado, colocando las tiras de papel sobre la superficie del medio. El pH fue ajustado a 7 ± 0.2 . Posteriormente, tanto los tubos como las cajas ya inoculadas se introdujeron en jarras de anaerobiosis GAS-PAK, utilizando el indicador de anaerobiosis modificado de Smith (apendice II), además de utilizar la técnica de la vela para el consumo de oxígeno presente dentro de la jarra. Los medios se incubaron a una temperatura de 38°C a 40°C durante un periodo de tiempo que oscilaba entre los 21 y 30 días.

II ETAPA.

El medio de cultivo utilizado durante esta etapa fue el 98.5 según Bryant y Robinson (1961), el cual consiste en una mezcla de soluciones minerales, fluido ruminal tratado, cisteína, un agente reductor y una combinación de fuentes de carbono (apendice III), las cuales fueron sustituidos por papel filtro Whatman No.1 previamente tratado en una cantidad equivalente a la mezcla de carbohidratos. El pH fue ajustado a 7 ± 0.2 con un potenciómetro el periodo de incubación fue de 10 a 15 días en una estufa (Precision

Mechanical convention) a una temperatura de 38°C a 40°C.

E.- AISLAMIENTO.

El aislamiento se llevó a cabo usando el medio 98.5 mediante resiembras sucesivas, utilizando la técnica de estriado en placas para la separación de las colonias aparentemente diferentes. Utilizando como criterios de separación las características de las colonias, tales como: color, forma, borde, textura y elevación.

Las colonias que eran consideradas diferentes se resembraban en el mismo medio de cultivo hasta obtener un cultivo axénico.

F.- VERIFICACION DE BACTERIAS CELULOLITICAS AISLADAS.

Las colonias aisladas fueron cultivadas en medio sólido 98.5 mediante la técnica de picado por cuadrante en placa, las cuales fueron incubadas de 38°C a 40°C durante 15 días, para después utilizar la técnica del Rojo Congo (apendice IV) según Teather y Wood (1981) que se fundamenta en el cambio de color del rojo congo en las zonas de hidrólisis de celulosa.

G.- CARACTERIZACION DE LAS CEPAS CELULOLITICAS.

Esta etapa se realizó utilizando el Atlas of Rumen Microbiology de K. Ogimoto y S. Imai (1980) y Bergey's Manual of Determinative Bacteriology editado por R.E. Buchanan y N.E. Gibbons (1974), que consisten en:

G.1.- PRUEBAS BIOQUIMICAS.

A cada una de las colonias aisladas se les sometió a

reacciones bioquímicas específicas tales como:

1.1 ALMIDON HIDROLIZADO.

En el cual se utiliza el medio PY No.39 (apendice V), en el que se inocularon las colonias aisladas incubandose de 38°C a 40°C durante 15 días y tomando como reacción negativa la presencia de color azul-negro después de haber agregado solución de iodo.

1.2 GELATINA DIGERIDA.

Se inocularon cada uno de los aislamientos en el medio gelatina No.19 (apendice VI) incubando a temperatura ambiente durante 5 días, tomando como reacción positiva la presencia de zonas de licuefacción del medio de cultivo.

1.3 LECHE.

En esta prueba fue utilizado el medio leche No.34 (apendice VII) en el cual se inocularon las colonias aisladas, incubando de 38°C a 40°C en un lapso de tiempo de 5 días a 4 semanas, tomando como reacción positiva la coagulación de la leche.

1.4 PRODUCCION DE INDOL.

Se utilizó el medio CMC (carboximetilcelulosa) No.10 (apendice VIII) inoculando los aislamientos e incubando de 38°C a 40°C durante 15 días para finalmente realizar la prueba de Ehrlich (apendice VIII). La reacción positiva es la formación de un anillo rosa.

1.5 PRODUCCION DE H₂S.

El medio empleado fue el H₂S No.22 (apendice IX),

inoculando las colonias aisladas e incubándolas de 38°C y 40°C durante 15 días, tomando como reacción positiva la formación de color negro en el medio después de incubar.

1.6 REDUCCION DE NITRATO.

Se empleo Caldo de Nitrato (apendice X) en donde se inocularon los aislamientos bajo las mismas condiciones de cultivo anteriormente señaladas. Tomando como reacción positiva el desarrollo de un color rojo después de haber agregado a 1 ml de medio solución I y solución II (apendice X).

1.7 VOGES PROSKAUER (acetilmetilcarbinol - acetoina).

El medio de cultivo utilizado fue el PYG No.40 (apendice XI) sin resazurina en el cual se inocularon las colonias aisladas y se incubaron de 38°C a 40° C por dos días, tomando como reacción positiva la formación de un color rojo - naranja en 1 ml de medio después de agregar solución I y solución II (apendice XI).

1.8 CATALASA.

Se inocularon los aislamientos en medio EYA No.31 (apendice XII) en placa de 38°C a 40° C por 15 días, exponiendo al aire el crecimiento durante 30 min. y se agregó H_2O_2 , dando reacción positiva la producción de burbujas.

1.9 LECITINASAS.

Se utilizó el medio EYA No.31 (apendice XII) en el que se inocularon las colonias aisladas mediante la técnica de

estriado en placa e incubando de 38°C a 40°C durante 72 h. Tomando como reacción positiva el crecimiento de colonias sobre el medio.

1.10 COAGULASA.

Se inocularon los aislamientos en medio 98.5 (apendice III), incubandose durante tres horas de 38°C a 40°C adicionando posteriormente 2 gotas de suero extraido de sangre de vaca al caldo de cultivo. El aglutinamiento de suero fue tomada como reacción positiva coagulasa.

1.11 CRECIMIENTO EN BILIS.

Se empleo el medio PY No.39 (apendice V) agregando 1g de glucosa y 2 g de bilis liofilizada de buey. Se incubò de 38°C a 40°C por 15 dias tomando como prueba positiva la turbidez que indica crecimiento de organismos en el medio de cultivo.

G.2. DATOS MORFOLOGICOS.

Estos datos fueron tomados por microscopia directa, emplendo la técnica de Gram (apendice XIII), en donde se tomo en cuenta el tipo de organismo (bacilo, coco, cocobacilo entre otros). Características coloniales como: forma, elevación borde y textura; asi como la presencia de esporas (apendice XIV).

H.- CINETICA DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS CELULOLITICAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS.

Obtenidas las cepas celulolíticas aisladas y caracterizadas se procedió a obtener la cinética de

crecimiento preliminar, en las cuales se ensayaron diferentes tiempos de lectura para establecer el intervalo de tiempo adecuado y llevar a cabo las cinética de crecimiento definitiva las cuales se realizaron mediante la medición de la densidad óptica con el colorímetro (Spectronic 20) a 540 nm a diferentes intervalos de tiempo previamente establecidos (Cooney, 1980). Tomando como medio basal el medio 98.5 y manteniendo el cultivo a temperatura constante a 40°C en un baño metabólico (Water batch shaker mod. 406015), cuidando de que el cultivo permaneciera en condiciones de anaerobiosis, utilizando para este propósito un flujo semicontinuo de CO₂ el cual era recibido y lavado por una solución de NaOH al 20% y pirogalol al 40% en una relación de 10ml de NaOH:4ml de pirogalol (*Magaña, 1988), contenido en un frasco receptor con salidas a cada uno de los matraces kitasato de 500 ml que contenían el medio de cultivo inoculado con 5% de la cepa a cultivar.

Los datos arrojados fueron tratados mediante un análisis estadístico de regresión lineal para obtener el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento *Martinez (1988); Cooney (1980), dado por:

$$td = \log 2/u$$

donde u = tasa de crecimiento medio específico.

* Com. Pers. Ignacio Magaña P. investigador del CINVESTAV.

* Com. Pers. Jovita Martinez investigador del CINVESTAV.

I.- CUENTA VIABLE EN PLACA.

Con el fin de establecer una relación en número de bacterias con respecto al volumen se realizó la técnica de cuenta viable por placa (Cooney, 1980), inoculando la cepa problema a diferentes intervalos de tiempo y utilizando diferentes diluciones (10^{-2} a 10^{-6}) cada vez que la población se duplicaba (en base a la densidad óptica). Las cepas se sembraron en medio 98.5 sólido y utilizando 0.1 ml de inóculo por cada placa las cuales fueron incubadas de 38°C a 40°C por 7 días en jarras de anaerobiosis y/o frascos de vidrio de boca ancha utilizando el indicador de anaerobiosis de Smith, la técnica de la vela y alka-seltzer como productor de CO_2 . El conteo se realizó, en un contador de colonias Dark field Quebec modelo 3327. Los datos obtenidos fueron trabajados con la ecuación:

$$\# \text{bacterias/ml.} = (1/\text{dilución empleada})(\text{media del número de colonias})(1/\text{cantidad de inóculo}).$$

Los datos obtenidos mediante la técnica de cuenta viable fueron graficados con respecto al tiempo de incubación.

J.- PRUEBAS DE RENDIMIENTO.

Las pruebas de rendimiento se llevaron a cabo mediante la técnica de la antrona (apendice XV) para carbohidratos reductores a muestras de medio de cultivo en dos fases de crecimiento: en fase log y fase estacionaria.

La cuantificación de celulosa en sustrato utilizado y tratado (papel whatman No.1) se llevó a cabo utilizando la técnica propuesta por Enriquez (1977), (apendice XVI).

Se llevaron a cabo pruebas de actividad enzimática para determinar la diferencia de dicha actividad, utilizando papel tratado y no tratado, para cada una de las especies; empleando la técnica propuesta por Enriquez (1977), (apendice XVII).

K.- ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizaron una serie de análisis estadísticos para la confiabilidad de los resultados obtenidos para cada una de las pruebas, utilizando para este efecto: regresión lineal para las curvas de crecimiento y la t de student para las pruebas de rendimiento (Zar, 1974).

V.- RESULTADOS.

En este trabajo se logró habilitar el medio de cultivo de la siguiente manera:

El tratamiento efectuado para el sustrato utilizado como fuente de carbono (papel filtro whatman No.1) disminuyó el tiempo de incubación para obtener crecimiento de bacterias celulolíticas ruminales de 30 días a un periodo de 15 a 21 días como máximo, utilizando el medio celulosa de Hungate (1966). Posteriormente, fue utilizado el medio 98.5 Bryant y Robinson (1961), con el cual disminuyó aún mas el periodo de incubación a un lapso de tiempo de 10 a 15 días como máximo a 40°C.

Utilizando el medio 98.5 se logró obtener 26 aislamientos con actividad celulolítica aparentemente diferentes en base a características coloniales, tinción Gram y tinción de esporas. En la tabla I se expresan los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas practicadas a los aislamientos; en la cual se asigna: (+) cuando la reacción es positiva, (-) cuando la reacción es negativa y un signo (+-) cuando en las pruebas de corroboración los aislamientos presentaron ambas reacciones.

Con la agrupación de cepas iguales con respecto a las características antes mencionadas, tomando en cuenta tanto las pruebas bioquímicas como las morfológicas, se obtuvieron cuatro especies posibles: *Clostridium clostridiiforme* a quien correspondio 11.53% del total de los aislamientos;

TABLA I.- Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas con respecto a los 26 aislamientos con actividad celulolíticas.

Aislamiento	Almidón	Gelatina	Leche	Indol	H ₂ S	NO ₃	Acetoin	Catalasa	Lecitinas	Coagulasa	Bilis
1	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4	-	+	-+	-	+	+	-	+	+	+	+
5	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
6	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
7	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
9	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
11	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
12	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
13	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
14	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
15	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
16	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
17	+	+	+	-+	+	+	-	+	+	+	+
18	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
19	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
20	-	+	+	+	-+	+	-	+	+	-	+
21	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
23	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
24	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
25	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
26	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

Selenomonas ruminantium con 61.53%, *Eubacterium ruminantium* con 3.84% y *Lachnospira multiparis* con 3.84% de los aislamientos logrados y un 19.23% que corresponde a 5 aislamientos de los 26 realizados que no fueron identificados, pero que pertenecen a los grupos de cocos, estreptococos y cocobacilos Gram negativos. Las cuatro cepas identificadas dieron positiva la prueba del rojo congo que confirmó la actividad celulolítica de estas especies.

Se obtuvo la cinética de crecimiento graficando densidad optica (absorbancia) contra tiempo para cada una de las especies, donde *Selenomonas ruminantium* mostró tener un tiempo de duplicación (td) igual a 4.52 Hrs. y una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.152 h^{-1} y un comportamiento exponencial entre las 7 y 10 hrs. de incubación, (figura 1), en esta misma figura se expresa el comportamiento de esta especie utilizando como substrato carboximetilcelulosa (CMC), observandose una diferencia en el tiempo de duplicación (td) de 6.12 Hrs. y una velocidad específica de crecimiento de 0.11 hr.^{-1} en comparación con el crecimiento presentado utilizando papel filtro tratado.

En la figura 2 se observa el crecimiento de *Clostridium clostridiiforme* con un tiempo de duplicación (td) de 4.36 Hrs ; una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.158 h^{-1} y cuya fase exponencial que se encuentra entre las 7 y 10 hrs. de incubación; mientras que el crecimiento en CMC arrojó un tiempo de duplicación (td) igual a 6.48 Hrs. y una

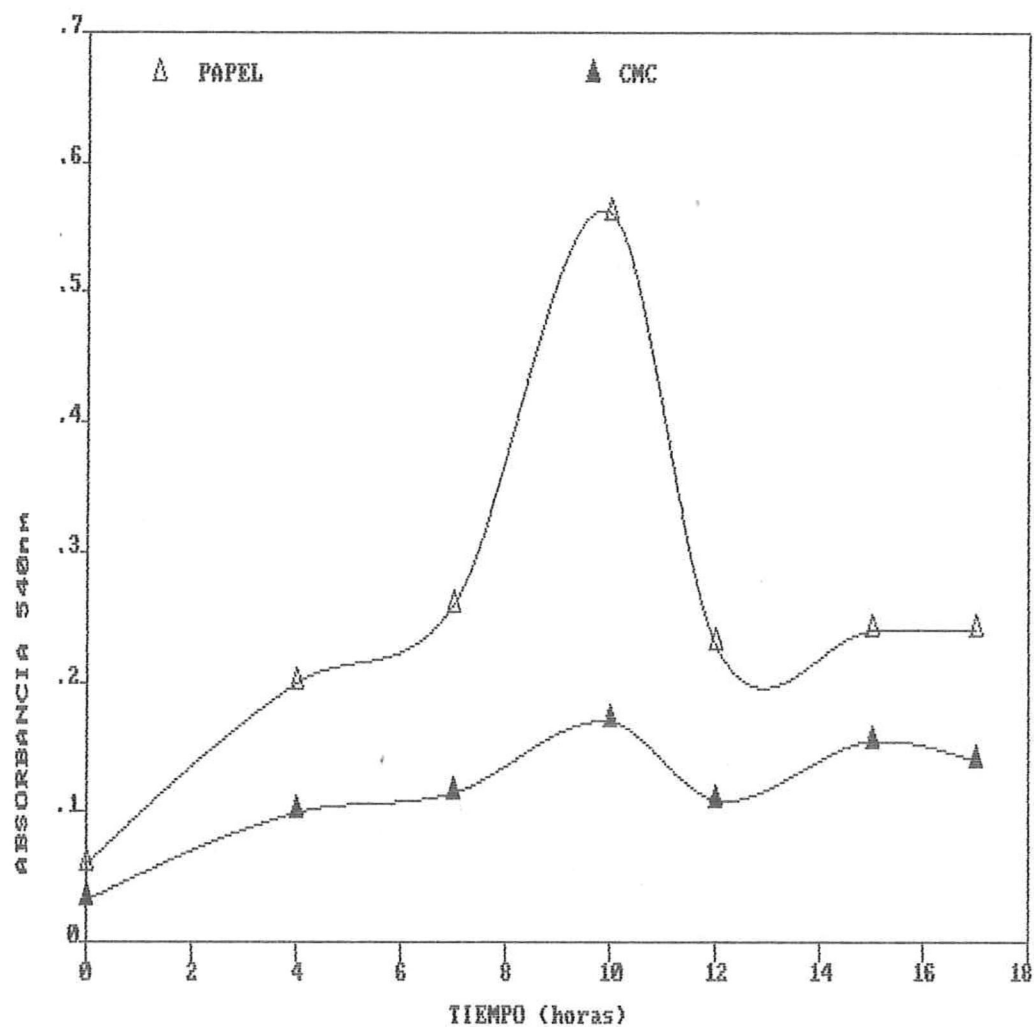


Figura 1.- Cinética de crecimiento correspondiente a *Selenomonas ruminantium* utilizando dos fuentes de carbono: papel y carboximetilcelulosa (CMC).

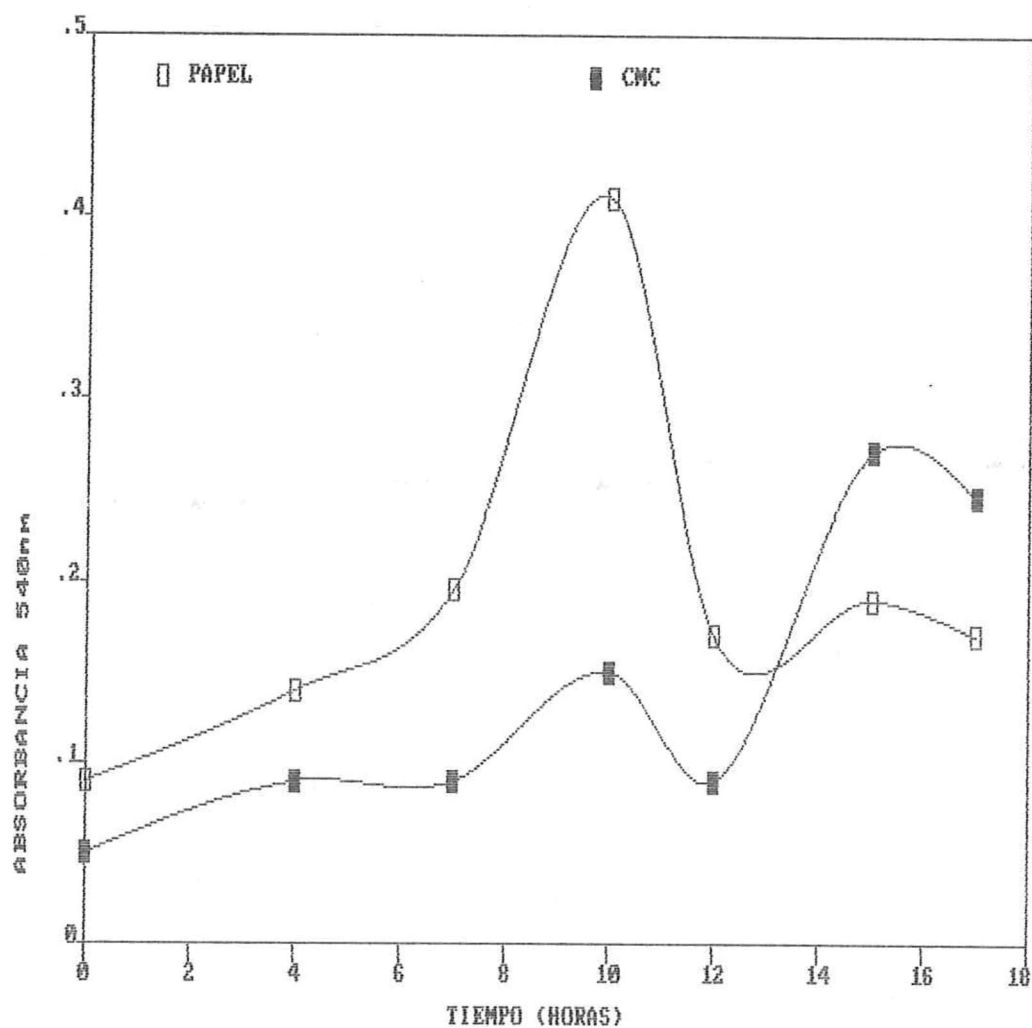


Figura 2.- Cinética de crecimiento de *Clostridium clostridiiforme*, utilizando dos fuentes de carbono: carboximetilcelulosa (CMC) y papel.

velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.1 h^{-1}

Así mismo en la figura 3, *Eubacterium ruminantium* presenta un tiempo de duplicación (t_d) de 2.76 Hrs. y una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.25 h^{-1} utilizando como sustrato papel filtro tratado y su fase exponencial se expresó entre las 7 y 10 hrs de incubación; mientras que en CMC tuvo un tiempo de duplicación de 6.52 Hrs. y una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.10 h^{-1}

Lachnospira multiparis tuvo un tiempo de duplicación (t_d) de 4.01 Hrs., una velocidad específica de crecimiento de 0.17 h^{-1} y una fase exponencial entre las 4 y 10 hrs utilizando papel filtro tratado como fuente de carbono; mientras que empleando CMC mostró tener un tiempo de duplicación (t_d) igual a 6.52 Hrs. y una velocidad específica de crecimiento (μ) igual a 0.107 h^{-1} (figura, 4).

En la figura 5 se muestra la comparación de la cinética de crecimiento de las cuatro especies, cuando fue utilizado papel como fuente de carbono; donde se observa que *C. clostridiiforme* muestra el mayor número de bacterias por mililitro. Mientras que en la figura 6, se encuentra representado el comportamiento en el crecimiento de las cuatro especies, cuando fue empleada (CMC) como fuente de carbono, observándose que *E. ruminantium* presenta el mayor número de bacterias por mililitro.

El análisis realizado al papel filtro para obtener el

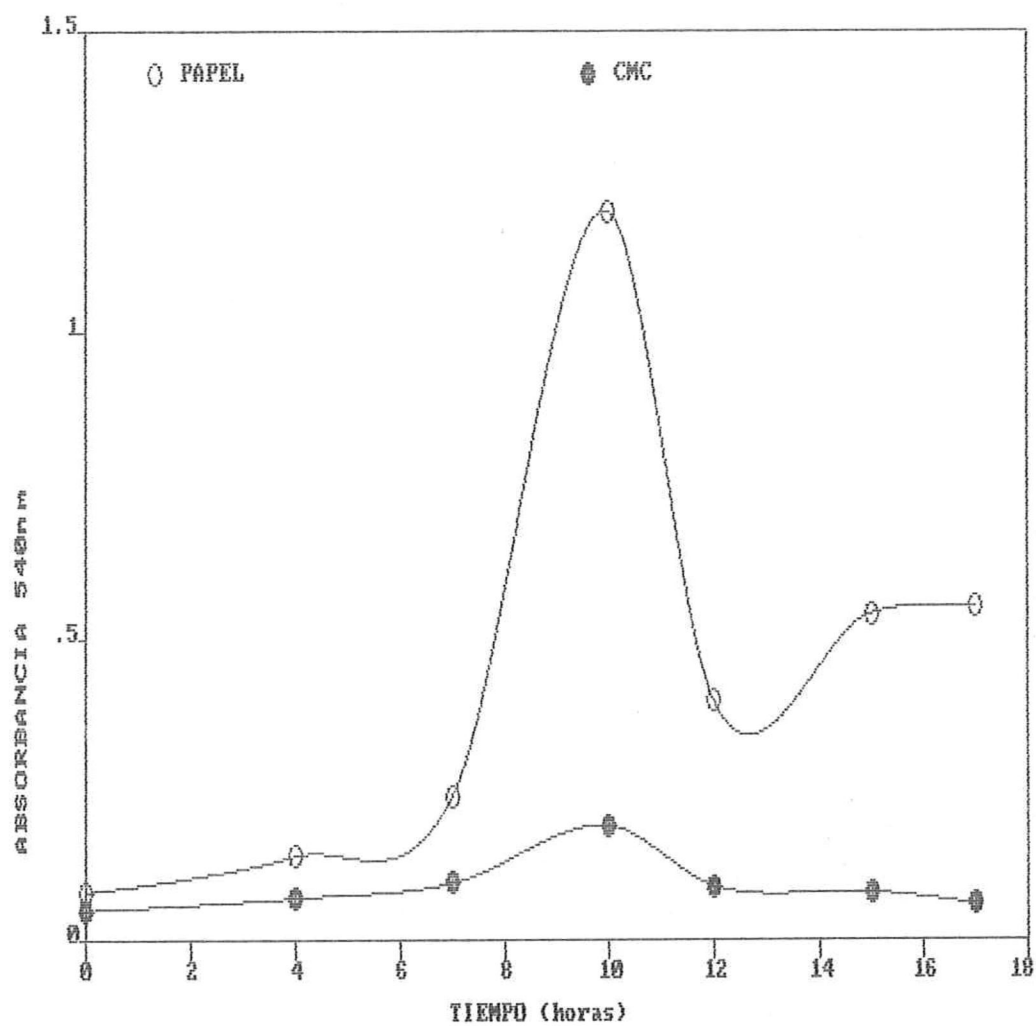


Figura 3.- Cinética de crecimiento de *Eubacterium ruminantium*, utilizando dos fuentes de carbono: papel filtro y carboximetilcelulosa (CMC).

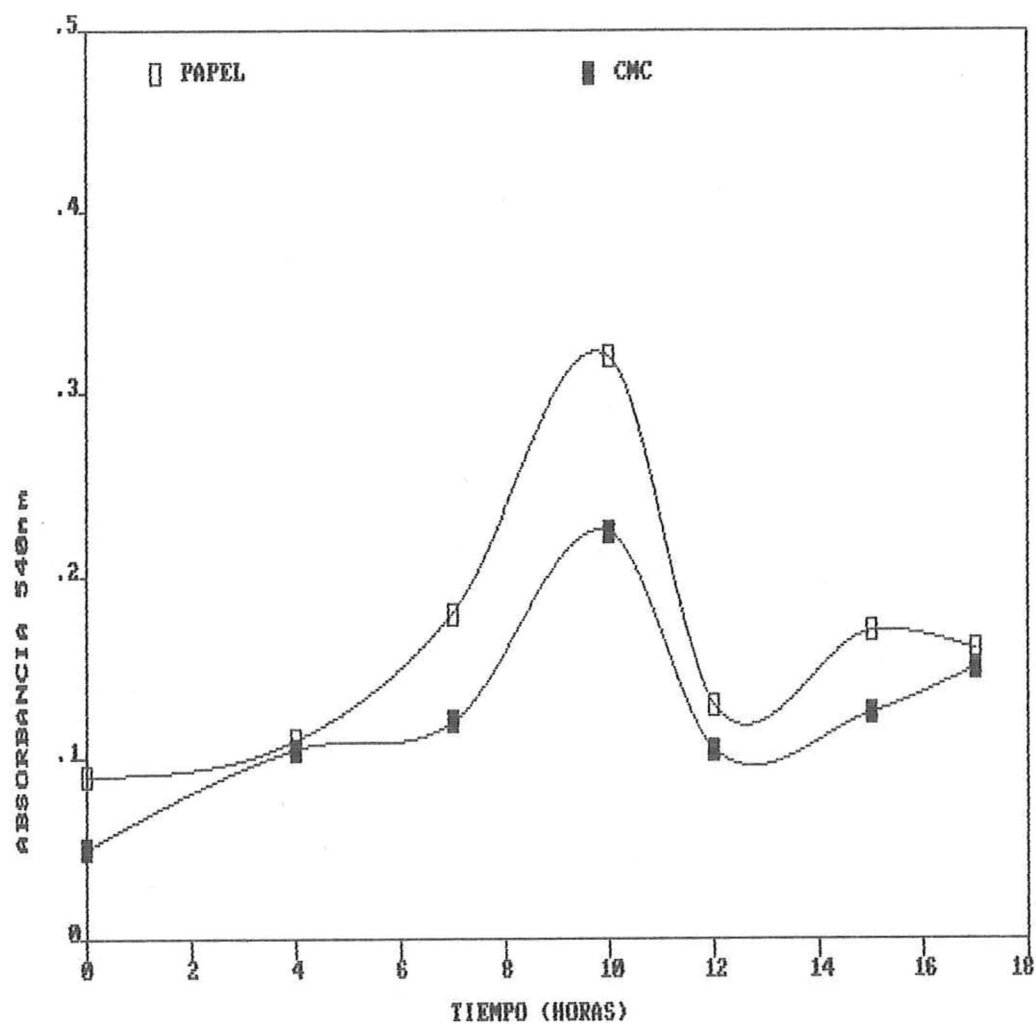


Figura 4.- Cinética de crecimiento de *Lachnospira multiparis*, utilizando dos fuentes de carbono: carboximetilcelulosa (CMC) y papel.

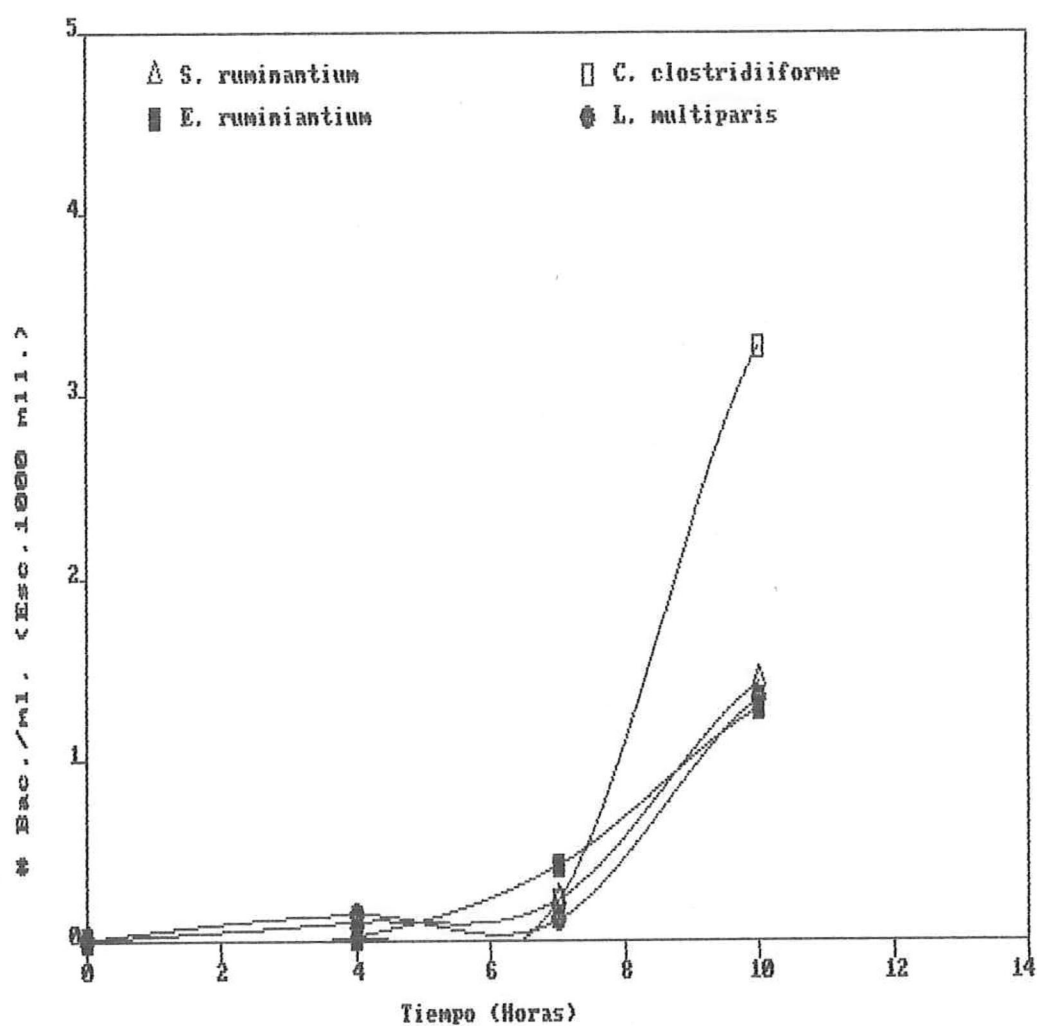


Figura 5.-Comparación del comportamiento en el crecimiento de las cuatro especies, cuando fue utilizado como fuente de carbono papel filtro.

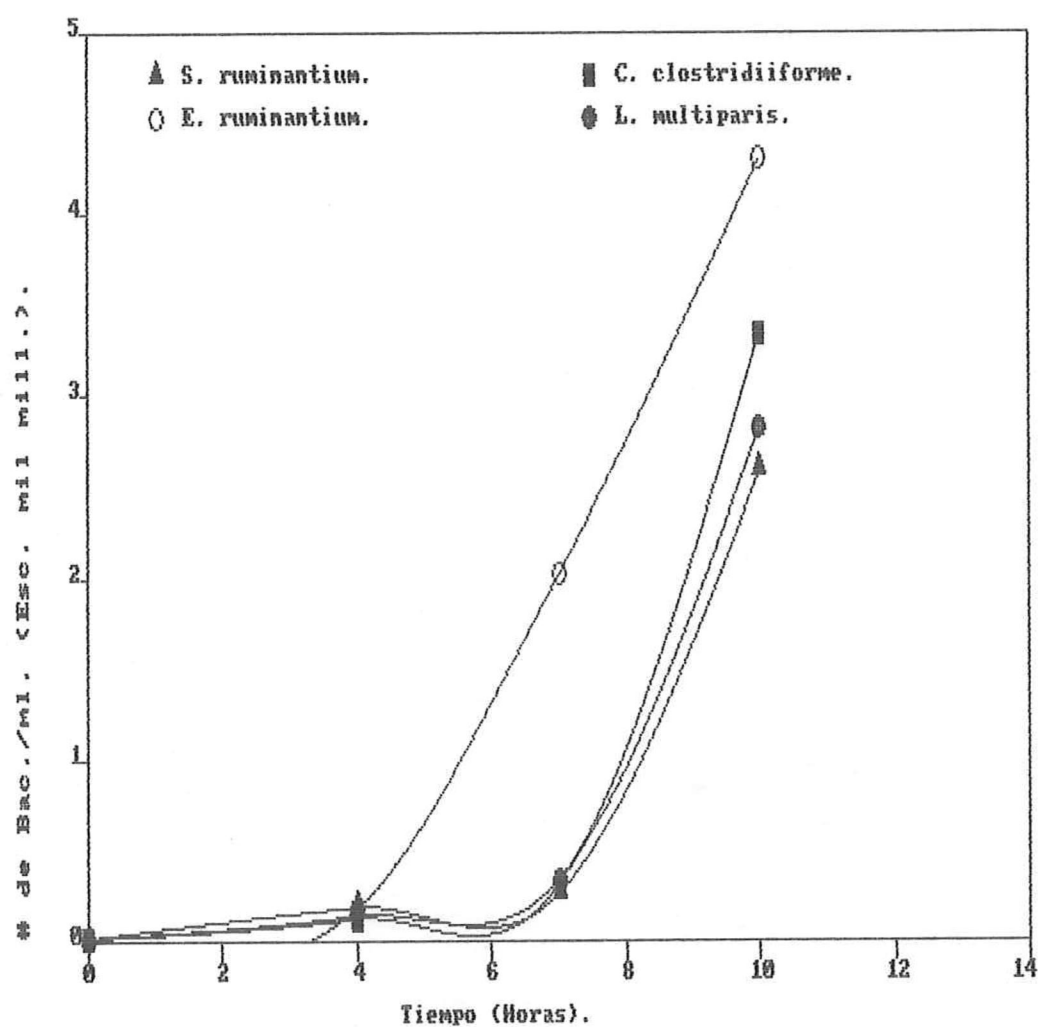


Figura 6.-Comparación del comportamiento en el crecimiento de las cuatro especies, cuando fue utilizada como fuente de carbono CMC.

contenido de celulosa arrojó un 76.36%.

Mediante el tratamiento aplicado al papel filtro, se obtuvo una reducción en el tiempo de incubación. Mientras que las pruebas de actividad enzimática realizadas para cada una de las especies arrojan un aumento en dicha actividad cuando se empleó el papel filtro tratado, esto fue confirmado mediante la prueba *t* de student con un 95% de confiabilidad (tabla II).

El rendimiento porcentual de transformación global de celulosa a glucosa se muestran en la tabla III, donde las especies están divididas por números romanos; correspondiendo el (I) a la especie cultivada en papel filtro tratado. Mientras que el (II) representa a las especies que fueron cultivadas utilizando como fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC), durante la fase logarítmica o exponencial de crecimiento. Haciendo referencia al número de bacterias por mililitro, dato obtenido mediante la técnica de cuenta viable por placa. En donde *Eubacterium ruminantium* y *Clostridium clostridiiforme* muestran el rendimiento porcentual mayor con diferencia en el número de bacterias por mililitro; siendo *E. ruminantium* significativamente más efectivo, en medio 98.5 conteniendo papel como sustrato. Por otro lado, tenemos que en medio 98.5 con CMC como sustrato *E. ruminantium* y *Lachnospira multiparis* arrojan el rendimiento porcentual mayor con diferencia en el número de bacterias por

Tabla II.-Actividad Enzimática detectada en los dos grupos de sustrato en las especies consideradas, mostrando el análisis con t de student a un nivel de 5% de significancia.

NOMBRE DE LA ESPECIE	Actividad en 1 ml de extracto enzimático a 45°C por 5 min.		
	mg/100 glucosa		Ho: $X \leq X_1$
			Ha: $X \geq X_1$
	papel tratado	papel no tratado	según t student
<i>Selenomonas ruminantium</i>	2.87	0.02	Ho rechazada
<i>Clostridium clostridiiforme</i>	1.43	0.95	Ho rechazada
<i>Eubacterium ruminantium</i>	1.23	1.02	Ho rechazada
<i>Lachnospira multiparis</i>	1.94	1.23	Ho rechazada

Tabla III.- Rendimiento porcentual de celulosa a glucosa arrojado por cada una de las especies, durante la fase exponencial de crecimiento.

nombre de la especie	glucosa mg/100	rendimiento (%)	# Bact/ml
Selenomonas ruminantium (I)	64	56.14	1.4×10^9
Selenomonas ruminantium (II)	42	36.84	2.5×10^9
Eubacterium ruminantium (I)	68	59.64	1.2×10^9
Eubacterium ruminantium (II)	68	59.64	4.3×10^9
Clostridium clostridiiforme (I)	68	59.64	3.2×10^9
Clostridium clostridiiforme (II)	56	49.12	3.3×10^9
Lachnospira multiparis (I)	56	49.12	1.3×10^9
Lachnospira multiparis (II)	60	52.63	2.8×10^9

(I) Especie cultivada en papel filtro.

(II) Especie cultivada en carboximetilcelulosa (CMC).

mililitro; donde *L. multiparis* es más efectiva en cuanto a la producción de miligramos por ciento de glucosa, con una confiabilidad del 95% según la prueba de t de student.

En la tabla IV, se encuentra expresado el rendimiento porcentual de transformación global de celulosa a glucosa, siguiendo la misma nomenclatura, con la diferencia de que estas pruebas se realizaron durante la fase estacionaria de crecimiento para cada una de las especies. Donde *Selenomonas ruminantium* y *Clostridium clostridiiforme* muestran el mayor porcentaje de rendimiento siendo significativamente más efectivo en esta fase *S. ruminantium*. Mientras que en medio 98.5 con CMC como substrato, las cuatro especies muestran un elevado porcentaje de rendimiento, sin embargo, considerando el número de bacterias por mililitro es *S. ruminantium* la más efectiva en la producción de miligramos por ciento de glucosa con un 95% de confiabilidad.

Tabla IV.- Rendimiento porcentual global de transformación de celulosa a glucosa, para cada una de las especies durante la fase estacionaria de crecimiento.

nombre de la especie	glucosa mg/100	rendimiento (%)	# Bact/ml
Selenomonas ruminantium (I)	60	52.63	0.83×10^7
Selenomonas ruminantium (II)	80	70.17	2.0×10^7
Eubacterium ruminantium (I)	50	43.85	1.7×10^7
Eubacterium ruminantium (II)	64	56.14	1.8×10^7
Clostridium clostridiiforme (I)	60	52.63	1.2×10^7
Clostridium clostridiiforme (II)	64	56.14	1.9×10^7
Lachnospira multiparis (I)	56	49.12	2.0×10^7
Lachnospira multiparis (II)	64	56.14	1.9×10^7

(I) Especie cultivada en papel filtro.

(II) Especie cultivada en carboximetilcelulosa (CMC).

VI.- DISCUSSION.

La disminución en el tiempo de incubación debida al tratamiento físico realizado a la fuente de carbono (papel filtro whatman No.1) concuerda con lo realizado por Han y Callihan (1974), Kosaric et al., (1980) y Teather y Wood (1982) quienes afirman que el pretratamiento es importante debido a que aumenta la digestión de celulosa, ya que la degradación microbial sobre substratos celulósicos depende fuertemente de la naturaleza del substrato, por lo que el crecimiento de los microorganismos sobre celulosa nativa es escaso, mientras que sobre celulosa desnaturalizada o pretratada es abundante. Por otra parte tenemos que Varel y Jung (1986), utilizaron el mismo substrato obteniendo un tiempo de incubación similar al reportado en este trabajo.

La habilitación del medio de cultivo mediante la utilización de dos etapas, fue debido a que el medio celulosa de Hungate (1966) es considerado como un medio de cultivo básico para el crecimiento y cultivo de bacterias celulóliticas ruminales, según: Hungate (1969), Bryant (1972) y Stack y Cotta (1986), quienes utilizan este medio de cultivo con pequeñas variaciones. Por otro lado tenemos que el medio 98.5 de Bryant y Robinson (1961), fue utilizado como un medio específico por Oshio et al, (1987) reportando un tiempo de incubación de 15 días a 38°C.

El aislamiento e identificación de bacterias celulóliticas ruminales en base a características

coloniales, tinción Gram, tinción de esporas y pruebas bioquímicas coincide con lo realizado por Oshio et al, (1987) quien logró aislar 25 colonias mediante las mismas técnicas. Mientras que Sakauchi y Hoshino (1981) caracterizaron 24 grupos de bacterias ruminales utilizando características morfológicas, tinción Gram, apariencia y tamaño. Por otra parte tenemos que Ogimoto e Imai, (1980) realizaron un Atlas de Microbiología del Rumen empleando pruebas bioquímicas, características morfológicas, tamaño, reacción al Gram, tinción de esporas, entre otras. Logrando identificar 30 especies de las cuales 18 son celulolíticas o celobiolíticas.

Las especies identificadas como bacterias celulolíticas ruminales, fueron: *Selenomonas ruminantium*, *Clostridium clostridiiforme*, *Eubacterium ruminantium* y *Lachnospira multiparis*. La predominancia de *S. ruminantium* en las cepas aisladas se debe a que esta especie es abundante en ganado alimentado con dieta de alimento concentrado (Hungate, 1966; Oshio et al., 1987), lo cual coincide con lo reportado en este trabajo, ya que las muestras tomadas fueron a partir de contenido ruminal alimentado con concentrados alimenticios.

Las cuatro especies aisladas e identificadas dieron positiva la prueba del rojo congo, la cual demuestra la actividad celulolítica de dichas especies (Teather y Wood, 1982), además de la confirmación de la actividad celulolítica por la observación de la pérdida visible de

celulosa (papel macerado) a medida que aumentaba el crecimiento, coincidiendo con los criterios de Hungate et al., (1964); Kistner y Gouws, (1964); Oshio et al., (1987). Sin embargo, varios autores como Bryant, (1961); Hungate, (1966) y Ogimoto e Imai, (1980) reportan a *Selenomonas ruminantium*, *Clostridium clostridiiforme*, *Eubacterium ruminantium* y *Lachnospira multiparis* como especies celobiolíticas y no celulolíticas. Mientras que Minato et al., (1966) y Hespell et al., (1987) reportan a *E. ruminantium* como una especie celulolítica y a *S. ruminantium* como una bacteria no celulolítica pero capaz de crecer sobre substratos celulósicos y degradarlos. Por lo que existe una discrepancia entre los diferentes autores respecto a la actividad celulolítica de estas especies.

Con respecto a la cinética de crecimiento de cada una de las bacterias celulolíticas ruminales aisladas e identificadas, tenemos que: Marounek y Wallace (1984), reportan una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.45 h^{-1} para *S. ruminantium* utilizando el medio de Hungate modificado, lo cual difiere con lo reportado en este trabajo para esta especie. Esto se puede deber a que el crecimiento microbial depende del tipo de medio de cultivo utilizado, así como de la fuente de carbono, pH, temperatura, salinidad y viscosidad principalmente (Monod, 1949; Clarke, 1971). Por lo que el comportamiento de las cuatro especies reportadas se puede atribuir a factores como el descenso de

nutrientes, acumulación de productos tóxicos y cambios en el pH, ya que el metabolismo anaeróbico de carbohidratos dan como resultado un complejo de productos ácidos y neutros dependiendo del organismo, por lo que son pH dependientes (Monod, 1949; Munro, 1970; Rodríguez y Volfová, 1984).

De esta manera es posible explicar, el descenso abrupto en las poblaciones de cada una de las especies reportadas (figura, 1, 2, 3 y 4), debido a la concentración de sustancias que se encuentran en el medio y que actúan como inhibidoras del metabolismo, aunando a esto el descenso en el pH según Minato y Suto, (1981), producido por los productos de desecho que en su mayoría son ácidos grasos volátiles como ác. acético, fórmico, láctico, butírico, valérico, entre otros según (Hungate, 1966; Patton, 1969), provocando lisis celular y liberando a su vez proteínas que funcionan como amortiguadores de pH permitiendo de esta manera el restablecimiento de las poblaciones las cuales no alcanzan los niveles iniciales debido a que las condiciones del medio de cultivo no son las mismas; existiendo un pH diferente el cual no es óptimo para el crecimiento, además de la presencia de los productos finales de desecho antes mencionados que inhiben el crecimiento. Según los criterios de Magaña - Plaza y Ruiz - Herrera, (1967); Munro, (1970); Willett, (1972); Morris, (1979) y Russell, (1987).

VII.- CONCLUSION.

1. Se logró habilitar el medio de cultivo para bacterias celulolíticas ruminales utilizando dos tipos de medios de cultivo: el medio de Hungate y el medio 98.5.
2. El medio 98.5 fué el más efectivo.
3. El pretratamiento efectuado al substrato utilizado facilitó la degradación de celulosa.
4. Las condiciones favorables de cultivo para las cuatro especies fueron; utilizar medio 98.5, pH 7 y temperatura de 40°C.
5. Se obtuvieron 26 aislamientos con actividad celulolítica procedentes del rumen de ganado bovino de las cuales el 80% aproximadamente fueron identificadas.
6. Las cuatro especies identificadas fueron: *Selenomonas ruminantium*, *Clostridium clostridiiforme*, *Eubacterium ruminantium* y *Lachnospira multiparis*.
7. Es el primer reporte acerca de la cinética de crecimiento para estas cuatro especies.
8. De acuerdo a la bibliografía consultada, esta es la primera evaluación sobre la actividad celulolítica de estas especies.
9. *S. ruminantium* fue la más abundante en cuanto a cepas aisladas.
10. En medio 98.5 utilizando papel filtro tratado como substrato la especie más eficaz en cuanto a rendimiento es: *E. ruminantium*.

11. En medio 98.5 utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como substrato la especie más eficaz en cuanto a rendimiento porcentual fue: *Lachnospira multiparis*.

VIII. RECOMENDACIONES.

Debido a la escasez de bibliografía, se recomienda realizar estudios sobre la fisiología de estas cuatro especies, para verificar el comportamiento de éstas, utilizando cultivos continuos para cada especie, mediante el control estricto de pH, temperatura, nutrientes, entre otros, y obtener la diferencia en el rendimiento porcentual de transformación de celulosa a glucosa en cada una de las especies cuando se utilice un sistema batch y uno continuo.

Establecer un estudio en el cual se compare el comportamiento de la cinética de crecimiento, así como la actividad celololítica de las cuatro especies reportadas con cepas puras provenientes de una colección científica, con la finalidad de corroborar el comportamiento y el rendimiento de las especies reportadas.

Realizar ensayos comparativos utilizando diferentes tipos de papel (periódico, cartón, entre otros) como sustrato.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- BADUI, D.S. 1984. Química de los Alimentos. Ed. Alhambra. México. 430 pp.
- BAILEY, W.R., E.G. SCOTT. 1974. Diagnostic Microbiology. A Test Book for the Isolation and Identification of Pathogenic Microorganisms. 7 ed. The C. V. Mosby Co. Virginia, U.S.A. 414 pp.
- BRYANT, A.H., CH.A. BRYANT., CH.G. BRYANT. 1962. Bacteriology Principles and Practice. 6a. ed. Barnes and Noble editores. New York, U.S.A. 418 pp.
- BRYANT, M.P. 1961. Bacterial Species of the Rumen. Rev. Bacteriol. 23:125-148.
- _____. 1972. Comentary on the Hungate Technique for Culture of Anaerobic Bacteria. The Am. J. of Clinical Nutrition. 1324-1328.
- _____. 1981. Microbiología del Rumen. en Fisiología de los Animales Domésticos. de H. H. Dukes y M. S. Swenson. Ed. Aguilar. México. 732 pp.
- BRYANT, M.P., J.M. ROBINSON. 1961. An Improved non-Selective Culture Medium for Ruminant Bacteria and its use in Determining Diurnal Variation in numbers of Bacteria in the Rumen. J. of Dairy Sci. 44:1446-1527.

- BUCHANAN, R.E., N.E. GIBBONS (eds.). 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1268 pp
- CLARKE, P.H. 1971. Methods for Studying Enzyme Regulation. In Methods in Microbiology. ed. by J.R. Norris and D.W. Ribbons. Academic Press. New York. 6A:229-326.
- CONN, E.E., P.K. STUMPF. 1976. Bioquímica Fundamental. 3a. ed. Ed. Limusa, S.A. México. 631 pp.
- CONNEY, CH.L. 1980. Growth of Microorganisms. en Microbiol Fundamentals Biotechnology. H.I. Rehms y G. Ried (eds). 1: 74-112.
- COWLING, B.F. 1961. Comparative Biochemistry of the Decay of Sweetgum Serwood by White-Rot and Brown-Rot Fungi. Dept. Agriculture. Washington, D.C. 1235:923-932.
- DE LA TORRE, M. 1985. Aprovechamiento de Esquilmos Agrícolas y Residuos Agroindustriales. en Prospectivas de la Biotecnología en México. de R. Quintero. CONACYT. México. 589 pp
- DEVLIN, E.E. 1980. Fisiología Vegetal. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 517 pp
- ENRIQUEZ, M.A. 1977. The Obtainment of Single Cell Protein from Cellulose Wastes by Fermentation Process. Tesis doctoral. The Department of Technical Microbiology. Institute of the

- Czechoslovakian. Academic of Science. 59 pp
- GILBERT, I.G., G. T. TSAO. 1983. Interaction Between Solid Substrate and Cellulase Enzymes in Cellulose Hidrolysis. Ann. Reports on Fermentation Processes. 6:323-358.
- HAN, Y.W., C.D. CALLIHAN. 1974. Cellulose Fermentation: Effect of Sustrate Pretreatment on Microbial Growth. Appl. Microbiol. 27:159-165.
- HESPELL, R.B., R. WOLF., R.J. BOTHAST. 1987. Fermentation of Xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other Ruminal Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53:2849-2853.
- HOLDEMAN, L.V., W.E.C. MOORE., L.V. CATO. 1977. Anaerobe Laboratory Manual. V.P.I. Blacksburg, Virginia. 728 pp
- HUNGATE, R.E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press. Inc. New York. 476 pp.
- _____. 1969. A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobe. en Methods in Microbiology. de J.R. Norris y D.W. Ribbons. Academic Press. Inc. New York 3B: 117-132.
- HUNGATE, R.E., M.P. BRYANT., R.A. MAH. 1964. The Rumen Bacteria and Protozoa. Ann. Rev. Of Microbiol. 18:131-164.

- KELLY, J.W., R.V. ASMUNDSON., H.D. HOPCROFT. 1987.
Isolation and Characterization af a
Strictly Anaerobic Cellulolytic Spore
Former: *Clostridium chartatabidum* sp. nov.
Arch. Microbiol. 143: 169-173.
- KISTNER, A., L. GOUWS. 1964. Cellulolytic Cocci occurring
in the Rumen of Sheep Conditioned to
Lucerne Hay. J. Gen. Microbiol. 34:391-447.
- KOSARIC, N.N.G., M.C.D. RUSSELL., S.G. STEWART. 1980.
Ethanol Production by Fermentation; An
Alternative Liquid Fuel. Adv. Appl.
Microbiol. 26:148-224.
- LEAL, H.L. 1985. La Utilización Microbiológica de
Desperdicios Lignocelulósicos. Potenciali-
dades y Perspectivas. en Prospectiva de la
Biotecnología en México. de R. Quintero.
CONACYT. México. 686 pp.
- LIN, K.W., M.R. LADISH, M. VOLOCHT, J.A. PATTERSON, C.H.
NALLER. 1985. Effect of Pretreatment and
Fermentation on Pore Size Cellulosic
Material. Biotech. and Bioeng. 27:356-361.
- MAGANA-PLAZA, I., J. RUIZ-HERRERA. 1967. Mechanims of
Regulations of Ureasa Biosynthesis in
Proteus rettgeri. J. of Bacteriol.
91:1294-1301.
- MANDEL, M. 1982. Cellulases. Annual Reports on

- Fermentation Processes. G.T. Tsao (ed).
5:35-67.
- MARSTON, H.R. 1947. The Fermentation of Cellulose "in vitro"
by Organisms from Rumen of Sheep.
Biochemical Journal. 42:564-574.
- MAROUNEK, M., J.R. WALLACE. 1984. Influence of Culture on
the Growth and Metabolisms of the Rumen
Bacteria *Selenomonas ruminantium*,
Bacteroides amylophilus, *Bacteroides*
succinogenes and *Streptococcus bovis* in
Batch Culture. J. Gen. Microbiol. 130:
223-229.
- MINATO, H., A. ENDO, M. HIGUCHI, Y. OOTOMO, T. UEMURA.
1966. Ecological Tratise on the Rumen
Fermentation I: The Fractionation of
Bacteria Attached to the Rumen Digesta
Solids. J. Gen. Appl. Microbiol. 12:39-52.
- MINATO, H., T. SUTO. 1981. Technique for Fractionation of
Bacteria in Rumen Microbial Ecosystem. IV:
Attachment of Rumen Bacteria to Cellulose
Powder and Elution the Bacteria Attached
to it. J. Gen. Appl. Microbiol. 27:21-31.
- MONOD, J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. Ann. Rev.
Microbiol. 3:371-391.
- MORRIS, J.G. 1979. Nature of Oxygen Toxicity in Anaerobic
Microorganisms. en Strategies of Microbiol

- Life in Extreme Environment. de M. Shilo.
Berlin, Alemania. 546 pp
- MUNRO, A.L.S. 1970. Measurement and Control of pH values.
en Methods in Microbiology. de J.R. Norris
y D.W. Ribbons. Academic Press. Inc. New
York 2:39-71.
- OGIMOTO, K., S. IMAI. 1980. Atlas of Rumen Microbiology.
Japan Scientific Societes Press. Tokio.
211 pp.
- OSHIO, S., I. TAHATA., H. MINATO. 1987. Effect of Diet
Differing in Ratios of Roughage to
Concentrate on Microflora im the Rumen of
Heifers. J. Gen. Appl. Microbiol. 27:145-
155.
- PATTON, S. 1969. La Leche. Selecciones de Scientific
American de Johan y Jules. 27-31.
- PEREZ, G.P. 1981. Principios Microbiologicos y Qulmicos de
la Producción Industrial de Proteina a
Partir de Celulosa. en Biotechnologia para
el Aprovechamiento de Desperdicios
Orgánicos. de O. Monroy, G. Viniegra. ed.
A.G.T. S.A. México. 589 pp
- RODRIGUEZ, H., O. VOLFOVA. 1984. Detección y Estudio de la
Actividad Celulolítica en *Cellulomonas sp.*
11bc. Revista de Ciencias Biológicas.
México. 15:51-58.

- RUSSELL, B.J. 1987. Effect of Extracellular pH on Growth and Proton Motive Force of *Bacteroides succinogenes*, a Cellulolytic Ruminant Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53:2379-2383.
- SAKAUCHI, R., S. HOSHINO. 1981. Microbial Characteristics of Ruminant Fluid from Feedlot Bloat Beef Cattle. J. Gen. Appl. Microbiol. 27:145-155.
- SCHEINFINGER, C.C., M.J. WOLIN. 1973. Propionate Formation from Cellulose and Soluble Sugars by Combined Cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. Appl. Microbiol. 26: 789-795.
- SINHA, N.R., B. RANGANATHAN. 1983. Cellulolytic Bacteria in Buffalo Rumen. J. Appl. Bacteriol. 54:1-6.
- SMITH, W.R., YU IDA., R.E. HUNGATE. 1973. Factors affecting Cellulolysis by *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol. 114:724-737.
- STACK, R.J., M.A. COTTA. 1986. Effect of 3-Phenylpropanoic Acid on Growth of and Cellulose Utilization by Cellulolytic Ruminant Bacteria. Appl. Env. Microbiol. 52:209-210.
- TEATHER, R.M., P.I. WOOD. 1982. Use of Congo Red - Polysaccharide. Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. Appl. Env. Microbiol. 43:777-780.

- UEKI, A., E. MIYUGAWA., H. MINATO., R. AZUMA., T. SUTO.
1978. Enumeratiuon and Isolation of
Anaerobic Bacteria in Sewage Digestor
Fluids. J. Gen. Appl. Microbiol. 24:317-
332.
- VAREL, H.V., J.H. JUNG. 1986. Influence of Forage Phenolics
on Ruminal Fibrolytic Bacteria and "in
vitro" Fiber Degradation. Appl. Environ.
Microbiol. 52:275-280.
- WEICHERT, CH.K., W. PRESCH. 1975. Elementos de Anatomia de
los Cordados. Ed. Mc.Graw-Hill. México.
531 pp.
- WILLET, H.P. 1972. Physiology of Bacterial Growth. en
Zinsser Microbiology. 15a. ed. de W.K.
Joklik y D.T. Smith. Ed. A.C.C. New York.
1120 pp.
- ZAR, J.H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall.
Biological Science Serie. W.D. Mc Elroy y
C.P. Swanson (eds). Englewood Cliffs. N.J.
620 pp.

X.- APENDICES.

APENDICE I.- Medio Celulosa de Hungate (1966).

KH_2PO_4	0.02g
K_2HPO_4	0.03g
MgSO_4	0.01g
CaCl_2	0.01g
NaCl	0.1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 g
solución Resarzurina 1%	0.1 ml
Cisteina - $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02g
Na_2CO_3	0.4 g
Fluido ruminal a)	30.0 ml
polvo de celulosa b)	1.0 g
Agua destilada	70.0 ml

a) El fluido ruminal es obtenido por filtrado del contenido ruminal, a partir de ganado alimentado con raciones concentradas de alfalfa, a través de dos capas de gasa para eliminar los sólidos suspendidos y es almacenado en frascos de plástico en un refrigerador a -20°C . Esto se descongela y se centrifuga a 25.000 g por 10 min. justo antes de ser agregado al medio.

b) El polvo de celulosa es obtenido a partir de papel filtro whatman No. 1 molido y suspendido en agua.

APENDICE II.- Indicador Azul de Metileno para Anaerobiosis
modificado por Smith (Bailey y Scott, 1974).

Reactivos:

Bicarbonato de Sodio (grado comercial).	0.454 g
Glucosa	50 mg
Azul de Metileno	20 mg

Para su uso agregue 2.54 cm de esta mezcla en un tubo de ensayo 16x100 mm y agregue agua destilada y mezcle. La solución se volverá incolora lentamente durante la incubación a 36°C en medio anaeróbico.

APENDICE III.- Medio 98.5 (Bryant y Robinson, 1961)

Solución Mineral I a)	7.5 ml
Solución Mineral II a)	7.5 ml
Solución Resarzurina 1%	0.1 ml
Agua Destilada	50.0 ml
Agar (Bacto-agar, Difco)	2.0 g
Fluido Ruminal b)	40.0 ml
Glucosa	0.05 g
Celobiosa	0.05 g
Almidón Soluble	0.05 g
Cisteína - $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ c)	0.5 ml
Na_2CO_3	5.0 ml

a) SOLUCIONES MINERALES I y II

i) Solución Mineral I

K_2HPO_4	0.6 g
Agua Destilada	100.0 ml

ii) Solución Mineral II

NaCl	1.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.2 g
KH_2PO_4	0.6 g
CaCl_2	0.12 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
Agua Destilada	100.0 ml

b) Ver apéndice I.

c) Solución Cisteína. Disuelva 2.5g de L-cisteína- $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua destilada; ajuste a pH 10 con NaOH al

10%. Rapidamente agregue 2.5 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y ajuste a 200 ml con agua destilada. colóquese en un matraz, bajo flujo de N_2 gaseoso. Esterilice a 121°C por 15 min.

NOTA: La fuente de carbono (glucosa, celobiosa y almidón soluble) fueron sustituidas por papel filtro tratado en cantidades equivalentes.

APENDICE IV.- Técnica del Rojo Congo (Teather y Wood, 1982)

Inundar con rojo congo (1mg/ml) por cada medio de cultivo en CMC, durante 15 min. Retirar el exceso, nuevamente inundar los medios de cultivo con solución de NaCl 1M durante 15 min. Vaciar el exceso. Posteriormente inundar los medios de cultivo con solución de HCl 1M y quitar el exceso.

El fundamento de esta técnica consiste en el cambio de color del Rojo Congo al ser agregado el HCl 1M tornándose azul en las zonas de hidrólisis.

APENDICE V.- Almidón Hidrolizado.

Medio PY No.39 (Holdeman et al, 1977)

Peptona	0.5 g
Tripticasa	0.5 g
Extracto de Levadura	1.0 g
Solución Resarzurina, 0.1%	0.1 ml
Solución de Sales a)	4.0 ml
Solución Hemina b)	1.0 ml
Solución Vitamina K ₁ c)	0.02 ml
Cisteína - HCl.H ₂ O c)	0.05 g
Agua Destilada	100.0 ml

a) Solución de Sales.

CaCl ₂ (anhidro)	0.2 g
MgSO ₄ (anhidro)	0.2 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaHCO ₃	10.0 g
NaCl	2.0 g
Agua Destilada.	1000.0 ml

b) Solución de Hemina.

Disuelva 50 mg de hemina en 1 ml de NaOH 1N; ajuste a 100 ml con agua. Agregue 1 ml de esta solución a 100 ml de medio de cultivo.

c) Solución Vitamina K₁

Solución para medios de cultivo. Disolver 0.15 ml de vitamina K₁ en 30 ml de etanol al 95%. Adicionar 0.02 ml de

solución/100 ml de medio después de que el medio es hervido pero antes de ser esterilizado. mantener la solución de vitamina K₁ bajo refrigeración. Almacenece en botellas ambar. Desechar después de un mes.

APENDICE VI.- Gelatina Digerida.

Medio Gelatina No.19 (Holdeman et al, 1977)

Peptona	10.0 g
Extracto de Levadura (Difco)	1.0 g
Glucosa	0.1 g
Solución Resarzurina, 1%	0.1 ml
Solución de Sales a)	4.0 ml
Agua Destilada	100.0 ml
Solución Hemina b)	1.0 ml
Vitamina K ₁ c)	0.02 ml
Cisteína-HCl-H ₂ O	0.05 g

a) Solución de Sales ver apéndice V.

b) Vitamina K₁ ver apéndice V.

c) Solución Hemina ver apéndice V.

Caliente, enfríe, y adicione la vitamina K₁, hemina, y la cisteína. Ajuste el pH y distribuya 5 ml en cada tubo de ensayo conteniendo 0.6 g Bacto-gelatina (Difco).

APENDICE VII.- Medio Leche (Holdeman et al, 1977)

Leche Fresca	100.0 ml
Solución Resazurina 0.1%	0.1 ml
Solución Hemina a)	1.0 ml
Vitamina K ₁ b)	0.02 ml

a) ver apéndice V

b) Vitamina K₁ ver apéndice V.

Mezcle, esterilice, enfríe e inocule.. Prueba positiva en un lapso de tiempo de 5 días a 4 semanas.

APENDICE VIII.- Producción de Indol (Holdeman et al, 1977).

Carne de Res picada (libre de grasa)	500.0 g
Agua Destilada	1000.0 ml
NaOH 1N	25.0 ml

Mezcle carne, agua, e hidróxido de sodio y hierva. Enfríe a temperatura ambiente, descarte la grasa de la superficie, reteniendo ambas partículas de carne y filtrado. Para filtrar, agregue suficiente agua destilada hasta restaurar 1 litro del volumen original. A este filtrado agregue:

Tripticasa	30.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Solución Resarzurina 0.1%	0.1 ml

Hervir, enfriar, y adicionar 0.5 g de cistina - HCl, 10.0 ml de solución de hemina y 0.2 ml de vit K₁. Ajuste el pH. Distribuir 7 ml en los tubos conteniendo partículas de carne (use una parte de partículas de carne a cuatro o cinco partes de líquido).

Reactivos:

Reactivo de Ehrlich: Disolver 2 g de p-dimetil-amino-benzaldehído en 190 ml de alcohol etílico al 95% y agregue 40 ml de HCl concentrado.

A 2 ml de medio, agregue 1 ml de xileno, agite bien, espere alrededor de 2 min. Lentamente adicione 0.5 ml del reactivo de Ehrlich por el lado interior del tubo. Un anillo

rosa dentro de los primeros 15 min. indica reacción positiva. Un anillo amarillo indica reacción negativa.

APENDICE IX.- Producción de H_2S .

Medio No.22 (Holdeman et al, 1977).

Medio SIM deshidratado	3.0 g
Extracto de Levadura (Difco)	0.4 g
Solución Resarzurina, 1%	0.1 ml
Solución de Sales a)	50.0 ml
Agua Destilada	50.0 ml
Solución Hemina b)	1.0 ml
Vitamina K_1 c)	0.02 ml
Cisteína - $HCl.H_2O$	0.05 g

a) Solución de Sales. ver apéndice V.

b) Solución Hemina. ver apéndice V.

c) Vitamina K_1 . ver apéndice V.

Después de la incubación, el color negro indica la producción de H_2S .

APENDICE X.- Reducción de Nitrato. (Holdeman et al, 1977).

Reconstituya el Medio Indol-Nitrato (BBL) como lo especifica el envase, caliente, enfríe, y agregue 1 ml de solución hemina y 0.02 ml de vitamina K₁ por cada 100 ml de medio. Asegure que los tubos se encuentran libres de O₂.

Reactivos.

Solución I: Disuelva 1.6 g de ácido sulfanílico en 200 ml de ácido acético 5N (agregue 56.8 ml de ácido acético glacial a 143 ml de agua destilada.

Solución II: Agregue 1.2 ml de dimetil-1-naftilamina a 100 ml de ácido acético 5N.

Agregue 1 ml de solución I y 0.5 ml de solución II al medio de cultivo. El color rojo es positivo (nitrato presente). Si el color no aparece de 2 a 5 min adicione unos granos de zinc. El color rojo (después de agregar el zinc) la reacción es negativa. Si no hay color (después de agregar el zinc) la reacción es completa.

APENDICE XI.- Voges Proskauer (acetilmetil-carbinol).

Peptona-Extracto de Levadura-Glucosa Medio (PYG)

(Holdeman et al, 1977).

Peptona	0.5 g
Tripticasa (BBL)	0.5 g
Extracto de Levaduras (Difco)	1.0 g
Solución Resarzurina, 1%	0.1 ml
Solución de Sales a)	4.0 ml
Solución Hemina b)	1.0 ml
Vitamina K ₁ c)	0.02 ml
Cisteína-HCl-H ₂ O	0.05 g
Agua Destilada	100.0 ml

a) ver apéndice V.

b) ver apéndice V.

c) ver apéndice V.

Reactivos.

Solución I: Disolver 5 g 1-naftol en 100 ml de alcohol etílico al 95%.

Solución II: KOH	80.0 g
Creatina	0.6 g
Agua Destilada	200.0 ml

A 1 ml de medio de cultivo PYG de 2 días de incubación adicionar 0.6 ml de acetilmetil-carbinol (solución I) y 0.2 ml de solución II. Mezcle bien. Deje reposar los tubos agitando ocasionalmente por 30 min. La reacción positiva es la aparición de un color rojo.

APENDICE XII.- Catalasa.

Medio (EYA) agar. (Holdeman et al, 1977).

Tripticasa	20.0 g
Na_2HPO_4	2.5 g
NaCl	1.0 g
MgSO_4 . 5%	0.1 ml
Glucosa	1.0 g
Agar	12.0 g
Agua Destilada	500.0 ml
pH 7.3	

Esterilizar en autoclave 121°C por 15 min. Enfriar a 60°C, adicionar 1 yema de huevo, mezclar, y vaciar en cajas. Este medio no es prereducido. Puede ser almacenado en jarras anaeróbicas si es usado 4 h después de su preparación.

Exponga crecimiento en medio EYA en placa al aire por 30 min. Agregue 1 ó 2 gotas de H_2O_2 . La producción de burbujas es reacción positiva.

APENDICE XIII.- Tinción Gram. (Bryant et al., 1962).

Se esteriliza el asa, se enfria sobre la superficie del agar, se toma la muestra. Se disemina en el portaobjetos, se seca al aire y se fija al fuego sin calentar demasiado. Se agrega cristal violeta al 1% inundando la superficie del portaobjeto por 1 min. Se lava con agua corriente. Se adiciona iodo-gram* por 1 min. y se lava quitando el excedente con agua de la llave. Posteriormente se lava con alcohol durante 30 seg, se seca al aire y se agrega safranina al 0.2%, lavando el excedente con agua común. Se observa con el microscopio con el objetivo 100x.

*Iodo-gram: Disuelva 1.0 g de yodo y 2.0 g de yoduro de potasio en 300 ml de agua destilada.

APENDICE XIV. Tinción de Esporas. (Bryant et al., 1962).

Se realiza la tinción de esporas con la siguiente técnica:

Cubrir la fijación previamente realizada con carbol-fucsina y calentar hasta emisiones de vapores por 5 min. Lavar con agua común. Se decolora con alcohol ácido por 2 seg y se lava con agua de la llave inmediatamente. Posteriormente se tiñe con azul de metileno Loeffler durante 60 seg. Se lava con agua de la llave y se observa con aceite de inmersión.

APENDICE XV.- Técnica de la Antrona (Scheinfinger y Wolin, 1973).

Previa digestión (medio de cultivo), se toma la muestra (1 ml) y se afora a 50 ml. De esta solución se toma 1 ml y se hace una solución final 1:50. Se toman 2 ml de la solución final en un tubo de ensayo y en baño de agua fría se adicionan 10 ml de antrona diluida al 2% en ácido sulfúrico concentrado mezclando perfectamente.

La solución se somete a un baño de agua caliente por 15 min y las muestras ya frías se leen en un espectrofotómetro a 620 nm de longitud.

Para conocer la cantidad de glucosa en relación con la absorbancia se realizó una curva patrón, donde se graficó absorbancia contra concentración de glucosa en mg % (figura, 7).

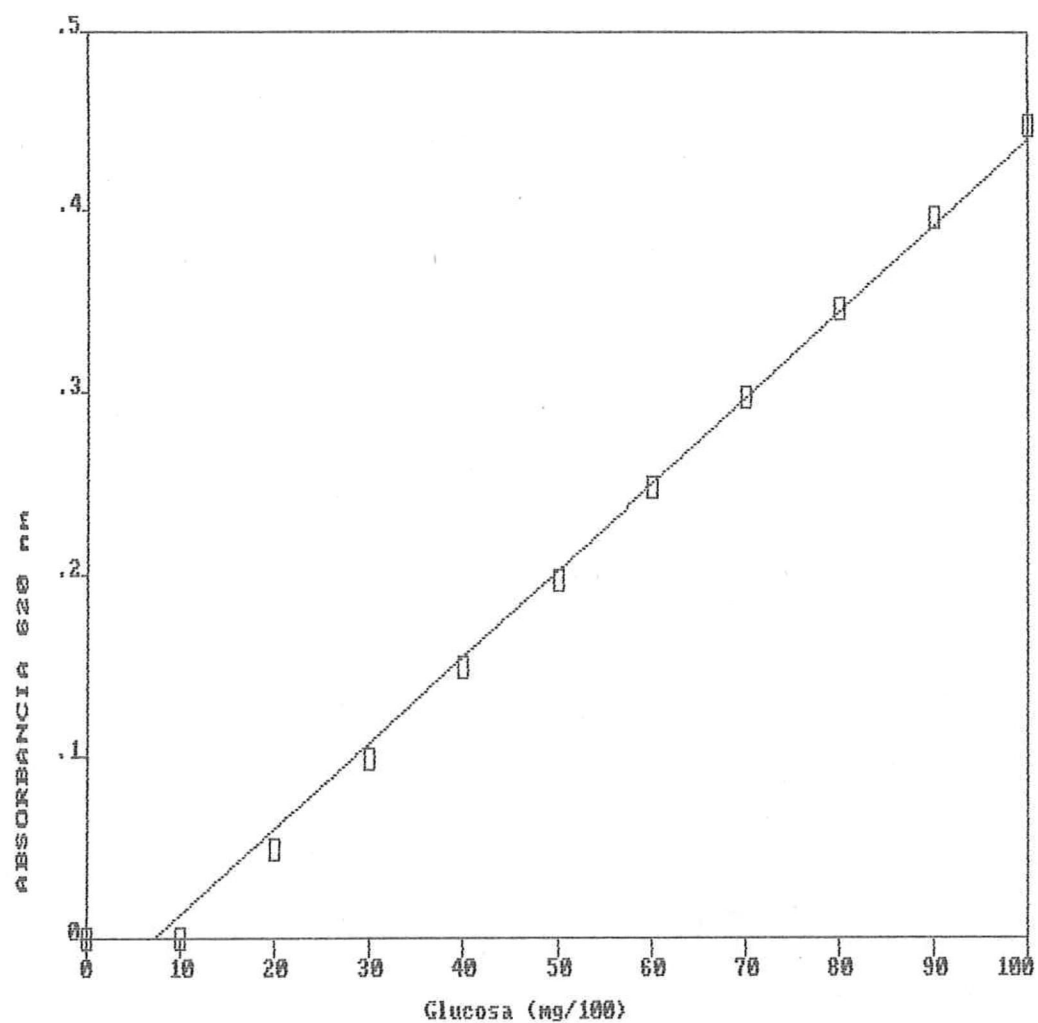


Figura 7.-Curva patrón de glucosa, utilizando antrona como reductor de carbohidratos.

APENDICE XVI.- Determinación de Celulosa (Enriquez, 1977).

Pesar 0.1 a 0.2 g de muestra (pretratada) en un tubo de rosca. Adicionar 3 ml del reactivo HNO_3 /ácido acético (15 ml de HNO_3 agregar 150 ml de ácido acético al 80% p/v); agregar 1 ml homogenizar y adicionar los 2 restantes, remezclandolo.

Colocar los tubos con tapón en baño de agua hirviendo durante 30 min, procurando que el nivel del agua sea igual a la del tubo. Posteriormente filtrar al vacío con kitasato y filtro poro "C", arrastrando todo el material del tubo con ayuda de agua destilada.

Adicionar 10 ml de H_2SO_4 al 67% v/v y dejar reposar durante 1 hora, sin succionar. Tomar 1 ml del filtrado y diluir a 100 ml y determinar azúcares totales por el método de Dubois. Para obtener los resultados arrojados por el experimento se realizó una curva patrón utilizando metilcelulosa, la cual se utilizó en mg. en diferentes diluciones (figura, 8).

NOTA: La técnica para determinar azúcares totales fue sustituida, tanto para la determinación de celulosa como para la curva patrón, por la técnica de antrona.

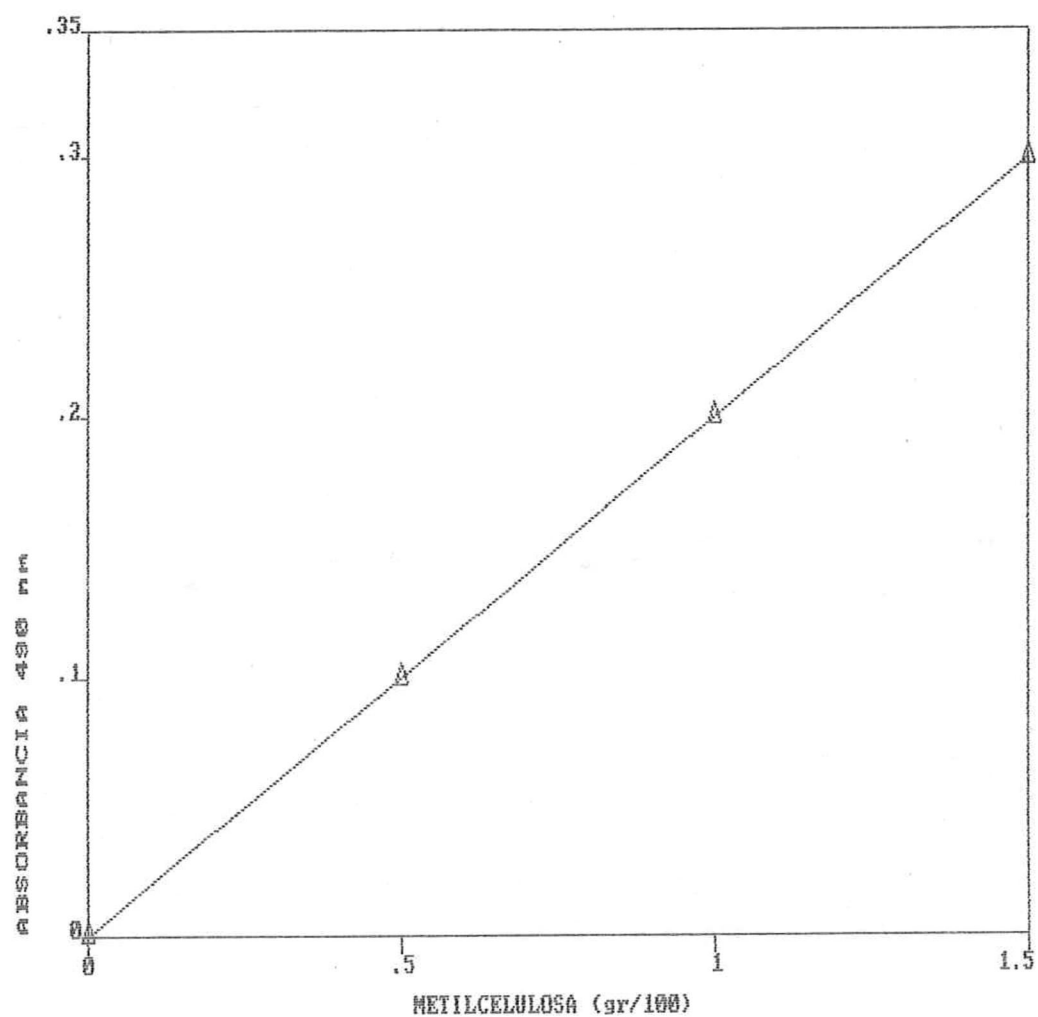


Figura 8.-Curva patrón de metilcelulosa.

APENDICE XVII.-Determinación de Actividad Enzimática.

(Enriquez, 1977).

Se utiliza una tira de papel whatman No.1 de 1x6 cm enrollado por cada tubo (en total son 5 más un testigo), al cual se le adiciona 1 ml de TRIS-HCl 2M pH 7.2, además se le agrega 1 ml de extracto enzimático (medio de cultivo inoculado e incubado). Se incuba en baño María a 45°C por 5 min.

Posteriormente se inactiva la actividad enzimática adicionando 1 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS), poniendo de nuevo en baño María en ebullición por 5 min, para el desarrollo del color. Finalmente se realiza una dilución agregando 15 ml de H₂O destilada a cada tubo y se leen a 550 nm. Haciendo curvas de calibración con glucosa con anterioridad (figura, 9).

Reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS)

Agua Destilada	1426.0 ml
----------------	-----------

ác. 3,5-dinitrosalicílico	10.6 g
---------------------------	--------

NaOH	19.8 g
------	--------

Disolver, luego añadir:

Tartrato Doble de Na y K	306.0 g
--------------------------	---------

Fenol (fundir a 50°C)	7.6 ml
-----------------------	--------

m-bisulfito de Na	8.3 g
-------------------	-------

Titular 3 ml de la muestra con HCl 0.1N utilizando fenoftaleína como indicador. Debe tomar de 5 a 6 ml de HCl.

NOTA: La muestra problema fue tratado bajo el mismo

procedimiento y cambiando la tira de papel por 0.1 g base húmeda de papel whatman No.1 tratado.

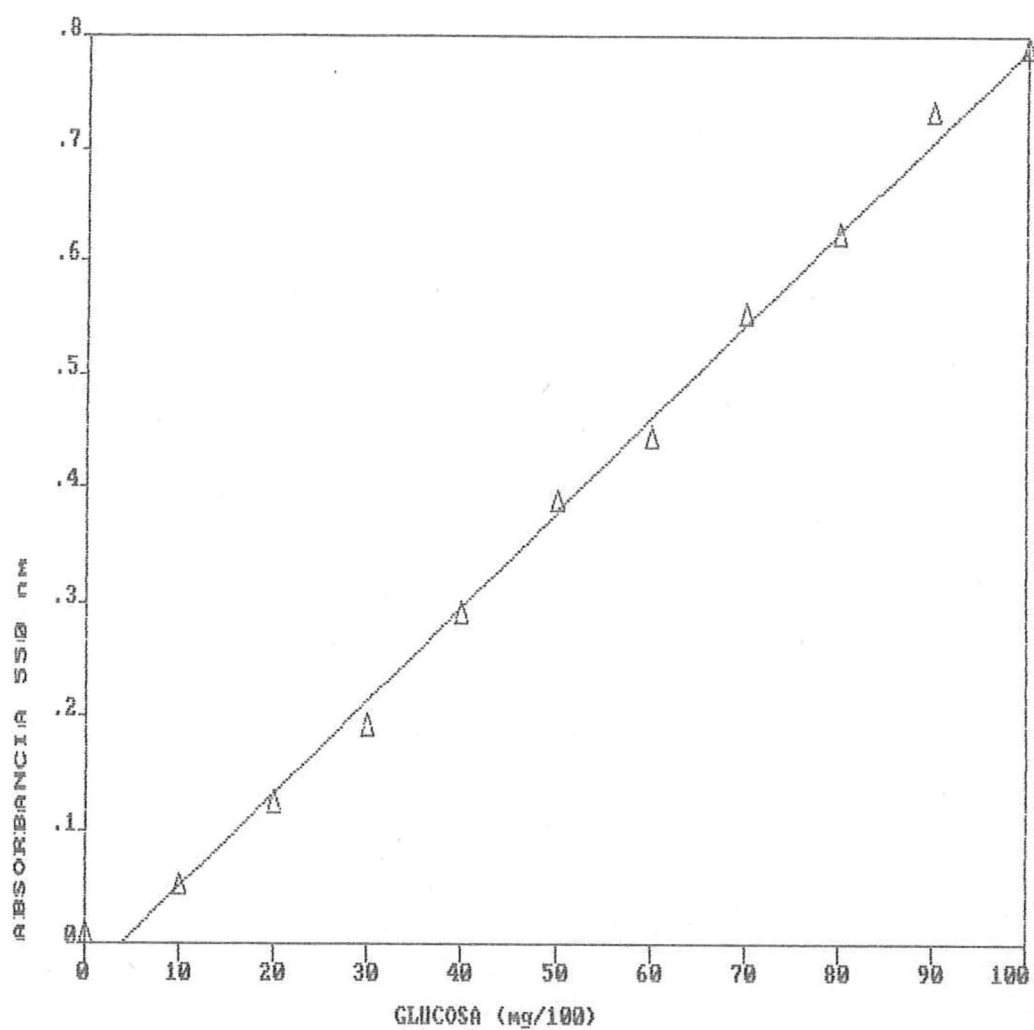


Figura 9.-Curva patrón de glucosa, utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS).