

## **EFFECTO DEL SUSTRATO, SOBRE LA ACTIVIDAD ACETOGÉNICA IN VITRO DE *Ruminococcus schinkii* EN INTERACCIÓN CON HONGOS DEL RUMEN**

### **EFFECT OF SUBSTRATE ON IN VITRO ACETOGENIC ACTIVITY OF *Ruminococcus schinkii* WITH RUMEN FUNGI INTERACTIONS**

Miramontes Carrillo JM <sup>1,2</sup>, Ramírez RM <sup>2,3</sup>, Ibarra AJ<sup>3</sup>, Ibarra AFJ<sup>2</sup>,  
Miramontes Vargas JM <sup>2</sup>, Brizuela APB<sup>5</sup>, Lezama GR<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Investigación biotecnológica SC. <sup>2</sup>Centro de Investigación de desarrollo Educativo (CIDE) A. C.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Nayarit. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

<sup>4</sup>Laboratorio de Control Biológico de la Universidad de Colima.

<sup>5</sup>Laboratorio de Ciencias Experimentales, Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 108, Villa Juárez Nayarit, México.

#### **RESUMEN**

La acetogénesis es una alternativa para inhibir el metano del rumen. Se evaluó el efecto del sustrato, sobre la actividad acetogénica de *Ruminococcus schinkii* con hongos. Se cultivaron bajo anaerobiosis forrajes molidos en medios más hongos y acetogénicas. Se formaron siete grupos de 24 botellas con medio, sustrato y 2-ABS. Seis grupos tuvieron esporas de hongos y acetogénicas. Tres grupos con forraje, sin microorganismos, fueron blancos. El diseño fue factorial 3x2x6; A=3 forrajes; B= hongos y hongo más acetogénica y C=6 tiempos de incubación. Cada tratamiento se realizó con cuatro repeticiones en tres periodos. El sustrato afectó DMS, la producción de azúcares reductores y pH ( $p < 0.0001$ ) por la actividad acetogénica y hongos. DMS del maíz y sorgo fue mayor que la alfalfa. La alfalfa produjo más azúcares reductores. El acetato no fue afectada por los sustratos ( $p = 0.3417$ ), pero el pH presenta diferencias. Factor microorganismos presenta efectos por los sustratos. La actividad acetogénica mayor en co-cultivo con hongos y bacterias ( $p < 0.0001$ ). El tiempo de incubación afectó todas las variables. DMS para el maíz

fue mayor a las 96 h, el sorgo 144 y alfalfa 124 ( $p < 0.0001$ ). El acetato fue mayor para todos los sustratos a las 120 h ( $p < 0.0001$ ), producción de azúcares fue mayor para todos los sustratos a las 144 h ( $p < 0.0001$ ) y pH a las 0 h para todos los sustratos ( $p < 0.0001$ ). La capacidad de los hongos para degradar las vegetales se potencializa en interacción con acetogénicas, permite una mayor DMS, una mayor producción de acetato y una inhibición de la metanogénesis.

**Palabras clave:** Acetogénesis, metano, hongos, DMS, acetato, azúcares reductores.

#### **Abstract**

Acetogenesis is an alternative procedure to inhibit rumen methane. Substrate effect on acetogenic activity from *Ruminococcus schinkii* with rumen fungi interactions was evaluated. Forages were placed in anaerobic medium. Fungus was from rumen digest. Acetogenic was donated for discoverer. Seven groups of 24 bottles with medium, substrate and 2-BESA were formed. Six groups had fungal spore and

#### **Autor Corresponsal:**

Miramontes Carrillo JM, Centro de Investigación de Desarrollo Educativo "Compostela" (CIDE), Domicilio. Av. Ricardo Flores Magón No. 432 Nte., Colonia Ojo de Agua, Tepic, Nayarit, México. Tel. (311) 2126514, Correo electrónico: [jmancar2006@hotmail.com](mailto:jmancar2006@hotmail.com)

*Ruminococcus schinkii*. Three groups with forage, without fungus or bacteria, were blank. Model was randomized design factorial 3x2x6; factor A=3 forages, B=fungi and fungi plus acetogenic and C= Six incubation times. Each treatment was performed with four replicates into three experimentation periods. Substrate affected DMS, the production of reducing sugars and pH ( $p<0.0001$ ) because of the acetogenic activity of *Ruminococcus schinkii* and fungi. DMS maize and sorghum was higher than that of alfalfa. Alfalfa produced more redactor sugars. Acetate was not affected by substrates ( $p=0.3417$ ), but pH presents differences. Microorganism's effect shows differences for all substrates. Acetogenic activity of *Ruminococcus schinkii* was prominent in co-culture with fungi for all variables ( $p<0.0001$ ). Incubation time affected all variables. DMS maiz was higher at 96 h, sorghum 144 and alfalfa 124 ( $p<0.0001$ ). Acetate concentration was higher for all substrates at 120 h ( $p<0.0001$ ), sugars reducing was highest for all substrates at 144 h ( $p<0.0001$ ) and pH 0 h in all substrates ( $p<0.0001$ ). Fungi ability to degrade forage is potentiated in co-culture with acetogenic and allows better energy food use, increased acetate production and inhibition of methanogenesis in rumen.

**Key words:** Acetogenesis, methane, fungi, acetate, reducing sugars.

## Introducción

La síntesis de metano en el rumen además de disminuir la energía del alimento para el rumiante, sus emisiones hacia el ambiente representan un potencial de 23 veces mayor que el dióxido de carbono para contribuir al calentamiento global (Siegford, Powers y Grimes-Casey, 2008; Koneswaran y Nierenberg, 2008). Se han publicado diferentes estrategias para disminuir las emisiones de metano a la atmosfera (Gworgwor *et al.*, 2006; Kebreab *et al.*, 2009; Buddle *et al.*, 2010) incluyen; el uso de vacunas, inhibidores enzimáticos, fagos, inducción de la homoacetogénesis y defaunación, pero el mecanismo más estudiado es a través de la manipulación

de la fermentación en el rumen por aditivos alimentarios (Buddle *et al.*, 2010), sin embargo, el uso de aditivos no se recomienda para un manejo práctico en el aprovechamiento de los animales sin evitar efectos adversos sobre la calidad de los productos de origen animal para consumo humano (Johnson y Johnson, 1995; Kebreab *et al.*, 2009). Las aplicaciones que incluyen compuestos químicos en la dieta son: derivados del cloro, análogos del metano (Yang y Speece, 1986), ácido diimide piromelítico (Czerkawski y Breckenridge, 1975), tricloro etil adipato, ácido 2-bromoetanosulfónico, ionóforos, sulfatos, nitratos y ácidos grasos (Goel *et al.*, 2009a; Goel, Makkar y Becker, 2009; Guan *et al.*, 2006b). No obstante, las metanogénicas Archae se adaptan o los degradan en un tiempo corto, y en consecuencia su efecto disminuye o se nulifica (Kone, Machado y Cook, 1989; Mbanzamihigo, VanNevel y Demeyer, 1995; Van Nevel y Demeyer, 1996; McAllister *et al.*, 1996; Karnati, Yu y Firkins, 2009; Patra y Saxena, 2010) En rumiantes alimentados con dietas ricas en paredes celulares, existe una mayor producción de hidrógeno en el rumen, pero su concentración es baja porque principalmente las metanogénicas lo reciclan, aunque otros tipos de bacterias como acetogénicas y sulfato reductoras, también compiten por medio de interacciones metabólicas particulares (Cord-Ruwisch, Seitz y Conrad, 1988; Xu, *et al.*, 2010). Las bacterias acetogénicas y sulfato reductoras están presentes y predominan en diferentes ecosistemas como el intestino de las termitas (Brauman *et al.*, 1992), humanos (Kamlage, Gruhl, y Blaut, 1997) ovejas, caballos, venados y llamas (Morvan *et al.*, 1996), cerdos de guinea, conejos, ballenas, tracto intestinal del avestruz (Miramontes-Carrillo *et al.*, 2008) así como en cañerías y sedimentos marinos (Bernalier *et al.*, 1993) y su metabolismo se le denomina acetogénesis reductora. Este proceso aunque presente en el rumen es una ruta no predominante, que al parecer depende de varios factores, algunos de ellos en la actualidad desconocidos se mencionan: las interacciones sinérgicas de las metanogénicas con otros organismo productores de hidrógeno como los hongos y los protozoarios, la diferencia en el

umbral de captación de hidrógeno (Krumholz *et al.*, 1999; Rey *et al.*, 2010), su habilidad de crecer mixotroficamente (Liu y Suflita, 1995), la tasa de pasaje del rumen y su temperatura (Nozhevnikova *et al.*, 1994), el pH, el carbono disponible (Jones y Simon, 1985; Phelps y Zeikus, 1984) y la carga bacteriana, (Breznak y Brune, 1994; Matsui *et al.*, 2008). La acetogénesis reductora es una alternativa para inhibir el metano ya que la utilización de dietas con alto contenido de paredes celulares está ligada a la producción de hidrógeno en el rumen y los hongos al colonizar y degradar los tejidos vegetales más difíciles se constituyen en los mayores productores, por lo que sus interacciones metabólicas con bacterias acetogénicas, son dependientes del tipo de sustrato para maximizar su actividad acetogénica reductora de especies aisladas a partir del rumen (McAllister *et al.*, 1996; Christophersen, Wright y Vercoe, 2008). Entendiendo los factores que determinan la competencia entre los tres grupos de bacterias que reciclan el hidrógeno en el rumen es de suma importancia para la nutrición animal en condiciones sustentables. Sin embargo, pocas investigaciones han sido reportadas para el estudio de la acetogénesis en el rumen debido a que solamente alrededor de once especies de bacterias acetogénicas han sido identificadas y clasificadas (Greening and Leedale, 1989; Rieu-Lesme, Fonty y Doré, 1995; Matsui *et al.*, 2008). Autores como Nolle, Demeyer y Verstraete, (1997) y Parameswaran *et al.*, (2010), mencionan que si la acetogénesis en el rumen pudiera ser establecida es posible gozar de tres beneficios principales: 1) Una disminución en la pérdida de energía del alimento, 2) mayor producción de compuestos energéticos como el acetato y 3) una disminución en las síntesis de metano.

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de tres sustratos, sobre la actividad acetogénica *in Vitro* de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen, sobre la base de la producción de acetato, producción de azúcares reductores, aumento de la digestibilidad de la materia seca *in Vitro* y cambios en el pH.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima; ubicada en el Km 40, autopista Colima-Manzanillo a 18° 55 minutos de latitud Norte, 103° 52 minutos de longitud Oeste. A una altura de 33 MSN y una temperatura promedio anual de 28°C y 710 mm de precipitación pluvial (Colima, 2005).

### Los sustratos

Los sustratos fueron tres tipos de forrajes: rastrojo de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*) y alfalfa (*Medicago sativa*) achicalada. Los rastrojos de maíz y sorgo se obtuvieron de los campos de cultivo en el municipio de Tecoman Colima en primavera del 2009; la alfalfa se obtuvo de una parcela en el municipio de ciudad Guzmán Jalisco, en la misma fecha. De cada forraje se recolectaron tres pacas de 30 Kg cada una y se trasladaron al área experimental de las instalaciones mencionadas. De cada tipo de forraje se tomó una muestra de 1000 g y se guardó en bolsa de plástico bajo condiciones de refrigeración hasta su uso, a una temperatura de 4°C. Posteriormente se secaron en un horno (Felisa Modelo 2003) durante 16 horas. Una vez secos se molieron en un molino Marca Wiley Modelo 4 equipado con una malla de 1 milímetro, como se especifica en Fondevila y Dehority (1996). Las muestras molidas se guardaron de nuevo bajo las mismas condiciones de refrigeración hasta su posterior utilización en la fase experimental. El resto de los forrajes se utilizó para preparar la dieta de los animales donadores de inóculo de hongos anaerobios del rumen.

### La cepa de *Ruminococcus schinkii*

La bacteria acetogénica *Ruminococcus schinkii* sp. nov., utilizada en este estudio fue generosamente donada por su descubridora y descriptora la Dra. Francoise Rieu-Lesme del INRA Francia. El tubo con la bacteria se mantuvo en un medio de cultivo de caldo ce-

rebro corazón (BHI), bajo condiciones de refrigeración a una temperatura de 0°C hasta su estudio siguiendo las técnicas de cultivos anaerobios de Hungate, 1966 y las recomendaciones de su descubridora. Para su multiplicación se utilizó el medio de cultivo AC-11. Todas los cultivos se realizaron bajo condiciones de anaerobiosis atendiendo a las recomendaciones (Breznak y Switzer, 1986; Balch *et al.*, 1979 y Greening y Leedle, 1989). Se utilizó también fluido del rumen fresco esterilizado por filtración como se recomienda en Leedle y Haspel, (1980). Del tubo con las bacterias acetogénicas se transfirieron a un frasco de 250 ml con tapón, sello de aluminio y 100 ml de medio de cultivo, 100 microlitros del inóculo de *Ruminococcus schinkii*. Una vez inoculados los frascos con los medios se presurizaron con CO<sub>2</sub> a 200 Kpa, y se colocaron sellos de aluminio; se incubaron a 39°C por 24 horas para luego realizar el conteo de acetogénicas por el método del número más probable (NMP), de acuerdo al método propuesto por Dehority *et al.*, (1989). Después del conteo se realizó una dilución hasta alcanzar la concentración de 2.5x10<sup>5</sup> UFC/ml. Todos los tubos se almacenaron a una temperatura de 0°C hasta su uso.

### Los animales y sus condiciones de alimentación

Se utilizó tres machos cabríos criollos de un año de edad con un peso promedio de 28 Kg obtenidos de un hato criado extensivamente, en el municipio de Tecomán Colima, México (Balch *et al.*, 1979) y mantenidos en jaulas metabólicas en el área de experimentación. Los animales fueron castrados, desparasitados y vitaminados con ADE. También fueron fistulados y equipados con cánula ruminal permanente, de acuerdo a lo sugerido por Harmon y Richards, (1997). Posteriormente se colocaron en jaulas metabólicas acondicionadas con comederos, bebederos y charola para remoción de excretas. Los animales se alimentaron con una dieta isocalórica e isoproteica, en la cual, la fuente de forraje varió para cada animal; a unos se le alimentó con una dieta base más forraje de maíz, a otro con la misma dieta más sorgo y

al último con la dieta igual más heno de alfalfa. Antes de su utilización para la fase de experimentación los animales fueron adaptados a la dietas por un periodo de 30 días. La dieta base para cada animal se hizo a partir de 200 g de melaza de caña de azúcar, 200 g de sorgo molido, 10 g de Urea y 10 g de sales minerales. Una cantidad de 420 g de esta dieta base fueron mezclados con 1600 g de cada uno de los tres forrajes molidos. A los 30 días después de que los animales fueron alimentados por un solo tipo de forraje, se les cambio por el segundo, para luego alimentar con el tercer forraje al que no se habían expuesto. Lo anterior con el fin de que los tres animales presentares cantidades similares de flora microbiana y tratar de homogenizar el inóculo fúngico.

### Obtención del inóculo

La obtención del inóculo de hongos se realizó durante cada uno de los tres periodos de adaptación de los animales a la dieta que correspondió a la misma dieta base y los tres tipos de forraje diferente y que se obtuvieron en los meses de septiembre, octubre y noviembre del mismo año. Las dietas fueron rotadas para cada uno de los tres periodos tal y como se recomienda en Takahashi *et al.*, (1997). De cada animal fueron tomas las muestras 20 g de digesta de rumen dos horas después del suministro del alimento del día. La muestra se tomó por medio de succión con jeringa adaptada a una manguera de caucho. Cada una de las muestras fueron colocadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad previamente calentado a una temperatura de 39°C y gaseado con CO<sub>2</sub> libre de oxígeno de acuerdo a Hungate, (1969) y bajo esas condiciones se trasladaron al laboratorio. En el laboratorio cada muestra se colocó dentro de una bolsa de nylon de 4x5 cm y se introdujeron dentro del matraz Erlenmeyer con el medio de cultivo de formado a base de celobiosa, almidón y glucosa como fuente de carbono; los componentes del medios se aforaron a 200 ml con agua destilada y se ajustó el pH de acuerdo a las recomendaciones de Purser y Moir, (1959).

### **Evaluación del efecto del sustrato, sobre la actividad acetogénica de *Ruminococcus schinkii***

Para esta evaluación se formaron siete grupos de 24 botellas de suero de 100 ml (Supelco, 1997; No. Cat., 910-0472). A cada botella de cada uno de los grupos se le adicionó 50 ml de medio de cultivo de Joblin, (1981), preparado en solución de ácido 2 bromoetanosulfónico a una concentración de 0.003 M según lo descrito en Nollet, Demeyer y Verstraete, (1997), más 100 mg de uno de los forrajes a evaluar, ya sea sorgo, maíz o alfalfa. Las botellas se taparon con tapón de hule y sello de aluminio y se esterilizaron a una temperatura de 120°C durante 15 minutos en autoclave. Después los medios contenidos en las botellas de cada uno de seis grupos se les adicionó 1 ml de una suspensión de esporas de hongos del rumen de caprinos a la concentración de  $1 \times 10^3$  esporas por ml. Posteriormente todas las botellas se incubaron a 30°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo a cada una de las botellas inoculadas con esporas de hongos del rumen, se les adicionó 1 ml de inóculo de la bacteria acetogénica *Ruminococcus schinkii* estandarizado a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  UFC como se menciona en Morvan, Bonnemoy *et al.*, (1996). A tres grupos de 24 botellas con medio de Joblin, más forraje no se les adicionó ni hongos, ni bacterias y se consideraron como blanco. Todas las botellas inoculadas y no inoculadas se incubaron a una temperatura de 39°C durante 144 horas. Este mismo procedimiento experimental se repitió tres veces en tres periodos y correspondieron a cada uno de los cambios de sustratos usados en la alimentación de las cabras.

#### **Diseño experimental**

El estudio se realizó bajo la norma de distribución de tratamientos de un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $3 \times 2 \times 6$ ; donde el factor A= correspondió a tres diferentes sustratos de forraje; el factor B= a los tratamientos con hongos solos y hongo más bacteria acetogénica y el factor C= lo constituyeron 6 tiempos de incubación (0, 24, 48, 72, 96 y 144

horas), cada tratamiento combinado se realizó con cuatro repeticiones y tres periodos.

#### **Variables**

Las variables consideradas en este estudio la degradación de la materia seca (%DMS); concentración de azúcares reductores (expresado en mg por 100 ml de medio de cultivo; concentración de acetato en el medio (expresada en M por 100 ml de medio) y los valores de pH.

#### **Resultados y Discusión**

En este estudio se evaluaron el efecto de tres tipos de forraje, el de los microorganismos y el tiempo de incubación, sobre la actividad acetogénica *In Vitro* de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen de caprinos, con base a la producción de acetato, azúcares reductores, digestibilidad de la materia seca y valores de pH. Por lo cual la actividad de las bacterias metanogénicas fue inhibida por medio de la adición de ácido 2 bromoetanosulfónico al medio de cultivo.

#### **El efecto del sustrato, sobre la degradación de la materia seca concentración de acetato, azúcares reductores y valores de pH por la actividad acetogénica de *Ruminococcus schinkii* y los hongos del rumen.**

El tipo de sustrato afectó la degradación de la materia seca, azúcares reductores y valores de pH por la actividad acetogénica de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen ( $p < 0.001$ ). Del mismo modo se encontraron diferencias con respecto a sus interacciones S X TI, M X TI, PI X TI ( $p < 0.0001$ ). No se observan diferencias en entre los periodos de experimentación ( $p = 0.5812$ ), entre repeticiones ( $p < 0.7652$ ). Las pruebas de separación de medias del porcentaje de DMS para cada uno de los tres forrajes muestra que con los sustratos maíz y sorgo se presentó mayor degradación de materia seca con valores de 45.55 y 41.71 respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos y en segundo niveles el sustrato alfalfa con 42.83% (Cuadro 1).

**Cuadro 1.**  
**Separación de promedios de producción de acetato, DMS, producción de azúcares reductores y valores de pH para los tres sustratos**

Sustrato	Acetato (Mol)	DMS (%)	Azúcares reductores (mg%)	Valores de pH
Maíz	0.624 <sup>a</sup>	45.55 <sup>a</sup>	21.89 <sup>b</sup>	6.4307 <sup>a</sup>
Sorgo	0.360 <sup>a</sup>	45.71 <sup>b</sup>	22.72 <sup>b</sup>	6.3969 <sup>c</sup>
Alfalfa	0.425 <sup>a</sup>	42.83 <sup>b</sup>	34.70 <sup>a</sup>	6.4171 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letra diferente en la columna, son significativamente diferentes ( $P$  menor que 0.05 prueba de Tukey).

La producción de azúcares reductores de la actividad acetogénica *in Vitro* de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos medidos en mg/100 ml de medio, mostró diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ), de igual manera todas las interacciones ( $p < 0.0001$ ). La prueba de comparación de promedios separó al sustrato alfalfa, como el más sobresaliente en cuanto a la producción de azúcares reductores; en segundo nivel de producción lo ocupan el maíz y el sorgo sin diferencias estadísticas entre ellos (Cuadro 1). La producción de acetato, medido en Moles por 100 ml de medio, no presenta diferencias significativas entre los tres sustratos ( $p = 0.3417$ ). La prueba de separación de medias no indica diferencias en la producción de acetato, para ninguno de los tres forrajes evaluados (Cuadro 1). Los valores de pH presentan diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ). La prueba de separación de medias separó al sustrato maíz como el del valor de pH, más so-

bresaliente, en segundo lugar a la alfalfa y por último al sorgo (Cuadro 1).

**El efecto microorganismo, sobre la actividad acetogénicas *in Vitro* de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen.**

Se encontraron efectos significativos con los microorganismos para todas las variables ( $p < 0.0001$ ). No se observan diferencias en cuanto a las repeticiones ni el periodo de experimentación. Las pruebas de separación de medias muestran que con el sustrato alfalfa, la interacción de la bacteria acetogénica y los hongos del rumen, fue la más sobresaliente, con respecto al tratamiento del hongo para %DMS junto con la producción de azúcares reductores. La concentración de acetato fue mayor para el sorgo seguida por el maíz. Los valores de pH fueron menores para la alfalfa (Cuadros 2, 3 y 4).

**Cuadro 2.**  
**Pruebas de separación de medias del efecto microorganismo, para los promedios de acetato, DMS, azúcares reductores y valores de pH en el sustrato maíz**

Tratamiento	Acetato	DMS	Azúcares reductores	Valores de pH
Hongos solos	0.3691 <sup>b</sup>	49.482 <sup>b</sup>	30.90 <sup>b</sup>	6.4967 <sup>b</sup>
Hongos más <i>Ruminococcus schinkii</i>	0.5493 <sup>a</sup>	57.202 <sup>a</sup>	37.37 <sup>a</sup>	6.4183 <sup>a</sup>

Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente ( $P$  menor de 0.05, prueba de Tukey).

**Cuadro 3.**  
**Pruebas de separación de medias del efecto microorganismo, para los promedios de acetato, DMS, azúcares reductores y valores de pH en el sustrato sorgo**

Tratamiento	Acetato	DMS	Azúcares reductores	Valores de pH
Hongos	0.3501 <sup>b</sup>	41.45 <sup>b</sup>	23.73 <sup>b</sup>	6.407 <sup>b</sup>
Hongos más <i>Ruminococcus schinkii</i>	0.5787 <sup>a</sup>	43.35 <sup>a</sup>	26.92 <sup>a</sup>	6.395 <sup>a</sup>

Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente (*P* menor de 0.05, prueba de Tukey).

**Cuadro 4.**  
**Pruebas de separación de medias del efecto microorganismo, para los promedios de acetato, DMS, azúcares reductores y valores de pH para el sustrato alfalfa**

Tratamiento	Acetato	DMS	Azúcares reductores	Valores de pH
Hongos	0.3576 <sup>b</sup>	40.32 <sup>b</sup>	18.30 <sup>b</sup>	6.4317 <sup>b</sup>
Hongos más <i>Ruminococcus schinkii</i>	0.4576 <sup>a</sup>	62.80 <sup>a</sup>	48.06 <sup>a</sup>	6.3536 <sup>a</sup>

Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente (*P* menor de 0.05, prueba de Tukey).

**Efecto del tiempo de incubación, sobre la actividad acetogénica de *Ruminococcus schinkii* en interacción con hongos del rumen**

Se encontraron efectos significativos para el tiempo de incubación para todas las variables. No se observa efecto significativo en cuanto a las repeticiones ni el periodo de expe-

rimentación. Para los sustratos maíz y sorgo, el mayor %DMS se observa en el tiempo de 96 h y para la alfalfa 120 h. Los azúcares reductores se produjeron más en el tiempo 144 h para los tres sustratos. El tiempo 72 h fue el de mayor producción de acetato en el maíz, en el sorgo de 96 y en la alfalfa el tiempo 120 h. Los valores de pH fueron mayores para el tiempo de 0 h.

**Cuadro 5.**  
**Pruebas de separación de medias para las variables estudiadas en los tiempos de incubación para el sustrato maíz**

Tiempo	DMS	Azúcares reductores	Acetato	Valores de pH
0	15.922 <sup>c</sup>	6.620 <sup>d</sup>	0.1270 <sup>c</sup>	6.4625 <sup>a</sup>
48	41.360 <sup>b</sup>	21.51 <sup>c</sup>	0.5864 <sup>a</sup>	6.3760 <sup>b</sup>
72	45.55 <sup>a</sup>	32.36 <sup>b</sup>	0.5687 <sup>a</sup>	6.4050 <sup>b</sup>
96	46.360 <sup>a</sup>	36.13 <sup>a</sup>	0.5356 <sup>a</sup>	6.3987 <sup>b</sup>
120	45.102 <sup>b</sup>	37.26 <sup>a</sup>	0.5492 <sup>a</sup>	6.3887 <sup>b</sup>
144	44.028 <sup>b</sup>	38.66 <sup>a</sup>	0.4975 <sup>b</sup>	6.3075 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente (*P* menor de 0.05, prueba de Tukey). El tiempo es en horas.

**Cuadro 6.**  
**Pruebas de separación de medias para las variables estudiadas en los tiempos de incubación para el sustrato sorgo**

Tiempo	DMS	Azúcares reductores	Acetato	Valores de pH
0	14.679 <sup>d</sup>	6.856 <sup>c</sup>	0.079 <sup>c</sup>	6.5 <sup>a</sup>
48	34.826 <sup>c</sup>	26.67 <sup>c</sup>	0.504 <sup>a</sup>	6.3875 <sup>b</sup>
72	45.669 <sup>b</sup>	29.90 <sup>a</sup>	0.582 <sup>a</sup>	6.4263 <sup>b</sup>
96	47.316 <sup>b</sup>	31.82 <sup>a</sup>	0.589 <sup>a</sup>	6.4437 <sup>b</sup>
120	52.721 <sup>b</sup>	32.98 <sup>a</sup>	0.583 <sup>a</sup>	6.4900 <sup>b</sup>
144	58.302 <sup>b</sup>	33.88 <sup>a</sup>	0.464 <sup>b</sup>	6.4487 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente ( $P$  menor de 0.05, prueba de Tukey). El tiempo es en horas.

**Cuadro 7.**  
**Pruebas de separación de medias para las variables estudiadas en los tiempos de incubación para el sustrato alfalfa**

Tiempo	DMS	Azúcares reductores	Acetato	Valores de pH
0	14.026 <sup>c</sup>	6.856 <sup>d</sup>	0.0444 <sup>c</sup>	6.5 <sup>a</sup>
48	39.013 <sup>b</sup>	45.97 <sup>c</sup>	0.5108 <sup>b</sup>	6.440 <sup>b</sup>
72	48.962 <sup>a</sup>	47.87 <sup>a</sup>	0.5437 <sup>b</sup>	6.325 <sup>c</sup>
96	49.375 <sup>a</sup>	48.30 <sup>a</sup>	0.5858 <sup>a</sup>	6.391 <sup>c</sup>
120	54.45 <sup>a</sup>	53.33 <sup>a</sup>	0.5945 <sup>a</sup>	6.392 <sup>c</sup>
144	53.722 <sup>b</sup>	53.72 <sup>a</sup>	0.5660 <sup>b</sup>	6.392 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente ( $P$  menor de 0.05, prueba de Tukey). El tiempo es en horas.

El avance en el conocimiento de la inhibición del metano en el rumen y sus efectos revelan que los métodos propuestos en forma de aditivos alimentarios no son totalmente efectivos, porque ocasionan una disminución en la digestibilidad de los alimentos ricos en paredes celulares, disminuyen la flora bacteriana, afecta la calidad de los productos de origen animal para consumo humano, contaminan el ambiente y no son de uso práctico (Li, y Kelliher, 2007; Goel, Makkar y Becker, 2009; Neves, Oliveira y Alves, 2009; McGeough *et al.*, 2010). La idea de un inhibidor del metano es de aquel que

deba ser extremadamente específico para inhibir este compuesto, debe presentar una acción permanente a largo plazo, no ser tóxico para el animal y que no presente efecto residual en los alimentos para consumo humano.

Las características histológicas y químicas de los componentes de las paredes celulares de los forrajes, son las responsables en la baja degradación en el rumen. Los hongos colonizan los tejidos vegetales de la dieta en cinco minutos y posteriormente la degradan (Edwards *et al.*, 2008), por lo tanto los mayores

productores de hidrógeno y aunque las bacterias acetogénicas están presentes en el rumen, no existe conocimiento de los factores que intervienen en su establecimiento e interacciones con las bacterias utilizadoras de hidrógeno, sobre todo la escasez del conocimiento es su interacción. Lo anterior permitió plantear la hipótesis de que existe una interacción positiva entre hongos aislados del rumen y bacterias acetogénicas aisladas del mismo origen, y que esta interacción promueve la acetogénesis reductiva *in Vitro* con variaciones en diferentes parámetros fermentativos como son el tipo de sustrato, los microorganismos, el tiempo de incubación y los productos de fermentación como son los azúcares reductores, el acetato y los cambios en el pH del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que el tipo de sustrato afecta significativamente la cantidad de materia seca degradada y que con los sustratos de maíz y sorgo el porcentaje de degradación es mayor que el del sustrato alfalfa, lo que según Wilson, (1993), es debido a que la alfalfa contiene una composición diferente en cuanto a compuestos de tipo fenólico originados a partir de las ligninas y que inhiben la acción de varios microorganismos. También se encontró que el tipo de sustrato afecta la producción de azúcares reductores por la acción de los microorganismos; siendo la alfalfa con la cual se liberó más azúcares reductores que con el sorgo y maíz. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Fondevila y Dehority, (1996), quienes encuentran en una co-cultivo con hongos y bacterias valores iguales a los encontrados en este estudio. En lo que respecta al efecto del sustrato sobre la producción de acetato lo anterior puede ser debido a que las bacterias acetogénicas presentan metabolismo mixotrófico, lo que significa que pueden sintetizar acetato a partir de azúcares reductores o también a partir de hidrógeno y CO<sub>2</sub> tal como se menciona en Dieker y Wohlfarth, (1994); Rieu-Lesme, Fonty y Doré, 1995; Nolle, Demeyer y Verstraete, (1997) .

Los resultados coinciden con los publicados por Sekine *et al* (1995) , quien no encuentra diferencia significativa entre la produc-

ción de acetato por los hongos del rumen y tres tipos de sustrato y concluye que es la constitución química y la morfología de las paredes celulares de los forrajes los que afectan la producción de acetato. En cuanto al efecto del sustrato sobre los valores de pH del medio el valor más alto se presentó en el sustrato maíz y el más bajo en alfalfa; sin embargo, se hace necesario señalar que el rango de los valores de este estudio en los tres sustratos de 6.4397 y 6.3968, respectivamente son valores que se presentan como rango obtenido en la variación del equipo utilizado durante la medición que es de un valor de pH de 0.2. Lo anterior hace suponer que no hay variación significativa del pH por efecto del cambio potencial de hidrógeno del proceso fermentativo de los sustratos en el medio de cultivo y que la capacidad de amortiguamiento del hidrógeno por la interacción del hongo y la bacteria acetogénica o los constituyentes reguladores del pH, del medio logran equilibrar este valor.

En cuanto al efecto microorganismo sobre la actividad acetogénica *in Vitro* de *Ruminococcus schinkii* en interacción con los hongos del rumen los resultados muestran que el tratamiento formado por la interacción entre ellos, fue significativo para todas las variables evaluadas, excepto para el valor de pH en el sustrato sorgo. Se observa mayor producción de acetato y un aumento en la desaparición de materia seca, así como la producción de azúcares reductores. Los resultados encontrados en este estudio coinciden con Rieu-Lesme *et al.*, (1996) y Hodrova *et al.*, (1995). En contraste no está acorde con lo publicado por Bernalier *et al.*, (1993), quienes reportan una desaparición de la materia seca en el tratamiento formado por hongos del rumen con la bacteria acetogénica *Eubacterium limosum* más hongos del rumen. Los autores le atribuyen este efecto a la habilidad de esta especie aislada del rumen en cuanto a su capacidad de captación del hidrógeno. Lo anterior es posible también porque la actividad de los hongos del rumen es inhibida por la acumulación de metabolitos en el medio de cultivo, tales como el hidrógeno coenzimas y compuestos aromáticos durante la degrada-

ción de los sustratos, tal como lo mencionan Rieu-Lesme, Fonty y Doré, (1995).

Por otro lado autores como Williams, Withers y Joblin, (1994) menciona que estudios sobre la capacidad de de las bacterias acetogénicas de usar estos metabolitos secundarios tanto como fuente de carbono y energía, como es el caso de la interacción evaluado entre *Ruminococcus flavofaciens* y *Acetivumaculum ruminis* queda demostrada al maximizar la degradación del xilano. El mismo efecto estimulante, pero con otra cepa acetogénica ha sido reportada por Morvan *et al.*, (1994), quienes detectan que en presencia de bacterias actogénicas ser 8 y el hongo del rumen *Neocallimastix frontales* MCH3 un incremento en la desaparición de la celulosa. En este estudio no fue posible cuantificar la concentración de hidrógeno, ni del metano producido por los microorganismos del rumen en el medio de cultivo con los diferentes tratamientos como lo hacen Greening y Leedle, (1989) sin embargo, se demuestra que el aumento en la producción de acetato y azúcares reductores y el aumento en la desaparición de la materia seca, fue ocasionado por el efecto de co-cultivación de dos microorganismo evaluados. Por lo que se hace necesario más investigaciones que demuestren específicamente el reciclaje del hidrógeno entre los microorganismos, en cuanto a la reorientación de la fermentación de los sustratos hacia una vía metabólica diferente a la síntesis del metano y que en el caso de la acetogénesis es la síntesis de acetato.

En la evaluación del efecto del tiempo de incubación, sobre la actividad acetogénica de *Ruminococcus schinkii* en interacción

con hongos del rumen en base a la producción de las variables estudiadas los resultados no coinciden con los de Bernalier *et al.*, (1993); Morvan *et al.*, (1996a) y Grenet *et al.*, (1989) sin embargo, en estos estudios los sustratos son celulosa pura y no forrajes enteros molidos. De acuerdo con Kamra, (2005), en este estudio no fue posible identificar los hongos estudiados y aunque la cepa acetogénica fue aislada e identificada por su descubridor, es necesario el uso de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de los microorganismos que intervinieron en la fermentación de los sustratos evaluado. Tampoco fue posible determinar el umbral de captación del hidrógeno por la bacteria acetogénica por lo que investigaciones que incluyan este valore también son necesarias.

### Conclusiones

Los hongos colonizaron y degradaron los sustratos, produciendo metabolitos entre ellos azúcares reductores, hidrógeno, dióxido de carbono y acetato mismos que fueron utilizados por la cepa acetogénica produciendo en función del tipo de forraje, el tiempo de incubación y el pH, mayor actividad acetogénica de la cepa *Ruminococcus schinkii*, lo que ocasionó una mayor %DMS y un aumento en la concentración acetato en respuesta a la interacción metabólica con los hongos aislados del rumen. Se confirma que la capacidad de los hongos de degradar las fibras vegetales y potencializar su actividad fermentativa, cuando está en interacción con bacteria acetogénicas lo que permite un mejor aprovechamiento de energía del alimento, una reorientación del metabolismo microbiano y la posibilidad de evitar la metanogénesis en el rumen.

### Literatura Citada

- Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS. Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. *Microbiology Reviews* 1979; 260-296.
- Benchaar C, Rivest J, Pomar C, Chiquette J. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanistic models and regression equations. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 617-27.

- Bernalier A, Fonty G, Bonnemoy F, Gouet P. Effect of *Eubacterium limosum*, a ruminal hydrogenotrophic bacterium, on the degradation and fermentation of cellulose by 3 species of rumen anaerobic fungi. *Reproduction Nutrition Development* 1993; 33: 577-84.
- Brauman A, Kane MD, Labat M, Breznak JA. Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites. *Science* 1992; 257: 1384-7.
- Breznak JA, Brune A. Role of Microorganisms in the Digestion of Lignocellulose by Termites. *Annual Review of Entomology* 1994; 39: 453-487.
- Breznak J A, Switzer JM. Acetate Synthesis from H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> by Termite Gut Microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 1986; 52: 623-630.
- Buddle BM, Denis M, Attwood GT, Altermann E, Janssen PR, Ronimus RS, *et al.* Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *Veterinary Journal* 2010.
- Anuario estadístico del Estado de Colima 2005.
- Cord Ruwisch R, Hans Jürgen S, Conrad R. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology* 1988; 149: 350-357.
- Czerkawski JW, Breckenridge G. New inhibitors of methane production by rumen micro-organisms. Development and testing of inhibitors in vitro. *British Journal of Nutrition* 1975; 34: 429-46.
- Christophersen CT, Wright AD, Vercoe PE, In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. *Journal of Animal Science* 2008; 86: 384-389.
- Dehority BA, Khaled el S, Johnson RR. Studies with the Cellulolytic Fraction of Rumen Bacteria Obtained by Differential Centrifugation. *Journal Animal Science* 1960; 19: 1098-1109.
- Edwards PP, Kuznetsov VL, David WI, Brandon NP. Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future. *Energy Policy* 2008; 36: 4356-4362.
- Fondevila M, Dehority BA. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *Journal Animal Science* 1996; 74: 678-684.
- Goel G, Arvidsson K, Vlaeminck B, Bruggeman G, Deschepper K, Fievez V. Effects of capric acid on rumen methanogenesis and biohydrogenation of linoleic and -linolenic acid. *Animal* 2009a; 3: 810-816.
- Goel G, Harinder P, Makkar S, Becker K. Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *British Journal of Nutrition* 2009b; 101: 1484-1492.
- Greening RC, Leedle AZ. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. Nov. Acetogen bacteria from the bovine rumen. *Archives Microbiology* 1989; 151: 399-406.

- Grenet E, Breton A, Barry P, Fonty G. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Animal Feed Science Technology* 1989; 26: 55-70.
- Gworgwor ZA, Mbahi TF, Yakubu B. Environmental Implications of Methane Production by Ruminants: A Review. *Journal of Sustainable Development in Agriculture and Environment* 2006; 2: 1-14.
- Harmon DL, Richards CJ. Considerations for Gastrointestinal Cannulations in Ruminants. *Journal Animal Sciences* 1997; 75: 2248-2255.
- Hungate RE. *The rumen and its microbes*. Academic press New York 1966; 221.
- Hungate RE, Norris JR, Ribbon DW. (Eds) *Methods in Microbiology*. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Academic Press. London, New York 1969; 7: 1-32.
- Joblin KN. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied Environmental Microbiology* 1981; 42: 191-122.
- Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. *Journal Animal Science* 1995; 73: 2483-92.
- Jones JG, Simon BM. Interaction of acetogens and methanogens in anaerobic freshwater sediments. *Applied Environmental Microbiology* 1985; 49: 944-948.
- Kamlage B, Gruhl B, Blaut M. Isolation and Characterization of Two New Homoacetogenic, Hydrogen-Utilizing Bacteria from the Human Intestinal Tract. That Are Closely Related to *Clostridium coccoides*. *Applied and Environmental* 1997; 63: 1732-1738.
- Kamra DN. Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 2005; 89: 124-135.
- Karnati SK, Yu Z, Firkins JL. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. II. Interaction of treatment and presence of protozoa on prokaryotic communities. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 3861-73.
- Kebreab E, Dijkstra J, Bannink A, France J. Recent advances in modeling nutrient utilization in ruminants. *Journal of Animal Science* 2009; 87: E111-22.
- Kone P, Machado PF, Cook RM. Effect of the combination of monensin and isoacids on rumen fermentation in vitro. *Journal Dairy Science* 1989; 72: 2767-71.
- Koneswaran G, Nierenberg D. Global farm animal production and global warming: impacting and mitigating climate change. *Environ Health Perspect* 2008; 116): 578-82.
- Krumholz L, Steve R, Harris H, Stephen T, Tay, Suflita JM. Characterization of Two Subsurface H<sub>2</sub>-Utilizing Bacteria, *Desulfomicrobium hypogaeum* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and Their Ecological Roles. *Applied Environmental Microbiology* 1999; 65: 2300-2306.
- Liu S, Suflita JM. H<sub>2</sub> as an energy source for mixotrophic acetogenesis from the reduction of CO<sub>2</sub> and syringate by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*. *Current Microbiology* 1995; 31: 245-250.

- Mbanzamihiho L, Van Nevel CJ, Demeyer DI. Lasting effects of monensin on rumen and caecal fermentation in sheep fed a high grain diet. *Animal Feed Science and Technology* 1995; 62: 215-228.
- Mc Geough EJ, O'Kiely P, Foley PA, Hart KJ, Boland TM, Kenny DA. Methane emissions, feed intake, and performance of finishing beef cattle offered maize silages harvested at 4 different stages of maturity. *Journal of Animal Science* 2010; 88: 1479-1491.
- McAllister TA, Okine EK, Mathison WG, Cheng KJ. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 1996; 76:231-243.
- Miramontes Carrillo JM, Ibarra AJ, Ramírez RM, Ibarra AF, Miramontes VA, Lezama GR. Population bacteria H<sub>2</sub>-Utilizing, from gastrointestinal tract of *Struthius camellus* (Var. domesticus). *Avances en Investigación Agropecuaria* 2008; 12: 43-54.
- Morvan B, Bennemoy F, Fonty G, Gouet P. Quantitative Determination of H<sub>2</sub>-Utilizing Acetogenic and Sulfatoreducing Bacteria and Methanogenic Archae from Digestive Tract of Different Mammals. *Current Microbiology* 1996a; 32: 129-133.
- Morvan B, Rieu Lesme F, Fonty G, Gouet P. *In vitro* Interaction between Rumen H<sub>2</sub> utilizing Acetogenic and Sulfate-Redicing Bacteria. *Anaerobe* 1996; 2: 175-180.
- Morvan B, Rieu-Lesme F, Founcat L, Fonty G, Gouet P. Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lam. *FEMS Microbiology Letters* 1994; 117: 249-256.
- Neves L, Oliveira R, Alves MM. Co-digestion of cow manure, food waste and intermittent input of fat. *Bioresource Technology* 2009; 100: 1957-1962.
- Nollet L, Demeyer D, Verstraete W. Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63: 194-200.
- Parameswaran P, Torres CI, Hyung-Sool L, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): The role of homo-acetogenic bacteria. *Bioresource Technology*. In Press, Corrected Proof. 2010.
- Patra AK, Saxena J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 2010; 71: 1198-1222.
- Phelps TJ, Zeikus JG. Influence of pH on Terminal Carbon Metabolism in Anoxic Sediments from a Mildly Acidic Lake. *Applied and Environmental Microbiology* 1984; 48: 1088-1095.
- Purser DB, Moir RJ. Ruminal flora studies in the sheep. IX. The effect of pH on the cicliate population of the rumen in vivo. *Australian Journal of Agricultural Research* 1959; 10: 555-564.
- Rey FE, Faith JJ, Bain J, Muehlbauer MJ, Stevens D, Newgard CB, *et al.* Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. *Journal Biological Chemistry* 2010; 285: 22082-90.

- Rieu-Lesme F, Fonty G, Doré J. Isolation and characterization of a new hydrogen-utilizing bacterium from the rumen. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 125: 77-82.
- Sekine J, Shinoda M, Kamel HE, Oura R. Effect of kinds of hay on population densities of rumen anaerobic fungi. *Indian Journal of Animal Science* 1995; 65: 1352-1355.
- Siegford JM, Powers W, Grimes-Casey HG. Environmental Aspects of Ethical Animal Production. *Poultry Science* 2008; 87: 380-386.
- Takahashi J, Chaudhry AS, Beneke RG, Young BA. Modification of methane emission in sheep by cysteine and a microbial preparation. *Science of The Total Environment* 1997; 204: 117-123.
- Van Nevel CJ, Demeyer DI. Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring Assessment* 1996; 42: 73-97.
- Williams AG, Withers SE, Joblin KN. The effect of cultivation with hydrogen-consuming bacteria on xylanolysis by *Ruminococcus flavefaciens*. *Current Microbiology* 1994; 29: 133-138.
- Xu K, Liu H, Chen J. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion. *Bioresource Technology* 2010; 101: 2600-2607.
- Yang J, Speece RE. The effects of chloroform toxicity on methane fermentation. *Water Research* 1986; 20: 1273-1279.