



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECA GENÓMICA A PARTIR DE MICROBIOTA  
RUMINAL BOVINA Y SU APLICACIÓN EN LA SELECCIÓN DE GENES QUE  
CODIFIQUEN ENZIMAS QUE DEGRADEN LIGNINA Y CELULOSA**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA**  
**LAURA PIÑA GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL**  
LUIS CORONA GOCHI, FMVZ-UNAM  
**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
JUAN MIRANDA RÍOS, IIB-UNAM  
ROGELIO ALONSO MORALES, FMVZ-UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO**

**MAYO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

*Con especial cariño, a los jóvenes investigadores dedicados al estudio del microbioma ruminal, para que este trabajo sea ejemplo de lo que podrían o no hacer en el desarrollo de sus investigaciones.*

## Agradecimientos

Primeramente, al Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal, UNAM por permitirme continuar con mi formación académica

Este proyecto fue realizado gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) con los proyectos **IN226216** e **IN205818**. Asimismo, con el apoyo otorgado por los Fondos Federales de la Secretaría de Salud, proyecto **036/2015**.

A CONACyT por la beca otorgada para alumnos de Maestría con número de CVU: 787298

A los doctores Luis Corona Gochi, Claudia Cecilia Márquez Mota y Juan Miranda Ríos, con especial cariño, por su apoyo y confianza en mí en la realización de esta investigación, así como por siempre mantener su disposición e interés en el desarrollo de este trabajo.

A los doctores Rogelio Alejandro Alonso Morales y Daniel Martínez Gómez por las críticas constructivas recibidas para este proyecto.

A la química Martha Elva Pérez Andrade, por sus enseñanzas, paciencia y amabilidad en el desarrollo de la biblioteca genómica.

A los doctores Nimbe Torres y Torres y Armando Tovar Palacio y a la M. C. Mónica Tod Curie Sánchez Tapia del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo en la caracterización de la microbiota ruminal.

Al doctor Otoniel Maya Lucas por su ayuda en el análisis bioinformático.

A los trabajadores, docentes y administrativos del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción y Salud Animal, CEPIPSA, por su apoyo y cooperación en el alojamiento de los bovinos. Así como a los bovinos que participaron en el experimento

A los académicos participantes en mi formación académica durante el posgrado, por su vocación y enseñanzas.

A los estudiantes de los grupos de investigación de los doctores Corona Gochi, Márquez Mota, Castrejón Pineda y Romero Pérez, por su amistad, apoyo, buen humor e ideas durante el desarrollo del proyecto de tesis.

A mi esposo Alexandro Fuentes y a mi perrita Hope por su cariño y apoyo antes, durante y al término de este proceso. Por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía.

A mi madre Olivia González y hermana Marna Piña por su apoyo, guía y continuo fomento a mi desarrollo profesional, académico y personal.

A mis amigos Linaloe Manzano y Guillermo Maldonado por su cariño, comprensión, apoyo y buen humor durante el desarrollo del proyecto y escritura de la tesis.

A mi maestra Walky Ardaat por su guía para encontrar y proyectar una mejor versión de mí misma.

## Resumen

Los residuos lignocelulósicos, como lo son los esquilmos agrícolas, representan una de las fuentes orgánicas más abundantes y renovables del mundo y aunque representan un recurso económico y accesible en la alimentación de rumiantes, su aprovechamiento y digestibilidad se ven limitados debido a la interacción de los carbohidratos estructurales presentes con la lignina impactando en la capacidad productiva del animal. Mundialmente existe una necesidad por encontrar nuevos microorganismos degradadores del complejo lignocelulósico de forma eficiente, así como identificar posibles consorcios microbianos para mejorar la digestibilidad de esquilmos agrícolas por los rumiantes y para otras aplicaciones industriales como la obtención del bioetanol.

Los objetivos del presente trabajo fueron la construcción de una biblioteca genómica para la búsqueda de nuevos genes que degraden lignina-celulosa y la identificación de microorganismos ruminales a través de la secuenciación del gen 16S ARNr para determinar las relaciones filogenéticas que se presentan con una dieta a base de un forraje muy lignificado como el rastrojo de maíz (RM) en bovinos. Para tales propósitos se ocupó el líquido ruminal de bovinos alimentados bajo dos diferentes dietas: la primera consistió en ensilado de maíz y heno de avena (50:50 Materia seca) (DB) mientras que la segunda, administrada por 45 días, consistió en RM, premezcla mineral y agua *ad libitum*. El líquido ruminal se colectó mediante una sonda esofágica antes de la dieta con RM y al finalizar el periodo de alimentación con RM.

En cuanto al primer objetivo, la construcción de la biblioteca genómica se realizó mediante la clonación de fragmentos de ADN en el vector pEpiFOS-5. La extracción del ADN se realizó mediante kits comerciales basados en la lisis celular y en la purificación por columnas. La biblioteca fue probada en medios selectivos para evaluar si los genes presentes en las clonas codificaban a proteínas con actividad enzimática sobre la celulosa, lignina y los componentes aromáticos

presentes en ésta. El tamizaje en los medios selectivos resultó altamente sensible para identificar clonas con una alta actividad celulolítica en donde más del 80% de las clonas presentaron la actividad. Por otra parte, el número de clonas empleadas no fue suficiente para identificar una clona capaz de crecer con lignina como única fuente de carbono. En conclusión, la metodología empleada no permitió la selección de una clona con actividad en la degradación y/o modificación de la lignina. Es necesario aumentar el número de clonas a probar, y estandarizar nuevos medios selectivos para determinar si los genes presentes en el medio están involucrados con los procesos catalíticos de la lignina.

Para cubrir el segundo objetivo, se utilizó ADN extraído del líquido ruminal colectado durante los dos periodos. La extracción fue por medio del método CTAB. El análisis del 16s ARNr se realizó en la plataforma Miseq de Illumina usando oligonucleótidos cebadores para las regiones V3 y V4. Los resultados generados se analizaron mediante los programas QIIME 1.9 y el efecto del tratamiento mediante un análisis de varianza, para un diseño completamente al azar utilizando el procedimiento MIXTO de SAS 9.1. La afiliación taxonómica de los datos metagenómicos mostró que ambas poblaciones están compuestas principalmente por los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacterias*. A nivel especie, las más abundantes con ambas dietas fueron *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella copri*, *Prevotella ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes*, *Bacillus coagulans*, *Bacteroides uniformis* y *Selenomonas ruminantium*. Con RM se observó un aumento significativo ( $P < 0.01$ ) en los microorganismos: *P. ruminicola*, *Streptococcus luteciae*, *Clostridium aminophilum*, *S. ruminantium* y *Pantoea agglomerans* y una disminución en *Propionibacterium acnes* y *B. ovatus*. Para esta sección, se concluye que la población microbiana del rumen se modifica con una dieta basada en forraje lignificado y que al administrar una dieta con un forraje más lignificado proliferan bacterias como *P. ruminicola*, *S. luteciae*, *C. aminophilum*, *S. ruminantium* y *P. agglomerans*.

**Palabras clave:** microbiota, rastrojo de maíz, bacterias fibrolíticas, rumiantes

## Abstract

Lignocellulosic waste, such as agricultural waste, represents one of the most abundant and renewable organic sources in the world and. It represents an economical and accessible resource in ruminant feeding. However, its use and digestibility are limited due to the interaction of structural carbohydrates present with lignin impacting the productive capacity of the animal. Throughout the world, it is necessary to find new microorganisms that efficiently degrade the lignocellulosic complex, as well as identify possible microbial consortiums to improve the digestibility of agricultural waste by ruminants and for other industrial applications such as obtaining bioethanol.

The aim of this work was the construction of a genomic library for the search of new genes that degrade lignin-cellulose and the identification of ruminal microorganisms through the sequencing of the 16S rRNA gene to determine the phylogenetic relationships that occur with a diet based on a very lignified fodder, such as corn stubble (RM) in cattle. Ruminal fluid from bovines fed two different diets was used: the first consisted of corn silage and oats hay (50:50 dry matter) (DB), while the second, administered for 45 days, consisted of RM, mineral premix and water *ad libitum*. Ruminal fluid was collected through an oesophageal tube before the RM diet and at the end of the feeding period with RM.

Regarding the first objective, the construction of the genomic library was carried out by means of the cloning of DNA fragments in the pEpiFOS-5 vector. DNA extraction was carried out using commercial kits based on cell lysis and purification by columns. The library was tested in selective media to evaluate if the genes present in the clones encoded a protein with enzymatic activity on cellulose, lignin and the aromatic components present in it. The selection in the selective media was highly sensitive to identify clones with a high cellulolytic activity in which more than 80% of the clones showed activity. On the other hand, the number of clones used was not enough to identify a clone capable of growing with lignin as the sole carbon



source. In conclusion, the methodology used did not allow the selection of a clone with positive activity for the degradation and / or modification of lignin. It is necessary to increase the number of clones to be analysed and to standardize new selective media to determine if the genes present in the medium are involved with the catalytic processes of lignin.

To cover the second objective, the DNA extracted from the ruminal fluid collected during the two periods was used. The extraction was performed by the CTAB method. The 16s rRNA analysis was performed on the Illumina Miseq platform using primers for the V3 and V4 regions. The results generated were analysed by the QIIME 1.9 and the effect of the treatment by means of an analysis of variance, for a completely randomized design using the MIXED procedure of SAS 9.1. The taxonomic affiliation of the metagenomic data showed that both populations are mainly composed of *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* phyla. At the species level, the most abundant with both diets were *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella copri*, *Prevotella ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes*, *Bacillus coagulans*, *Bacteroides uniformis* and *Selenomonas ruminantium*. RM showed a significant increase ( $P < 0.01$ ) in the microorganisms: *P. ruminicola*, *Streptococcus luteciae*, *Clostridium aminophilum*, *S. ruminantium* and *Pantoea agglomerans* and a decrease in *Propionibacterium acnes* and *B. ovatus*. For this section, it is concluded that the microbial population of the rumen is modified with a diet based on lignified forage and Feeding cattle with a diet with a more lignified forage like RM led to the proliferation of bacteria such as *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus luteciae*, *Clostridium aminophilum*, *Selenomonas ruminantium* and *Pantoea agglomerans*.

**Key words:** microbiota, corn stover, fibrolytic bacteria, ruminants

# Índice general

Contenido	
Introducción.....	- 1 -
Antecedentes.....	- 3 -
1.    Biomasa lignocelulósica.....	- 3 -
1.1.    Definición, composición y degradación bacteriana del complejo lignocelulósico.....	- 3 -
1.1.1.    Celulosa .....	- 4 -
1.1.2.    Hemicelulosa .....	- 6 -
1.1.3.    Lignina.....	- 7 -
1.1.4.    Componentes secundarios de la pared celular vegetal.....	- 9 -
1.2    Papel de los hongos en la degradación del complejo lignocelulósico.....	- 11 -
1.3    Digestión del complejo lignocelulósico en organismos animales no rumiantes .....	- 11 -
2.    Digestión, aprovechamiento y limitantes del complejo lignocelulósico dentro del tracto digestivo en rumiantes bovinos .....	- 12 -
2.1    Anatomía y fisiología digestiva .....	- 12 -
2.2    Dieta y papel de la fibra en la salud ruminal .....	- 14 -
2.3    Esquilmos agrícolas. Uso en la alimentación de rumiantes .....	- 15 -
2.4    Microbiota ruminal. Función y participación en la degradación del complejo lignocelulósico .....	- 16 -
2.5    Limitantes en el aprovechamiento del complejo lignocelulósico y alternativa para mejorar la ganancia de energía .....	- 20 -
3.    El estudio del microbioma ruminal.....	- 21 -
3.1.    Las ciencias ómicas .....	- 21 -
3.2    Avances y perspectivas gracias al uso de la Biología Molecular .....	- 22 -
Justificación.....	- 29 -

Hipótesis.....	- 30 -
Objetivos .....	- 31 -
1.    Objetivo general.....	- 31 -
2.    Objetivos particulares.....	- 31 -
Material y Métodos .....	- 32 -
1.    Animales empleados.....	- 32 -
2.    Colección de la muestra.....	- 33 -
3.    Obtención de la pastilla bacteriana. ....	- 34 -
4.    Extracción de ADN.....	- 34 -
5.    Construcción de la biblioteca genómica .....	- 35 -
6.    Extracción de los plásmidos.....	- 36 -
7.    Tamizaje .....	- 36 -
8.    Preservación de la biblioteca .....	- 38 -
9.    Caracterización de microbiota ruminal .....	- 38 -
Resultados.....	- 42 -
1.    Construcción y tamizaje de la biblioteca genómica .....	- 42 -
2.    Caracterización de la microbiota ruminal.....	- 47 -
Discusión.....	- 60 -
Conclusiones.....	- 65 -
Perspectivas.....	- 66 -
Anexos .....	- 67 -
Referencias .....	- 75 -

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Genes codificantes a enzimas descubiertos en el rumen (Puniya, et al, 2015).....	- 26 -
Cuadro 2 Análisis Químico Proximal y de las fracciones de la Fibra (Van Soest) del rastrojo de maíz empleado en la alimentación de los animales (Base seca)....	- 33 -
Cuadro 3. Composición por litro de los medios empleados para evaluar la actividad enzimática de las clonas obtenidas en la biblioteca.....	- 37 -
Cuadro 4. Cuantificación del ADN obtenido por muestra, relación 260/280 del material genético, y método de extracción empleado para la construcción de la biblioteca genómica. ....	- 44 -
Cuadro 5. Cuantificación del ADN, volumen de los reactivos empleados y relación 260/280 del material genético usado para la construcción de la biblioteca genómica .....	- 45 -
Cuadro 6. Abundancia relativa de los filos encontrados en el rumen con una dieta base (ensilados de maíz y heno de avena) y bajo una dieta de rastrojo de maíz administrada durante 45 días.....	- 51 -
Cuadro 7. Abundancia relativa de los géneros bacterianos encontrados en el rumen con una dieta base (ensilados de maíz y heno de avena) y bajo una dieta de rastrojo de maíz administrada durante 45 días.....	- 54 -
Cuadro 8. Abundancia relativa de las especies microbianas encontrados en el rumen con una dieta base (ensilados de maíz y heno de avena) y bajo una dieta de rastrojo de maíz administrada durante 45 días .....	- 58 -

## Índice de figuras

- Figura 1. Fósmino pEpiFOSTM-5 ..... - 35 -
- Figura 2. Patrón para la identificación de las clonas obtenidas en la Biblioteca - 36 -
- Figura 3. ADN obtenido a partir de líquido ruminal en un gel de agarosa al 0.5% usando como referencia el marcador de peso molecular Lambda DNA-Mono Cut Mix (New England Biolabs, EUA). PM: peso molecular B2-B9: muestras de ADN. Tinción con bromuro de etidio al 0.01%..... - 42 -
- Figura 4. ADN obtenido a partir de líquido ruminal en un gel de agarosa al 0.5% usando como referencia el marcador de peso molecular Lambda DNA-Mono Cut Mix (New England Biolabs, EUA). PM: peso molecular B10-B17: muestras de ADN. Tinción con bromuro de etidio al 0.01%..... - 43 -
- Figura 5. Gel de agarosa al 1% con Plásmido con (CD) y sin (SD) digestión enzimática con EcoRI de dos colonias (C3B26 y C3B90) tomadas al azar. Marcado de peso molecular (PM) usado como referencia: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA) Tinción con Bromuro de etidio al 0.01%. ..... - 46 -
- Figura 6. Cambios en la pigmentación de C3B26 en el medio adicionado con Guayacol..... - 47 -
- Figura 7. Clonas positivas a la actividad celulolítica en el medio CMC 0.5% ... - 47 -

Figura 8. Agrupamiento de las comunidades bacterianas ruminales bajo diferentes tipos de dieta mediante un análisis de componentes principales (PcoA) a partir de la matriz de distancia filogenética fracción ponderado (A) y no ponderado (B). - 49 -

Figura 9. Microbiota presente a nivel filo en bovinos alimentados con una dieta base compuesta por ensilado de maíz y heno de avena (DB) y con una dieta de rastrojo de maíz (RM) administrada durante 45 días..... - 50 -

Figura 10. Abundancia de los filos que presentaron aumento después de cambiar la alimentación de una dieta base (DB) a la del rastrojo de maíz (RM) ..... - 52 -

Figura 11. Microbiota presente a nivel Género en bovinos alimentados con la dieta base (DB) y rastrojo de maíz (RM) administrada durante 45 días. .... - 53 -

Figura 12. Abundancia de los géneros que presentaron aumento después de cambiar la alimentación de una dieta base (DB) a la del rastrojo de maíz (RM)- 56 -

Figura 13. Microbiota presente a nivel especie en bovinos alimentados con la dieta base (DB) y rastrojo de maíz (RM) durante 45 días..... - 57 -

Figura 14. Abundancia de las especies que presentaron aumento después de cambiar la alimentación de una dieta base (DB) a la del rastrojo de maíz (RM)- 59 -

## Introducción

El complejo lignocelulósico, constituido por celulosa, hemicelulosa y lignina representa una de las fuentes orgánicas más económicas, renovables y abundantes del mundo. Estos componentes maduros y fibrosos, pueden utilizarlos los animales rumiantes en su alimentación, debido a su simbiosis con los microorganismos del rumen además de representar una fuente económica para el productor. Sin embargo, su valor nutricional está relacionado directamente con el grado de interacción entre los carbohidratos estructurales y la lignina. Si bien la microbiota presente en el rumen posee mecanismos enzimáticos para degradar los componentes del complejo lignocelulósico en mayor o menor grado, los microorganismos involucrados en el proceso de degradación y/o modificación de la lignina no están del todo definidos.

Las herramientas generadas a partir del rápido avance de la biología molecular han permitido la identificación de genes de microorganismos ruminales no cultivables para su potencial uso en procesos agroindustriales ofreciendo así nuevas estrategias para mejorar la digestibilidad y aprovechamiento de alimento fibrosos.

El objetivo de este trabajo es la construcción de una biblioteca genómica a partir de líquido ruminal de bovinos alimentados con forraje lignificado y el tamizaje de ésta en medios selectivos para la identificación de genes que participen en degradación y/o modificación del complejo lignocelulósico partiendo de principios ecológicos de los microorganismos ruminales, así como la identificación de los microorganismos que se ven favorecidos por este cambio de dieta a través de la secuenciación del ARNr 16s.

El análisis del ARNr 16S es una herramienta que permite determinar relaciones taxonómicas a niveles específicos de un ecosistema en particular a través de la comparación de la información generada frente a bases de datos reportadas. Las bibliotecas genómicas, por otra parte, permiten aislar fragmentos

de ADN de un individuo o nicho en particular. El aislamiento de los fragmentos y su posterior clonación en vectores conocidos permite la manipulación y expresión de éstos, haciendo posible la identificación de nuevos genes y convirtiendo a las genotecas en herramientas atractivas para evaluar la actividad enzimática de los microorganismos ruminales, a este tipo de acercamiento se le conoce como metagenómica funcional.



## **Antecedentes**

### **1. Biomasa lignocelulósica**

#### **1.1. Definición, composición y degradación bacteriana del complejo lignocelulósico**

La biomasa o complejo lignocelulósico, nombrado así por la intrincada formación de componentes vegetales por los que está constituida, representa una de las fuentes orgánicas más económicas y abundantes del mundo (Isikgor, *et al*, 2015). En los últimos años, ha despertado un interés considerable en diversos investigadores interesados en su uso para la producción de una energía limpia que pueda ayudar a disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero y la contaminación ambiental (Anwar, *et al*, 2014; Isikgor, *et al*, 2015; Guerriero, *et al*, 2016 y Kumar, *et al*, 2015). Entre las fuentes de biomasa lignocelulósica se encuentran los residuos agrícolas y forestales, cultivos destinados para la producción de bioetanol y biodiesel y desperdicios municipales y estatales de carácter leñoso (Anwar, *et al*, 2014).

Los componentes del complejo, al formar parte de la pared celular vegetal, responden a la función de proveer un sistema de conductos para la toma de nutrientes por parte de la planta, a dar fuerza mecánica a los órganos vegetales, así como de la protección frente a depredadores y ambientes poco favorables. Su composición comprende principalmente celulosa (20-50%), hemicelulosa (15-35%) y lignina (18-35%) (Bomble, *et al*, 2017), además de otros componentes en menor proporción como proteínas, pectinas, minerales, grupos acetil y metoxi, así como de sustituyentes fenólicos (Anwar, *et al*, 2014 e Isikgor, *et al*, 2015). Sin embargo, aunque la composición del complejo se encuentra bien definida y estudiada, ésta puede verse modificada cuantitativamente dependiendo del cultivo o material de origen, condiciones climáticas de la región de origen, condiciones adversas a las que se pudiera haber enfrentado el cultivo o material, así como si se recibió algún pretratamiento físico, químico o biológico para la modificación de sus constituyentes

(Anwar, *et al*, 2014; Valenciaga y *et al*, 2004). Por ejemplo, las denominadas “maderas duras” poseen una mayor cantidad de celulosa y lignina que las “suaves” (Bajpai, *et al*, 2016), así como los cultivos tropicales poseen una mayor cantidad de lignina en comparación a los cultivos de clima templado (Moore, 2001).

### **1.1.1. Celulosa**

La celulosa es un polisacárido estructural, conformado por cadenas lineales de D-Glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -1,4. Es el polisacárido con mayor proporción en la pared celular (aproximadamente del 20 al 50%) (Wang, *et al*, 2002). Su síntesis, dentro de la pared celular vegetal, es llevada a cabo por complejos de celulosa sintetasas ligadas a la membrana, que se encargan de formar las llamadas microfibrillas, conformaciones de aproximadamente 30 cadenas de celulosa con 20000 residuos de glucosa cada una (Moräis, *et al*, 2012). Las microfibrillas tienden a interactuar entre ellas con enlaces débiles como son los puentes de Hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals (Horn, *et al*, 2012). Estas interacciones, que a su vez dan origen a las fibrillas (Moräis, *et al*, 2012), son las responsables de formar, en ciertas regiones del polímero, estructuras cristalinas densamente empaçadas limitando así el ataque enzimático (Dimarogona, *et al*, 2012).

La degradación de la celulosa es llevada a cabo por las celulasas, enzimas pertenecientes a la superfamilia de las glicosil hidrolasas (GH's). Aunque todas las celulasas actúan sobre un tipo de enlace, estas enzimas son muy diversas en cuanto a su estructura, secuencia y mecanismos catalíticos. Estas diferencias han dado lugar a la clasificación de la superfamilia en más de 100 familias (Horn, *et al*, 2012), enumeradas en base a su estructura y actividades catalíticas primarias (Moräis, *et al*, 2012). Dos modelos han sido propuestos para describir la degradación de la celulosa a unidades de glucosa: el primero, en donde las celulasas son liberadas de forma aislada y aleatoria sobre el sustrato y el segundo, en donde la acción de éstas se da en un complejo multienzimático denominado celulosoma.

El primer modelo o el “esquema clásico” para la degradación de la celulosa involucra la acción sinérgica y aleatoria de tres tipos de celulasas:

- Endo-1,4-  $\beta$ -glucanasas, que actúan aleatoriamente en los enlaces internos de las cadenas de celulosa. Este tipo de enzimas pueden ser procesivas, en dónde la asociación enzima-sustrato es seguida por varios cortes consecutivos en una sola cadena de polisacárido que se enhebra a través del sitio activo o No procesivas (Morais, *et al*, 2012).
- Exo-1,4-  $\beta$ -glucanasas, que catalizan el enlace glucosídico en los extremos del polímero.
- $\beta$ -glucosidasas, encargadas de convertir a la celobiosa, el producto principal de la acción catalítica de las endo y exo celulasas, a glucosa (Krause, *et al*, 2013).

La acción sinérgica de las enzimas ocurre cuando las endo-celulasas generan nuevos extremos reductores y no reductores en la cadena del polímero permitiendo la acción de las exo-celulasas y la generación de celobiosa para la acción de las  $\beta$ -glucosidasas (Lynd, *et al*, 2002, Krause, *et al*, 2003 y Morais, *et al*, 2012).

Con respecto al segundo modelo, los celulosomas son complejos multienzimáticos extracelulares secretados por ciertos microorganismos anaerobios (Morais, *et al*, 2012). Es considerado un mecanismo altamente eficiente, dentro de los sistemas enzimáticos, en la degradación de compuestos lignocelulósicos debido a su organización enzimática, que al estar contigua facilita el sinergismo entre las unidades catalíticas y minimiza la difusión de enzimas y productos hidrolíticos (Stern, 2016). Éste componente permite la separación física de las microfibras de la celulosa de las partículas grandes, logrando un mayor contacto enzimático con la celulosa (Artzi, *et al*, 2017) y provee a los microorganismos una ventaja competitiva sobre la utilización de sustratos al fungir como sistema adherente (Krause, *et al*, 2003). Están principalmente compuestos por dos “bloques de construcción”: dockerinas, con enzimas u otro tipo de proteínas auxiliares y cohesinas con proteínas estructurales conocidas como escafoldinas, las cuales, también pueden

contener módulos de unión a dockerinas o bien módulos de unión a carbohidratos (CBM, por sus siglas en inglés) para el reconocimiento del sustrato (Stern, *et al*, 2016).

Los celulosomas pueden dividirse en dos principales grupos: los que son altamente estructurados, caracterizados por poseer más de una escafoldina y consecuentemente un mayor número de enzimas y los celulosomas simples con una escafoldina simple (Artzi, *et al*, 2017). El número de genes que codifican a los genes de enzimas presentes en las dockerinas es mayor que los que codifican a cohesinas en las escafoldinas primarias, lo que sugiere, una regulación fina de los componentes enzimáticos dependiente de la fuente de carbono. La fuente de carbono es así un factor clave que determina la composición enzimática del celulosoma (Moore, *et al*, 2001 y Artzi, *et al*, 2017). En adición, los genes celulosómicos son expresados a niveles altos en presencia de polímeros complejos contra oligosacáridos simples, en contraste, esta expresión se ve disminuida a una elevada tasa de crecimiento celular (Dror, *et al*, 2003).

### **1.1.2. Hemicelulosa**

La hemicelulosa es un heteropolímero, comúnmente ramificado formado por 2 o más residuos de azúcares (Cooper, 2013). La cadena principal puede constituir en uno o más tipos de glucósidos y las conexiones entre los glucósidos suelen ser diferentes dependiendo de la materia prima de referencia (Li, *et al*, 2017). En general, este heteropolímero está principalmente constituido por xilano, xiloglucanos, glucomananos, mananos y galactomananos, arabanos y arabinogalactanos (Shallom, *et al*, 2003 y Li, *et al*, 2014).

El xilano es el polisacárido hemicelulósico con mayor prevalencia dentro de la pared celular vegetal (Cooper, 2013), compuesto por unidades de D-xilanopiranosil unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. Estas unidades, dependiendo de la fuente (maderas duras, blandas o forrajes) presentan interacciones con ácidos glucorónicos, arabinofuranosas y ácidos p-cumáricos y ferúlicos mediante enlaces  $\alpha$ -1,2 o bien,  $\alpha$ -1,3. (Shallom, *et al*, 2003). Por otra parte, los mananos están

compuestos por residuos de manosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4 en los que aleatoriamente puede participar residuos de glucosa, y forma también parte de los componentes principales de la hemicelulosa. Estos pueden interactuar con la galactosa mediante enlaces  $\alpha$ -1,6 formando galactoglucomananos (Shallom, *et al*, 2003).

La variada y compleja estructura de la hemicelulosa hace necesaria la participación de diversas enzimas para llevar a cabo la despolimerización entre las que se encuentran:  $\alpha$ -glucorinasa,  $\alpha$ -arabinofuranosidasa, arabinasa, endomananasa,  $\beta$ -manosidasa, acetilsilano esterasa y feruloilsilano esterasa (Juturu, *et al*, 2012 y Shallom, *et al* 2003). Las hemicelulasas, dependiendo del sitio catalítico pueden clasificarse dentro de las glucosidohidrolasas, o bien, glucosidoesteras, responsables de hidrolizar el enlace éster entre las unidades de xilano y el ácido ferúlico. Ocasionalmente puede verse incluido un dominio de unión a carbohidratos el cual facilita la unión del sustrato con la enzima (Junturu, *et al*, 2012).

### **1.1.3. Lignina**

La lignina es un polímero aromático tridimensional complejo formado por monolignoles derivados de la vía fenilpropanoide de las plantas vasculares (Moore, *et al*, 2001; Brown, *et al*, 2014 y Lagunes, *et al*, 2015). Forma parte de los componentes de la pared celular y está involucrada en procesos de defensa y transporte de nutrientes en los organismos vegetales. (Brown, *et al*, 2014).

Su definición estructural, a diferencia de los demás carbohidratos estructurales de la pared celular vegetal, no está claramente definida, debido a la complejidad que afecta su aislamiento, caracterización estructural y al análisis de su composición (Chávez, *et al*, 2013). De forma general, podemos hablar de tres monómeros participantes en la estructura de la lignina: los alcoholes coumarílico, sinapílico y coniferílico. Debido a estos monómeros la lignina puede ser dividida en tres tipos: lignina "syringyl", "guaiacyl" e hidroxifenil formadas por unidades de siringil-propano, guaiacyl-propano e hidroxifenilpropano respectivamente (Brown, *et*

al, 2014). Las unidades estructurales de la lignina no suelen repetirse de forma regular, dado que la composición y estructura de ésta varía según el origen y el método de extracción empleado. Una vez sintetizados los monómeros de lignina por la planta, éstos se unen covalentemente a la hemicelulosa mediante enlaces éster-éster a través de los ácidos hidroxicinámicos p-cumárico y ferúlico. Sin embargo, los enlaces también se pueden presentar con otros polisacáridos mediante el ácido ferúlico (Lagunes, *et al*, 2015). Dentro de un organismo vegetal, existen diferentes grados y tipos de lignificación (Brown, *et al*, 2014), los cuales, no solo dependen de la porción anatómica del organismo vegetal si no también del grado de madurez de la planta, el tipo de clima en el que ésta se desarrolla y si estuvo sujeta a la infección o exposición de agentes patógenos (Van Soest 1994 y Sánchez, *et al*, 2012).

Diversos organismos han desarrollado diversas estrategias para la degradación de la pared celular que involucran la participación de numerosas enzimas como las glucosidohidrolasas (GHs), monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO), peroxidasas y lacasas (Cragg, *et al*, 2015). El modo de acción de cada uno dependerá estrechamente del entorno en el que se desarrolle la deconstrucción.

Los hongos son, sin duda alguna, los organismos degradadores de lignina por excelencia. Sin embargo, existen diversos géneros bacterianos con actividad metabólica relacionada a la lignina, entre los que destacan las bacterias presentes en el suelo (Brown, *et al*, 2014 y De Gonzalo, *et al*, 2016).

Entre las enzimas lignolíticas que se han encontrado en las bacterias están: las peroxidasas decolorantes, las lacasas, superóxido dismutasas, peroxidasas de catalasa y las  $\beta$ -esterasas dependientes de glutatión, capaces de actuar en pequeños oligómeros de lignina (De Gonzalo, *et al*, 2016)

Las peroxidasas decolorantes, son hemoperoxidasas presentes en algunas especies de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* con capacidad de oxidar sustratos por medio del peróxido de hidrógeno (Yoshida, *et al*, 2015). Cabe señalar que las peroxidasas decolorantes se encuentran tanto en hongos como en bacterias. Sin embargo, las presentes en las bacterias son las pertenecientes a las

clases A-C que a diferencia de las demás clases se caracterizan por ser extracelulares (De Gonzalo, *et al*, 2016).

Las lacasas, son enzimas multicobre con la habilidad de tomar el oxígeno molecular presente para realizar la oxidación de componentes aromáticos, como resultado de la oxidación se produce agua (Claus, 2004 y De Gonzalo, *et al*, 2016). A menudo, este tipo de proteínas son liberadas como componentes extracelulares y varían ampliamente con relación al peso molecular, estructura, pH, eficiencia catalítica y sustrato (Claus, 2004 y De Gonzalo, *et al*, 2016).

Las superóxido dismutasas, enzimas fundamentales en control del estrés celular, se caracterizan por poseer una actividad intracelular. Sin embargo, dos de ellas con capacidad extracelular identificadas en *Sphingobacterium* se han mostrado capaces de degradar lignina alcalina (De Gonzalo, *et al*, 2016).

Las esterasas dependientes de glutatión son enzimas intracelulares dependientes de NAD en las que se ha detectado un sistema enzimático compuesto por tres proteínas (deshidrogenasa, liasas y esterasa) que, actuando de forma sinérgica, son capaces de actuar sobre intermediarios de la lignina (De Gonzalo, *et al*, 2016).

En cuanto a las catalasa-peroxidasas y las dihidrogenasas su participación en el metabolismo de la lignina ha sido posible gracias a la proteómica. Estos hallazgos han facilitado la identificación de dominios de unión a lignina, así como de los grupos férricos presentes en las enzimas (De Gonzalo, *et al*, 2016).

#### **1.1.4. Componentes secundarios de la pared celular vegetal**

Las paredes celulares vegetales están constituidas por una porción fibrosa y por una amorfa también conocida como matriz o porción no fibrosa. La porción fibrosa o cristalina es la encargada de dar rigidez y fortaleza a la pared celular, así como de suministrar resistencia contra las fuerzas de tensión y enzimáticas. En esta porción la celulosa es el componente principal. En la porción o componente amorfo o no-fibroso se encuentra la hemicelulosa además de componentes secundarios

como son las pectinas, glucoproteínas estructurales, taninos, etc. (Valenciaga, *et al*, 2004).

Las pectinas, conforman un cemento intercelular que contribuye a unir las microfibrillas de celulosa. Los componentes pectínicos están formados por aproximadamente 100 unidades de ácidos galacturónicos unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,4). Debido a la formación de puentes de calcio entre las pectinas, éstas se entrelazan entre sí formando una red que permite el transporte libre de moléculas de agua dentro de la pared primaria vegetal facilitando así la hidratación de las células jóvenes presentes (Voragen, *et al*, 2009). Las pectinasas, nombre que corresponde al complejo enzimático conformado por pectato liasas, pectino esterasas y poligalacturonasas (pectinasas), enzimas capaces de llevar a cabo la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4 presentes en los compuestos pectínicos (Pedrolli, *et al*, 2009)

La mayoría de las proteínas presentes en la pared celular de las plantas son glicoproteínas, las cuales tienen una mayor presencia cuantitativamente en la pared primaria que en la secundaria. Comúnmente, estas glicoproteínas han sido agrupadas en base a la abundancia de ciertos aminoácidos en su secuencia, así como carbohidratos, originando 4 categorías: las glucoproteínas ricas en arabinogalactanos, en prolina, en glicina y en hidroxiprolina, también conocidas como extensinas. Sin embargo, el rol preciso de estas proteínas es desconocido (Kumar, *et al*, 2015).

Los taninos son compuestos fenólicos con un peso molecular aproximado de 300 a 5000 Daltones (Mehta, *et al*, 2014). Tradicionalmente, han sido considerados como factores antinutricionales debido a su capacidad para unirse y precipitar proteínas (Dihman, *et al*, 2018). Su clasificación toma como base la composición dando lugar a los taninos hidrolizables, compuestos fundamentalmente por ácidos gálicos esterificados a un núcleo poliol y a los taninos compuestos o flavonoides (Salami, *et al*, 2018). Las tanasas o tanino acil hidrolasas, presentes en microorganismos como hongos, bacterias y levaduras y organismos vegetales, son



las enzimas responsables de hidrolizar el enlace éster presente en los taninos, liberando ácido gálico y glucosa (Mehta, *et al*, 2014).

### **1.2 Papel de los hongos en la degradación del complejo lignocelulósico**

La degradación del complejo lignocelulósico por medio de los hongos ha sido ampliamente estudiada, debido a que estos microorganismos son capaces de degradarlo mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Kantharaj, *et al*, 2017).

Los hongos con la capacidad de crecer en material lignocelulósico son productores activos de una amplia gama de glicohidrolasas, entre las que se encuentran las celulasas y hemicelulasas, además de las pectinasas. No obstante, son las lacasas y peroxidasas, incluyendo lignino peroxidasas y manganeso peroxidasas, las enzimas que juegan un rol fundamental para la degradación del complejo lignocelulósico (Brown, *et al*, 2014 y Kantharaj, *et al*, 2017). Dentro de este grupo, el papel de los hongos de la pudrición blanca es de los más estudiados. Estos microorganismos cuentan con una amplia gama de enzimas extracelulares entre las que se encuentran: peroxidasas con grupos férricos como las lignino y manganeso peroxidasas, así como las peroxidasas decolorantes y versátiles (De Gonzalo, *et al*, 2016).

### **1.3 Digestión del complejo lignocelulósico en organismos animales no rumiantes**

En diversos invertebrados como son las cucarachas, termitas y algunos nemátodos se ha demostrado la presencia de celulasas endógenas, así como en algunos insectos y crustáceos. La presencia de estas enzimas dentro de los tractos gastrointestinales probablemente se deba a la ausencia de cámaras digestivas que permitan la simbiosis entre microorganismos, haciendo su presencia necesaria en el tracto para el aprovechamiento de los nutrimentos presentes en madera y hierbas. Sin embargo, gran parte de esta actividad digestiva se logra mediante la acción mecánica de la boca sobre el alimento (Cragg, *et al*, 2015).

Con respecto a las termitas, son organismos altamente eficientes en la descomposición del material lignocelulósico. En base a la presencia de protistas flagelados en su tracto gastrointestinal, pueden ser clasificadas en inferiores y en superiores según la presencia o ausencia de estos microorganismos (Bomble, *et al*, 2017). Para la degradación de la celulosa tanto las termitas inferiores como superiores poseen endo  $\beta$ -1-4 glucanasas, exoglucoanasas como las celodextrinasas y celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas. Sin embargo, en las termitas inferiores, se observa una mayor actividad en contra de los polisacáridos debido a la simbiosis entre las enzimas presentes en las glándulas salivares de las termitas como en las comunidades protistas (Ni, *et al*, 2013). Para la descomposición de la hemicelulosa se requiere de la participación de xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas, acetilxilano esterasas, entre otras.

Es importante señalar que, a pesar de lo descrito por Butler en 1979, las termitas no son organismos capaces de degradar la lignina en cantidades considerables, ni por enzimas propias ni por las presentes en los microorganismos de su tracto gastrointestinal. Estas afirmaciones se apoyan en el análisis de la lignina presente en madera ofrecida como alimento y las heces de termitas. No obstante, se han reportado cambios estructurales en la lignina a través de su paso por el tracto gastrointestinal. Estos cambios son la oxidación y descarboxilación del anillo aromático de la lignina durante la masticación vía lacasas, aldo-ceto reductasas y catalasas. Existen reportes de bacterias productoras de peroxidasas, sin embargo, la vía de degradación de la lignina sigue siendo poco clara (Ni, *et al*, 2013).

## **2. Digestión, aprovechamiento y limitantes del complejo lignocelulósico dentro del tracto digestivo en rumiantes bovinos**

### **2.1 Anatomía y fisiología digestiva**

Los rumiantes poseen un sistema digestivo complejo, que se caracterizan por tener al estómago anterior (rumen, retículo y omaso) además del estómago posterior (abomaso) para desarrollar procesos digestivos y de fermentación microbiana, que

permiten al animal asimilar grandes cantidades de forrajes fibrosos y hacen posible la inclusión de compuestos nitrogenados no proteicos en su programa de alimentación (Clauss, *et al*, 2017).

El proceso digestivo inicia con la boca, en donde los procesos mecánicos de masticación y rumia reducen el tamaño de partícula del alimento y aumentan la superficie disponible para las enzimas microbianas. La salivación sirve para humedecer el alimento (proceso que también ayuda a la adhesión de microorganismos. La saliva, además es un buffer que ayuda a prevenir un descenso en el pH ruminal. (McAllister, *et al*, 1994). El complejo estomacal comprende el 55% del tracto digestivo en rumiantes adultos. (Kumar, *et al*, 2015).

El rumen es el más grande de los compartimientos y ocupa la cavidad derecha de la cavidad abdominal. Es un saco formado por una membrana mucosa recubierto por un epitelio escamoso estratificado queratinizado, presenta papilas y está rodeado por una capa muscular responsable de las contracciones rumino-reticulares. En su interior presenta pliegues o pilares que los dividen en cinco sacos (dorsal, anterior, ventral, ciego dorsal y ciego ventral) (Hoover, *et al*, 1991) Su volumen incrementa rápidamente cuando inicia el consumo de alimentos sólidos y forrajes. (Puniya, *et al*, 2015). Este compartimento, al estar expuesto al ambiente externo, mantiene un flujo constante de materia hacia dentro y fuera del rumen (Puniya, *et al*, 2015). Bajo condiciones normales, el rumen provee un ambiente adecuado para el crecimiento de numerosos microorganismos estrictamente anaerobios, así como anaerobios facultativos (Hoover, *et al*, 1991). Dentro de estas condiciones idóneas para la salud ruminal están: una temperatura entre 38 y 41°C, pH entre 5.5 y 7.5 en animales forrajeros, un potencial redox promedio de -350 mV, con fluctuaciones entre -250 y -450 mV, el cual refleja un fuerte medio reductor y la ausencia de oxígeno, así como una continua tasa de pasaje hacia el intestino delgado para evitar la acumulación de metabolitos (Hoover, *et al*, 1991 & Puniya, *et al*, 2015).

El rumen está separado del retículo por el pliegue rúmimo-reticular. Presenta esencialmente la misma estructura, pero la mucosa de este último se caracteriza

por formar pliegues de 1 cm de altura aproximadamente que dan origen a celdas poligonales en forma de panal (Harfoot, 1978). La mayoría de los alimentos consumidos por los rumiantes son digeridos en el rumen y retículo. La digestión en la boca se lleva principalmente por medios mecánicos mientras que en el rumen y retículo este proceso es mecánico y microbiano. (Kumar, *et al*, 2015).

En el omaso se da la absorción de líquidos a fin de que el material llegue más concentrado al abomaso y no se diluyan las enzimas. Mientras que el abomaso, también conocido como estómago verdadero y formado por la región fúndica, el cuerpo y la región pilórica, juega un papel similar al del estómago en los monogástricos al segregar ácido clorhídrico y pepsina para la hidrólisis de proteínas (Russel, *et al*, 2001).

## **2.2 Dieta y papel de la fibra en la salud ruminal**

Los bovinos son animales forrajeros por naturaleza, es decir que a través del consumo de forrajes y pasturas son capaces de cubrir sus necesidades clave: mantenimiento, crecimiento, gestación, lactancia y desarrollo corporal (Gasque, 2008). Seis son los nutrimentos clave a considerar en los rumiantes: energía, proteína, fibra, macrominerales y vitaminas (Gasque, 2008). Los carbohidratos son la principal fuente de energía, siendo además precursores para la síntesis de grasa y lactosa (INTA, 2014).

La fibra es uno de los principales componentes en la dieta de los rumiantes. Además de su función nutricia al proveer carbohidratos estructurales para la fermentación microbiana, estimula la rumia y la salivación por parte del hospedero, todo esto con el fin de mantener un ambiente ruminal adecuado y así mantener la salud del animal (Banakas, *et al*, 2018). Un aporte de fibra por debajo de los requerimientos incrementa el riesgo de presentar patologías como: laminitis, acidosis o desplazamiento del abomaso, así como un bajo porcentaje de grasa en leche, menor consumo y por lo tanto producciones bajas. Por otro lado, un aporte

de fibra excesivo conlleva un mayor llenado ruminal, menor tasa de pasaje, menor consumo de alimento y por lo tanto una menor producción (Banakas, *et al*, 2018).

Para mantener la salud del animal es necesario considerar a la fibra efectiva, definida como la cantidad de fibra con capacidad de estimular la rumia, tomando en cuenta parámetros como la composición forma y tamaño de partícula (Banakas, *et al*, 2018). Éste último promueve la masticación y producción de saliva rica en sistemas amortiguadores con capacidad de neutralizar los ácidos grasos volátiles productos de la fermentación microbiana. La neutralización de éstos no solo impacta en el pH ruminal, sino que también permite el paso de éstos a través de la pared ruminal hacia torrente sanguíneo para su posterior uso en otros órganos (Yang, *et al*, 2005).

El concepto de la fibra efectiva está relacionado con las características físicas de la fibra detergente neutra (FDN), principalmente con el tamaño de partícula (Banakas, *et al*, 2018). De las diversas fracciones que componen a la fibra, la FDN es la que mide mejor la capacidad de los forrajes que ocupan el volumen del tracto gastrointestinal, por lo que generalmente se asocia con el consumo de materia seca (Cruz, *et al*, 2006). Dentro de las recomendaciones para asegurar la estabilidad del proceso digestivo y la salud ruminal está el consumo de al menos 25% de FDN diarios en el ganado de leche, mientras que en ganado de engorda, aunque se puede llegar a un 7 a 10% de FDN es necesario un acondicionamiento previo partiendo del 20%. Sin embargo, la recomendación en general gira en torno a valores del 15% (Gasque, 2008).

### **2.3 Esquilmos agrícolas. Uso en la alimentación de rumiantes**

Los esquilmos agrícolas son subproductos derivados de las actividades agropecuarias y comprenden los residuos de hojas y tallos resultantes del proceso de cosecha de los granos o semillas (Borja, *et al*, 2016).

El aprovechamiento de estos subproductos agrícolas está limitado por diversas características, como lo son su bajo contenido en proteína, el limitado aporte de energético, la deficiencia en minerales como son: azufre y fósforo, así

como su baja densidad, lo que lleva a que ocupen un volumen considerable respecto a su peso (Martínez, 2009). Aún con todas estas características, los esquilmos representan un insumo alimenticio para el ganado, su aprovechamiento es de gran importancia en el rubro alimenticio, ya que, en muchas ocasiones, resulta la única fuente de alimento disponible en estiaje (Borja, *et al*, 2016).

Los subproductos agrícolas o agroindustriales se dividen en cuatro categorías según su aporte de nutrientes. Así, se clasifican en (Orozco, 2015):

- Aquellos que proveen una importante cantidad de energía debido a su contenido de carbohidratos altamente fermentables.
- Aquellos que son fuente de proteína y se encuentran en pasta de harinas de leguminosas y oleaginosas.
- Los que de forma proporcional proporcionan energía y proteína y se encuentran en la molienda de cereales.
- Aquellos provenientes de la industrialización de frutas y verduras.

A nivel nacional, el cultivo del maíz es el que contribuye en mayor medida a la generación de los esquilmos. Sin embargo, también hay un volumen importante generado por las pajas de sorgo, trigo, cebada, arroz, frijol, soya, cáscara de arroz y subproductos de la industria azucarera (SAGARPA, 2015). Los esquilmos agrícolas abundan en diversas zonas del país, en especial en las áreas de temporal. La cantidad anual de estos componentes se estima en 46 millones de toneladas de materia seca para los principales cultivos. Dentro de estos datos, el rastrojo y olote de maíz junto con las pajas de sorgo y trigo representan cerca del 81% de los residuos de cultivos (SAGARPA, 2015).

#### ***2.4 Microbiota ruminal. Función y participación en la degradación del complejo lignocelulósico***

No existe una presencia significativa de enzimas propias del rumiante en los compartimientos pre-abomasales. La enzima presente en la saliva del rumiante es una lipasa de acción "leve" capaz de hidrolizar cadenas cortas de ácidos grasos. Sin embargo, los rumiantes son capaces de digerir altas cantidades de alimentos

fibrosos gracias a la digestión fermentativa llevada a cabo por los microorganismos presentes en el rumen y retículo (bacterias, protozoarios y hongos) (Kumar, *et al* 2015). Las enzimas necesarias para hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1 se encuentran solo en los microorganismos y en vegetales. Es por esta razón que los herbívoros han desarrollado una relación simbiótica con los microorganismos dentro de su tracto gastrointestinal (Hoover, 1991).

Los enlaces entre los polisacáridos de la pared vegetal han sido definidos y ampliamente estudiados. Evidentemente, la degradación de la pared celular se debe a interacciones complejas y sistemáticas. La hidrólisis de los componentes vegetales llevada a cabo por microorganismos ruminales a monómeros requeridos para sus funciones metabólicas necesita de diferentes enzimas para degradar la pared celular (celulasas, xilanasas,  $\beta$ -glucanasas, pectinasas) amilasas, proteasas, fitasas y aquellas como las tanasas, que degradan toxinas vegetales específicas. (Wang, *et al*, 2002).

Las condiciones anaeróbicas estrictas del rumen favorecen que la microbiota presente en este entorno sea principalmente anaerobia (Puniya, *et al*, 2015). La población microbiana ruminal consiste en dos grupos de procariontes (bacterias y arqueas) y dos grupos de organismos eucariontes (protistas y hongos) así como bacteriófagos (Weimer, 2015). Todos estos microorganismos se encargan de transformar los alimentos a ácidos grasos volátiles, así como generar biomasa microbiana y vitaminas para el hospedero (Fang, *et al*, 2015).

Las bacterias representan el grupo más abundante dentro del ecosistema ruminal (Deush, *et al*, 2017). Sus características funcionales y fisicoquímicas las llevan a ser clasificadas por especie y cepa. En su mayoría, están involucradas en la degradación de fibra, así como en una asociación física con partículas de alimento formando microcolonias simbióticas o biofilms, característica clave para asegurar una mayor supervivencia en el rumen (Puniya, *et al*, 2015). Las bacterias dominantes en dietas con altos niveles de fibra poseen endo y exoglucanasas así como una variedad de enzimas y mecanismos para degradar a la fibra como la

formación del celulosoma en el caso específico de *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium cellobioparum* (Akin, *et al*, 1988 y Artzi 2017).

Las arqueas o microorganismos metanogénicos, tienen un papel regulador dentro del ecosistema ruminal, ya que, dentro de sus procesos metabólicos, se encargan del rápido uso de los protones de hidrógeno para sus propios procesos metabólicos, evitando así su acumulación en el rumen (Puniya, *et al*, 2015).

Los hongos anaeróbicos, constituyen el dominio con menor participación en biomasa (5-20%), sin embargo, son los más eficientes en el proceso fibrolítico debido a su capacidad para la adhesión a tejidos vegetales (Akin, *et al*, 1988). Su función principal es la degradación de componentes lignocelulolíticos gracias a la acción de enzimas extracelulares hidrolíticas, incluyendo celulasas, hemicelulasas, proteasas, amilasas, amilogucosidasas, pectinasas, disacaridasas y ferulonil y p-coumaril esterasas (Mc Sweeney, *et al*, 1994). Estos singulares hongos se distinguen de su contraparte aerobia debido a la presencia del hidrogenosoma como generador de energía en lugar de la mitocondria (Puniya, *et al*, 2015). Los hongos, al igual que las bacterias también pueden ser clasificados en base a su localización dentro del rumen (Fang, *et al*, 2015). Estos microorganismos han sido descritos bajo el orden *Neocallimastigales*, clase *Neocallimastigomycetes* en el phylum *Neocallimastigomycota*. (Puniya, *et al*, 2015) en donde los géneros importantes son: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Sphaeromyces* y *Orpinomyces* (Dehority, *et al*, 2008).

Los protozoarios presentes en el rumen se han clasificado en: holótricos y entodiniomórfidos (Puniya, *et al*, 2015). Los géneros importantes son: *Dasytricha*, *Isotricha*, *Diplodinium*, *Entodinium*, *Polyplastron*, *Eudiplonium*, *Epidinium* y *Ophryscolex*. Estudios morfológicos han descrito más de 250 especies de ciliados en el tracto gastrointestinal de los rumiantes. Los protozoarios juegan un papel importante en la digestión de la fibra, así como en la modulación de los perfiles fermentativos por su capacidad de utilizar grandes cantidades de almidón y almacenarlo en su interior. Su perfil enzimático indica la presencia de amilasas, invertasas, pectina esterasas y poligalacturonasas (Newbold, 2015).



Los bacteriófagos son considerados patógenos obligados de las bacterias y uno de los más importantes componentes del ecosistema ruminal encontrándose  $>10^9$  partículas/mL (Puniya, *et al*, 2015). Aunque los bacteriófagos no participan en la obtención de nutrientes para el rumiante, desempeñan un papel crítico para el control del ecosistema ruminal encargándose del control de las masas bacterianas en el rumen, si bien, este proceso no es considerado de utilidad bajo el consumo de diferentes dietas, la lisis bacteriana funge como una fuente de aminoácidos disponibles para los animales y microorganismos presentes en el rumen (Puniya, *et al*, 2015).

La red biológica dentro del rumen es responsable de la degradación completa de la materia orgánica ingerida por el rumiante. Ya que, en palabras de Bladen (1968) “No existe un solo microorganismo que sea capaz de una degradación total de los sustratos presentes en el rumen” (Puniya, *et al*, 2015). Un numeroso grupo de microorganismos trabajan de forma sinérgica para el catabolismo de la materia orgánica presente en el rumen y la producción de productos finales de la fermentación útiles para que el rumiante obtenga energía (Puniya, *et al*, 2015).

Las moléculas que componen al alimento son degradadas a azúcares simples, transportadas y fermentadas por otros miembros de la comunidad microbiana productores de ácidos grasos de cadena ramificada, vitaminas y otros cofactores de bacterias responsables de la degradación del alimento (Puniya, *et al*, 2015). Sin embargo, no todas las interacciones que se llevan a cabo en el rumen son benéficas para los microorganismos participantes. Ejemplos de esto es la depredación de bacterias por protozoarios holótricos y entodiniomorfos y la misma acción de los bacteriófagos hacia comunidades bacterianas. En general, la tasa de depredación bacteriana es proporcional a su concentración disponible en el rumen. Este mismo tipo de interacción puede verse por parte de los protozoarios hacia los zoosporos fúngicos (Hoover, *et al*, 1991 & Dehority, 1991).

## **2.5 Limitantes en el aprovechamiento del complejo lignocelulósico y alternativa para mejorar la ganancia de energía**

La fibra presente en los forrajes puede ser degradada únicamente en el rumen, sin embargo, la composición de la pared celular de los forrajes es una de las principales limitantes de la digestión (Van Soest, 1994). La digestión de la pared celular en el rumen consiste en numerosos y complejos procesos que involucran diversas especies de microorganismos y sus maquinarias enzimáticas.

Dentro de estas enzimas se encuentran las celulasas y hemicelulasas. Las celulasas pueden degradar los complejos polisacáridos siendo liberadas como enzimas extracelulares libres o bien mediante la acción del celulosoma. Las hemicelulasas incluyen una variedad considerable de enzimas entre las que podemos encontrar a las mananasas, arabinofuranosidasas, xilanasas, ácido ferúlico estererasas y ácido p-cumárico estererasas. Éstas últimas con funciones clave lejos de hidrolizar los enlaces glucosídicos. Las primeras se encargan de hidrolizar los enlaces entre los ácidos hidroxicinámicos y los azúcares, mientras que las segundas, exclusivas de los hongos anaeróbicos del rumen (Puniya, *et al*, 2015), rompen los enlaces éster entre la lignina y la hemicelulosa por medio del ácido p-cumárico. Ambas enzimas son piezas clave para la degradación del material lignocelulósico.

Dentro de la nutrición animal, la lignina es considerada un componente indeseable por el impacto negativo en la disposición de nutrientes, ejerciendo un impacto directo en el valor de la energía digestible, ya que si bien, los hongos poseen las enzimas necesarias para poder degradar este compuesto, su ciclo de vida y la tasa de pasaje ruminal impiden que la acción enzimática de las estererasas pueda tener un efecto importante (Moore, *et al*, 2001). Dentro de las estrategias empleadas para mejorar la ganancia de energía aún con dietas altas en fibra se incluyen: una formulación adecuada en la dieta, el picado del forraje, inoculación de líquido ruminal para evitar acidosis, así como disminuir la incidencia de diarreas, el uso de aditivos como enzimas exógenas y tratamientos químicos (Krause, *et al*, 2003 & Isikgor, *et al*, 2015)

### **3. El estudio del microbioma ruminal**

#### **3.1. Las ciencias ómicas**

Las ciencias ómicas permiten estudiar un gran número de moléculas involucradas en el funcionamiento de un organismo (Frigolet, 2017). Sus ramas de estudio van hacia la detección de genes (Genómica), ARNm (transcriptómica), proteínas (Proteómica) y metabolitos (Metabolómica). A continuación, se describirán brevemente estas disciplinas.

Los análisis metagenómicos analizan los genomas complejos dentro de nichos microbianos o ecosistemas, estas secuencias permiten comprender el potencial genómico completo de un ecosistema en particular (Denman, *et al*, 2015). Estos estudios generalmente inician por la extracción del ADN ambiental y surgen como una necesidad de identificar, caracterizar y clasificar a los microorganismos no cultivables dentro de un ecosistema. En general, los métodos basados en el análisis del gen ribosomal 16S proveen un vasto panorama acerca de las especies presentes. Sin embargo, generalmente la información obtenida provee poca información acerca del rol funcional de cada uno de los microorganismos identificados (Streit, *et al*, 2004).

La transcriptómica trata del estudio del transcriptoma, es decir del conjunto de transcritos en una célula, así como la cantidad de estos que han sido sintetizados en un estado específico del desarrollo o bien en determinadas condiciones (Wang, *et al*, 2009). Las técnicas contemporáneas usadas en el estudio del transcriptoma son los microarreglos y el RNA-Seq. Estos estudios han permitido el estudio de cientos de transcritos simultáneamente a un costo reducido por gen y mano de obra en comparación a los primeros acercamientos (Lowe, *et al*, 2017).

El término “proteoma” o “proteómica” fue introducido en 1995 (Kellner, 2000). El proteoma de un organismo es un elemento altamente dinámico ya que varía según el tejido, célula o compartimiento celular a estudiar además que igual

que el genoma, es influenciado por el medio ambiente celular (Pando, *et al*, 2007). La metaproteómica es el estudio del conjunto de proteínas de la microbiota de un ambiente en un determinado periodo de tiempo. A pesar del frecuente uso de los análisis metagenómicos y el reciente de los transcriptómicos, la traducción no siempre está relacionada directamente con los patrones de expresión de genes por lo que la funcionalidad debe ser comprobada a nivel protéico (Hart, *et al*, 2018).

El metaboloma es la expresión total de todas las moléculas presentes en la célula, tejidos, órganos y fluidos biológicos (Kaddurah, *et al*, 2008). La metabolómica, encargada de estudiar el metaboloma, es la identificación y cuantificación sistemática de todos los metabolitos presentes en un determinado organismo o tejido (Idle, *et al*, 2007). Los estudios metabolómicos se han empleado para evaluar la respuesta al estrés, estudios toxicológicos y farmacéuticos, comparación de mutantes, así como el estudio del cáncer y la diabetes (Shulaev, 2006)

Para resumir, las ciencias ómicas brindan información valiosa por sí solas. Sin embargo, es necesario entender que sólo la interrelación de ellas podrá ofrecer una imagen verídica de aquello que se quiere estudiar.

### **3.2 Avances y perspectivas gracias al uso de la Biología Molecular**

El rumen posee dos principios ecológicos clave: redundancia (sobreposición de la función a lo largo de varias especies) y resiliencia (resistencia a, y capacidad de recuperarse a la perturbación). Ambas propiedades proveen una estabilidad al mantenimiento de las funciones digestivas bajo diferentes condiciones de manejo y dieta (Weimer, 2015).

Los estudios sobre la microbiota, la fermentación microbiana y como estos componentes se veían alterados bajo diversos factores se remontan a mediados de 1800. En sus inicios, la identificación de los géneros microbianos sólo era posible mediante el aislamiento bacteriano y su posterior caracterización bioquímica, el conocimiento clásico del rumen marcaba que a pesar del basto número de

microorganismos y nichos, sólo unos cuantos eran los responsables del funcionamiento ruminal (Edwards, *et al*, 2004).

Aún desde sus inicios, ya era un hecho conocido el que las comunidades microbianas tenían una relación directa con los ácidos grasos volátiles, así como con la biosíntesis de la proteína microbiana (Tong, *et al*, 2018). Diversos factores han sido reportados como potenciales modificadores de la microbiota ruminal desde cambios en la dieta (Grilli, *et al*, 2016; Singh, *et al*, 2014, Petri, *et al*, 2017), la edad del animal (Dias, *et al*, 2017), la localización geográfica (Deenman, *et al*, 2015), la terapia con antibióticos (Singh, 2014), así como la estación del año, el fotoperiodo, el régimen alimenticio y la frecuencia y nivel de consumo de éste (Edwards, *et al*, 2004, Puniya, *et al*, 2015). De todos los factores que producen cambios en las comunidades ruminales, el efecto de la dieta sobre éstos ha sido el más estudiado. La diversidad y población bacteriana cambia bajo diferentes condiciones dietarias en diferentes especies.

Con los avances de la Biología Molecular y el surgimiento de nuevas herramientas, se esclareció que el número de microorganismos cultivables en el rumen sólo representaba una muy pequeña parte de la microbiota ruminal y se hizo evidente la necesidad de comprender la dinámica de estas comunidades bajo diversos factores por medio de otros acercamientos (Edwards, *et al*, 2004 y Deenman, *et al*, 2015).

Numerosas herramientas han sido empleadas en estos estudios entre las que se encuentran: técnica de polimorfismo de largo fragmento de restricción (RFLP), estudios de hibridación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y la Secuenciación de regiones variables de RNA ribosomal 16S a través de bibliotecas generadas por amplificación vía PCR, PCR cuantitativa, microarreglos y bibliotecas de ADN complementario son algunos ejemplos de las tecnologías que se han empleado (Edwards, *et al*, 2004 y Mao, *et al*, 2013).

La identificación bacteriana mediante la secuenciación del ARN 16S ha sido la herramienta taxonómica comúnmente usada para el estudio del ecosistema

ruminal bajo diferentes dietas o estados productivos (Tong, *et al*, 2018). Este análisis permite establecer relaciones filogenéticas existentes entre microorganismos (Rodicio, *et al*, 2004) además, es uno de los marcadores básicos para la caracterización de la comunidad de microorganismos procarióticos con capacidad de estimar la riqueza del microbioma, incluyendo de los microorganismos no cultivables (Barbetta, *et al*, 2015).

Como se revisó en secciones anteriores, cada microorganismo, o nicho dentro del rumen, está especializado en la degradación de ciertos sustratos. Cuando un cambio ocurre en la dieta de los rumiantes, las comunidades bacterianas cambian a un perfil más adecuado para la degradación de los componentes presentes en el medio. Así, el primer factor que induce un cambio en el microbioma ruminal es la dieta de transición.

Ejemplos de esto son los experimentos que se han realizado en diferentes especies de rumiantes, en donde a través de técnicas moleculares miden a las comunidades microbianas después de un cambio brusco de dieta. Estos experimentos se han realizado por medio de la comparación de diferentes dietas en diferentes grupos, así como en el mismo grupo con mediciones longitudinales. (Nathani, *et al*, 2013; Fang, *et al*, 2015; Liu, *et al*, 2016; Grilli, *et al*, 2016; Singh, *et al*, 2014).

La mayoría de los estudios concuerdan con lo ya reportado por la literatura, en que las bacterias que presentan un mayor potencial para degradar fibra son *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*. Sin embargo, diferentes estudios se han contradicho con cuál es la que se presenta en una mayor proporción cuando la dieta cambia a niveles altos de fibra (Singh, *et al*, 2014). Sin embargo, estas diferencias podrían inferirse a la falta de estandarización en los estudios moleculares, así como al clima, estado fisiológico, hospedero y los demás factores que afectan al microbioma ya vistos en esta revisión (Fliegerova, *et al*, 2014 y Mc Govern, *et al*, 2018).

A pesar de la larga historia de estudios sobre microbiota, los intentos de manipular la fermentación ruminal todavía están produciendo resultados a corto

plazo (Malmuthuge, *et al*, 2017). Estas limitantes presentes a principios del milenio se debían principalmente a factores como: la falta de sistemas confiables para la transformación de las principales bacterias ruminantes fibrolíticas, la escasa comprensión de los factores ecológicos que gobiernan la persistencia de las bacterias fibrolíticas y hongos en el rumen y del mecanismo de las hidrolasas para su manipulación, así como el limitado conocimiento del marco genómico funcional dentro del cual opera la degradación de las fibras. (Krause, *et al*, 2003).

Si bien aún quedan muchas áreas de oportunidad, el avance de herramientas biotecnológicas y el surgimiento de estudios como la metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica ha logrado un mejor entendimiento de la microbiota ruminal como ecosistema permitiendo obtener información para mejorar la eficiencia digestiva, bajar la producción de metano e identificar enzimas microbianas útiles en procesos industriales (Del Pozo, *et al*, 2012; Nathani, *et al*, 2013; Golder, *et al*, 2014 & Brown, *et al*, 2014).

Desde la última década, diversos investigadores se han enfocado en identificar genes que codifiquen a enzimas encaminadas a mejorar la eficiencia productiva, disminuir la emisión de metano, o bien, a identificar enzimas en el rumen útiles para procesos industriales (Brown, *et al*, 2014). Pocos microorganismos ruminales, como son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *N. patriaciarum* y *O. joyonni* han sido explorados para la identificación de genes (Puniya, *et al*, 2015), probablemente esto se deba a la ya caracterizada eficiencia para degradar sustratos. Genes aislados de los microorganismos anteriores han sido estudiados en diferentes sistemas de expresión como son; *Escherichia coli* o *Pichia pastoris*. (Puniya, *et al*, 2015).

El “Hungate1000”, catálogo informático que reúne 410 secuencias genómicas de microorganismos ruminales, ha sido un proyecto clave para el estudio del rumen como ecosistema, hasta antes de su creación sólo era posible contar con 15 secuencias genómicas (Hungate 1000, nd).

Dentro de los estudios genómicos, nuevas investigaciones se han apoyado en la creación de bibliotecas metagenómicas y la posterior selección de clones con

actividades específicas, así como su posterior secuenciación (Puniya, *et al*, 2015), logrando así la llamada Metagenómica funcional (Beloqui, 2006). Un ejemplo relevante en este ámbito es el caso de éxito en la identificación de una nueva enzima con actividad similar a lacasa a partir de una genoteca de microorganismos ruminales, demostrando así que en el medio ruminal anaeróbico se puede desarrollar una actividad ligninolítica (Beloqui, 2006).

En el siguiente cuadro, se enlistan algunos de los genes que codifican para enzimas lignocelulósicas que se han logrado identificar en la comunidad microbiana ruminal (Puniya, *et al*, 2015).

*Cuadro 1. Genes codificantes a enzimas descubiertos en el rumen (Puniya, et al, 2015)*

<b>Microorganismo</b>	<b>Gen</b>	<b>Enzima</b>	<b>Referencia</b>
<i>B. fibrisolvens</i> H17c	<i>endl</i>	Endoglucanasa	Berger et al. (1989)
<i>R. albus</i> SY3	<i>celA, celB</i>	Endoglucanasa	Poole et al. (1990)
<i>B. fibrisolvens</i> 49	<i>xynA</i>	Xilanasa	Mannarelli et al. (1990)
<i>B. fibrisolvens</i> H17c	<i>Bg1A</i>	B-glucosidasa	Lin et al. (1990)
<i>B. fibrisolvens</i> H17c	<i>cedI</i>	celodextrinasa	Berger et al. (1990)
<i>F. succinogenes</i> AR1	<i>endAFS</i>	Endoglucanasa	Cavicchioli et. Al. (1991)
<i>R. albus</i> F-40	<i>Egl</i>	Endoglucanasa	Deguchi et al. (1991)
<i>B. fibrisolvens</i> H17c	<i>xynB</i>	Xilanasa	Lin & Thomson (1991)
<i>P. ruminicola</i> AR20	<i>celA</i>	Endoglucanasa	Vercoe & Gregg (1992)



<b>Microorganismo</b>	<b>Gen</b>	<b>Enzima</b>	<b>Referencia</b>
<i>R. flavefaciens</i> 17	<i>xynA</i> , <i>xynB</i> , <i>xynD</i>	Xilanasa	Zhang & Flint (1992) Flint et al. (1993) Zhang et al. (1994)
<i>N. patriciarum</i>	<i>xynA</i>	Xilanasa	Gilbert et al. (1992)
<i>R. albus</i> F-40	<i>pRA201</i>	Xilanasa	Takano et al (1992)
<i>R. albus</i> F-40	<i>eglV</i>	Endoglucanasa	Karita et al. (1993)
<i>R. albus</i> AR67	<i>celA</i>	Endoglucanasa	Vercoe & Gregg (1993)
<i>R. flavefaciens</i> FD-1	<i>celE</i>	Endoglucanasa	Wang et al. (1993)
<i>P. ruminicola</i> 23	<i>xynA</i>	Xilanasa	Whitehead (1993)
<i>F. succinogenes</i> S85	<i>endB</i>	Endoglucanasa	Broussolle et al. (1994)
<i>N. patriciarum</i>	<i>celB</i>	Endoglucanasa	Zhou et al. (1994)
<i>F. succinogenes</i> S85	<i>xyn C</i>	Xilanasa	Zhu et al. (1994)
<i>N. frontalis</i> MCH3	<i>celA</i>	Endoglucanasa	Fujino et al. (1995)
<i>P. ruminicola</i> B <sub>14</sub>	<i>xynB</i>	Xilanasa	Gasparic et al. (1995)
<i>N. patriciarum</i> 27	<i>xyn C</i>	Xilanasa	Selinger et al. (1995)
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	<i>xynA</i>	Xilanasa	Chen et al. (1995)
<i>P. rhizinflata</i>	<i>eg1A</i>	B-glucanasa	Liu et al. (1995)
<i>F. succinogenes</i> BL2	<i>endC</i>	Endoglucanasa	B'era et al. (1996)
<i>F. succinogenes</i> SD35	<i>end-1</i>	Endoglucanasa	Ozcan et al. (1996)
<i>R. albus</i> 8	<i>celA</i>	Endoglucanasa	Attwood et al. 1996

<b>Microorganismo</b>	<b>Gen</b>	<b>Enzima</b>	<b>Referencia</b>
<i>Orpinomyces joyonii</i>	<i>celA</i>	Endoglucanasa	Liu et al. (1996)
<i>Orpinomyces joyonii</i>	<i>cel</i>	Endoglucanasa	Ye et al. (2001)
<i>Prevotella albensis</i> M384	<i>DPP-IV</i>	peptidasa	Walker et al. (2003)
<i>N. patriciarum</i>	<i>xynCDBFV</i>	Xilanasa	Liu et al (2005)
<i>F. succinogenes</i> S85	<i>Cel9B,</i> <i>Cel5H,</i> <i>Cel8B</i>	Endoglucanasa	Qui et al. (2007)

## **Justificación**

La identificación de los genes codificantes a enzimas que degraden el complejo lignocelulósico, especialmente de aquellos involucrados en la lisis y modificación de la lignina representa una alternativa para mejorar la digestibilidad de los forrajes lignificados, los cuáles son una opción viable y económica en la alimentación de los rumiantes y en ocasiones el único ingrediente disponible para los sistemas productivos de México.

Así mismo la identificación de los microorganismos participantes en la degradación del complejo, ofrecerá un panorama de la dinámica de las poblaciones bacterianas, un mejor entendimiento del ecosistema ruminal y la identificación de posibles microorganismos diana para el análisis de su genoma por su potencial catalítico.

## **Hipótesis**

Bovinos adaptados a una dieta basada en rastrojo de maíz permitirá la identificación de microorganismos, así como de los genes, participantes en la degradación y/o modificación de la lignina y celulosa.

## **Objetivos**

### **1. Objetivo general**

- a) El presente trabajo busca la obtención de los genes codificantes celulolíticas a partir de la construcción de una biblioteca genómica a partir del ADN de microorganismos ruminales adaptados.
- b) Estudiar los cambios de los microorganismos ruminales de bovinos adaptados a forraje lignificado como es el rastrojo de maíz mediante metagenómica.

### **2. Objetivos particulares**

- 1) Construcción de una biblioteca genómica con segmentos genómicos de 40 kb de longitud, a partir de microorganismos ruminales adaptados al rastrojo.
- 2) Tamizaje de la biblioteca genómica en medios selectivos para identificar clonas con actividad celulolítica/ligninolítica.
- 3) Determinación de los cambios de las poblaciones microbianas ruminales presentes en bovinos adaptados a dietas celulolíticas mediante metagenómica.

## Material y Métodos

El protocolo de investigación fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales de Experimentación con el número de protocolo *MC-2017/2-19*.

El trabajo se desarrolló en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPISA) en la Ciudad de México, México, donde se encontraban los animales.

La extracción del material genético, así como la construcción de la biblioteca fue llevado a cabo en la Unidad de Genética de la Nutrición (UGN) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) en la Ciudad de México, México. Se realizaron extracciones adicionales de ADN en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAyB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

### 1. ***Animales empleados***

Se utilizaron seis vacas Holstein con un peso promedio de 595 kg  $\pm$  96 kg clínicamente sanas. Los animales fueron alimentados con una dieta de rastrojo de maíz (RM), premezcla mineral (Ca 40g/kg, Mg 10g/kg, NaCl 300g/kg, Mn 2.5 g/kg, Zn 3g/kg, I 0.05 g/kg, Co 0.025 g/kg, Se 0.025 mg/kg) y agua fresca *ad libitum* durante 45 días, previo a este periodo, los animales se encontraban alimentados con heno de avena y ensilado de maíz (50:50 en base seca), como dieta base (DB). La composición del rastrojo de maíz fue realizada mediante un análisis de fracciones de la Fibra (Van Soest, et al, 1985) junto con un análisis Químico Proximal para determinar el porcentaje de materia seca ((MS, método 934.01; AOAC 2005) y proteína cruda (PC, método 2001.11; AOAC 2005).

Cuadro 2 Análisis Químico Proximal y de las fracciones de la Fibra (Van Soest) del rastrojo de maíz empleado en la alimentación de los animales (Base seca)

<b>Método AOAC Químico Proximal y análisis de fracciones de la fibra (Van Soest)</b>		
	BH (%)	BS (%)
Materia seca	86.2	100
Humedad	13.8	0
Proteína Cruda (Nitrógeno *6.25)	3.47	4.03
Fibra Neutro Detergente	-	64.32
Contenido celular	-	35.68
Fibra Ácido Detergente	-	36.54
Hemicelulosa	-	27.78
Celulosa	-	27.84
Lignina	-	4.84

Durante este periodo, los animales fueron alojados en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, dentro de un corral separado del resto de los animales para evitar cambios en la dieta.

## 2. ***Colección de la muestra***

Al inicio y término del periodo con la dieta RM, se colectó el líquido ruminal por medio de una sonda esofágica de 12 mm de diámetro y una bomba de vacío (Pittsburg Automotive, EUA). El líquido ruminal fue filtrado a través de cuatro capas de gasa y almacenado en Tubos Falcon de 50 ml. Las muestras, fueron transportadas en un termo con capacidad de 38 litros (CHART, Industries, EUA) con

nitrógeno líquido para posteriormente ser resguardadas a -80°C hasta el momento del procesamiento para la extracción del ADN. Al término de este periodo, los animales regresaron a su dieta base compuesta por ensilado de maíz, heno de avena, sales minerales y agua *ad libitum*

### **3. Obtención de la pastilla bacteriana.**

Se realizaron centrifugaciones utilizando una centrifuga refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania) para separar a los microorganismos de las partículas de alimento presentes en la muestra. La pastilla obtenida de la primera centrifugación (10000g.), fue homogeneizada completamente en 6 ml de buffer salino de fosfatos (PBS 1X). El segundo volumen fue centrifugado a 200g para eliminar las partículas de alimento presentes. El sobrenadante fue colectado y repartido en microtubos de 2 mL para la extracción del material genético. A partir de este momento el sobrenadante será mencionado como “la muestra”.

### **4. Extracción de ADN**

El material genético fue extraído según los protocolos de los kits: Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit (Mobio, EUA) y QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen, EUA). Sin embargo, se realizaron algunas modificaciones para asegurar la integridad y cantidad del material genético. El procedimiento realizado se describe en los *Anexos 1 y 2*.

La calidad de ADN extraído se corroboró por medio de un gel de agarosa al 0.5% utilizando como referencia el marcador de peso molecular Lambda DNA-Mono Cut Mix (New England Biolabs, EUA). Aquellas muestras en las que la banda aparecía con un peso entre las bandas de 48,502 y 38,416 pares de bases y sin señales de degradación se consideraron aptas para la construcción de la biblioteca.

Las muestras seleccionadas fueron cuantificadas por medio de un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) en donde de manera adicional se revisó la calidad por medio de la relación 260/280.



## 5. Construcción de la biblioteca genómica

Para continuar con la construcción de la biblioteca, se acumularon las muestras de material genético obtenidas de la extracción a partir de líquido ruminal.

Debido a que el ADN debía estar a una concentración de 0.5 ng/μl en un volumen menor o igual a 52 μl, se procedió a realizar una precipitación, en la que después de juntar todos los volúmenes de elución de las extracciones de ADN, éste se dejó incubando a -70°C por al menos 12 horas junto con 10% v/v de una solución 3 M de acetato de Sodio y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Después de la incubación, se realizó una centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos y el pellet resultante se lavó dos veces con etanol al 70% frío para resuspender en un volumen final de 52 μl con agua libre de nucleasas.

La biblioteca fue construida de acuerdo con el protocolo del kit EpiFos Fosmid Library Production Kit (epicentre, EUA) y el uso del vector pEpiFOS<sup>TM</sup>-5 (Figura 1). El procedimiento se describe detalladamente en el Anexo 3.

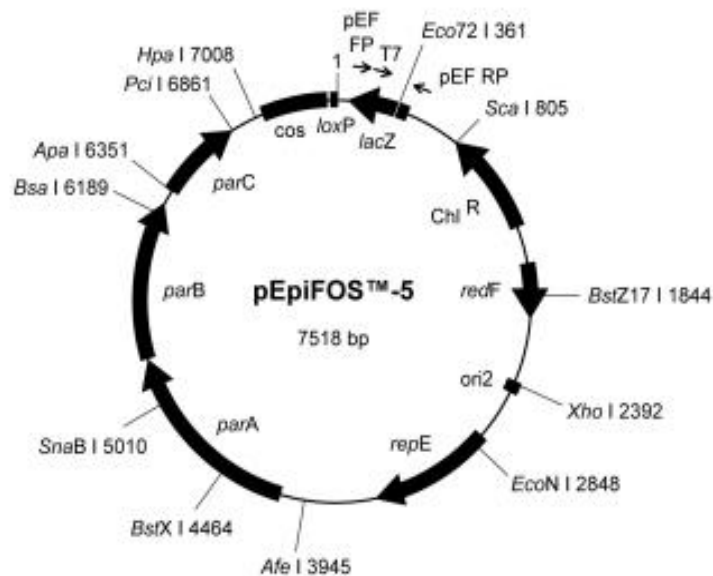


Figura 1. Fósido pEpiFOS<sup>TM</sup>-5

Las clonas obtenidas de la Biblioteca, fueron sembradas en medios LB-CM siguiendo un patrón para facilitar la identificación en caso de tener clonas positivas a la actividad enzimática. El patrón usado para la identificación de las clonas se muestra en la Figura 2. La identificación de las clonas fue dada por el número de caja y posición dentro de la misma (C#B#).

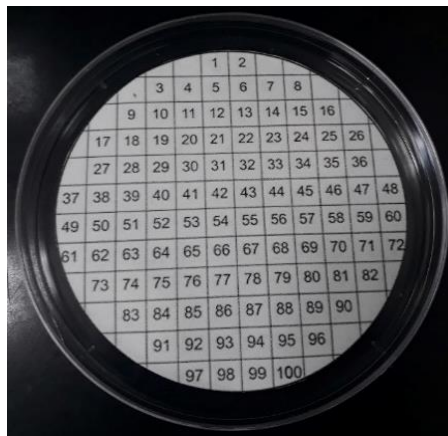


Figura 2. Patrón para la identificación de las clonas obtenidas en la Biblioteca

## 6. ***Extracción de los plásmidos***

Adicionalmente se seleccionaron clonas al azar para la extracción de Plásmidos. Estos fueron extraídos de acuerdo con las indicaciones del kit: QIAprep Spin Mini Prep Kit (Qiagen, EUA). *Anexo 4.*

## 7. ***Tamizaje***

Las clonas obtenidas de la biblioteca fueron sometidas a diferentes medios selectivos para corroborar la actividad enzimática sobre celulosa y la lignina. La composición de los medios utilizados se describe a continuación:

Cuadro 3. Composición por litro de los medios empleados para evaluar la actividad enzimática de las clonas obtenidas en la biblioteca

<b>Medio</b>	<b>Enzimas buscadas</b>	<b>Composición por litro</b>
CMC 0.5%	Celulasas	10g Triptona, 5g Extracto de Levadura, 10g NaCl, 0.0125g Cloranfenicol, 5g CMC, 0.1 mM IPTG y 10 g Agar
Guayacol	Lacasas	10g Triptona, 5g Extracto de Levadura, 10g NaCl, 0.0125g Cloranfenicol, 2.4 mM guayacol, 0.16 mM CuSO <sub>4</sub> , 0.1 mM IPTG y 20 g Agar
ABTS	Peroxidasas	10g Triptona, 5g Extracto de Levadura, 10g NaCl, 0.0125g Cloranfenicol, 0.25g ABTS, 0.1 mM IPTG y 20g Agar
ABTS-Mn	Manganeso peroxidasas	10g Triptona, 5g Extracto de Levadura, 10g NaCl, 0.0125g Cloranfenicol, 0.25g ABTS, 0.5 mM MnCl <sub>2</sub> , 0.1 mM IPTG y 20 g Agar
MSM-KI	Enzimas lignolíticas	10g Lignina, 4.55g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.53g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.5 MgSO <sub>4</sub> , 5g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 0.5g CaCl <sub>2</sub> , 0.0125g Cloranfenicol, 0.1 mM IPTG y 20 g Agar

Las clonas se dejaron incubando en los medios a 37°C durante 5 días, una vez terminado el periodo de incubación, se realizaron diferentes pruebas para evidenciar la actividad enzimática de las celulasas y peroxidasas.

Para evaluar la actividad enzimática de las celulasas se realizó la tinción de los medios CMC 0.5% con una solución Rojo Congo al 1% durante 15 minutos, pasado el tiempo, se retiró el exceso de colorante y se añadió una solución de NaCl 0.1 M durante 15 minutos y en cantidad suficiente para cubrir todas las clonas

presentes. Las clonas fueron consideradas positivas tras la aparición de un halo naranja alrededor de ellas (Ferrés, *et al*, 2014).

Para las peroxidases, después del periodo de incubación, las clonas fueron cubiertas por una solución de Peróxido de Hidrógeno al 1.25%, aquellas clonas con un cambio de color azul, fueron consideradas positivas (Ferrés, *et al*, 2014).

La presencia de lacasas fue evaluada mediante el medio con Guayacol, las colonias con una fuerte pigmentación café fueron consideradas positivas. Adicionalmente se evaluó si las clonas eran capaces de crecer con la lignina como única fuente de carbono.

Las clonas con actividad positiva fueron sembradas individualmente en cajas con medio LB-Cm. Una vez formadas las colonias tras una incubación de 37°C durante 24 horas, se tomó una colonia y se inoculó en 15 ml de caldo LB-CM. Después de 24 horas de incubación a 37°C y rotación constante, se tomaron 700 µl del cultivo y se colocaron en un criovial con 300 µl de Glicerol. Los crioviales fueron rotulados según la caja y posición en la que se encontraba la clona positiva.

#### **8. *Preservación de la biblioteca***

Para la preservación de las clonas y su posterior uso en un tamizaje futuro se preparó un agar LB adicionado con glicerol al 30% y 0.1 M CaCl<sub>2</sub>. Una vez preparadas las cajas con el medio, se les agregaron rodajas estériles de papel filtro identificadas según el número de caja como las indicadas en la Figura 2. Las clonas fueron sembradas en el papel filtro según caja y número correspondiente y se dejaron incubar hasta 72 horas a 37°C para lograr un crecimiento abundante. Las rodajas fueron colocadas sobre una superficie de papel filtro estéril de 10 x 10 cm de papel filtro estéril y almacenados a -80°C en paquetes de 20.

#### **9. *Caracterización de microbiota ruminal***

El método que se utilizó para la caracterización de la microbiota, fue la secuenciación masiva del gen 16s del ARN ribosomal (ARNr) de las bacterias. Las muestras biológicas que se utilizaron fueron las pastillas microbianas cuya

obtención se describió anteriormente en este mismo capítulo. El ADN se obtuvo a partir de 500  $\mu$ L de la pastilla bacteriana. Se centrifugó (Thermo Scientific, Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge, Alemania), a 5000 RPM por 10 minutos, se decantó el sobrenadante. A la pastilla, resultado de la centrifugación, se le agregaron 567  $\mu$ L de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se re suspendiendo mediante pipeteo. Posteriormente se añadieron 30  $\mu$ L de SDS (10%) y 3  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL). Se incubó a 37 °C (Thermo Scientific, Precision GP-05, EUA) durante una hora. Se adicionaron 100  $\mu$ L de NaCl 5M y 80  $\mu$ L de CTAB/NaCl (10 % CTAB, 0.7 M NaCl) y se mezcló vigorosamente. Se incubó a 65 °C por 10 minutos. Después se añadieron 80  $\mu$ L de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se homogeneizó para después centrifugar a 14000 RPM por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se igualó en volumen con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 14000 RPM por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante para adicionarle 200  $\mu$ L de cloroformo. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para después centrifugar a 14000 RPM por 10 minutos. El sobrenadante recuperado se igualó en volumen con isopropanol frío y se almacenó en congelación. Al día siguiente se centrifugó a 14000 RPM por 10 minutos. Se decantó el isopropanol y se realizaron dos lavados con 300  $\mu$ L de etanol al 70%. La suspensión se homogeneizó hasta desprender la pastilla y se centrifugó a 1000 RPM por 5 minutos, decantando el etanol en cada paso. Por último, se dejó secar la pastilla de ADN para posteriormente re suspenderla en 100  $\mu$ L de buffer TE para su cuantificación. El ADN se cuantificó por dos métodos para asegurar su calidad, primero se empleó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) y posteriormente se empleó un fluorómetro Qubit 3 (Thermo Scientific, EUA).

Para el análisis del 16s rARN se empleó la plataforma Miseq de Illumina, dicha plataforma se basa en secuenciación por síntesis, para ello se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S, usando oligonucleótidos cebadores para dichas regiones que además contenían un adaptador “overhand”, propio de Illumina (F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCT

ACGGGNGGCWGCAG-3' y R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGGACTACH VGGGTATCTAATCC-3').

Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron mediante reacciones de PCR con un volumen total de 25µL, de los cuales 2.5µL fueron de ADN genómico (5ng/µL en 10mM Tris pH 8.5), 12.5 µL de High Fidelity DNA polymerase 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5µL de cada oligonucleótido cebador (1µM). Esta mezcla se incubó en el termociclador usando el siguiente programa: 3 min a 95°C, seguido de 25 ciclos amplificación los cuales consistían desnaturalización (30s a 95°C), alineamiento (30s a 55°C) y extensión (30s a 72°C). La extensión final consistió en 5 min a 72°C. Los amplicones fueron purificados mediante el uso de perlas magnéticas AMPure XP beads y se verificó su tamaño en una electroforesis capilar en el Qiaxcel, el tamaño aproximado fue de 550 pares de bases (pb).

Una vez pasado el control de calidad se procedió a indexar las muestras usando los adaptadores de Illumina Nextera XT Index Kit (v.2, Set A). Para este proceso se tomaron 5µL del primer producto de PCR, 25µL de High Fidelity DNA polymerase 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5µL de cada oligonucleótido cebador (Índice), teniendo un volumen total de 50µL, los cuales se mezclaron y se incubaron de nuevo al termociclador, corriendo el siguiente programa 3 min a 95°C, seguido de 8 ciclos amplificación los cuales consistían desnaturalización (30s a 95°C), alineamiento (30s a 55°C) y extensión (30s a 72°C). La extensión final consistió en 5 min a 72°C. Este producto se purificó y analizó su integridad como el anterior, estos amplicones tuvieron un tamaño aproximado de 610 pb.

Se determinó la concentración de ADN de doble hebra con fluorometría (fluorometer Qubit 3.0, High sensitive kit). La librería final se mezcló de manera equimolar y se secuenció en la plataforma de Illumina MiSeq (MiSeq Reagent Kit V.3, 600 cycles) siguiendo las instrucciones del proveedor, generando lecturas de 300 bases en cada dirección.

Finalmente, los datos obtenidos se analizaron usando el programa QIIME y se analizaron los efectos de tratamiento sobre la población microbiana mediante un análisis de varianza, para un diseño completamente al azar utilizando el

procedimiento MIXTO de SAS 9.1 (2003). Los efectos fijos consistieron en el tratamiento y el animal como efecto aleatorio. El modelo estadístico fue el siguiente:  $y_{ij} = \mu_i + \xi_{ij}$ . Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos. La comparación de medias de los OTUS con distribución normal se realizó con la prueba de Tukey, considerando significativo cuando el valor de probabilidad fue menor a  $\leq 0.05$  y como una tendencia cuando del valor de P fue  $\geq 0.05$  y  $\leq 0.10$ . El análisis de varianza de los OTUS con distribución no paramétrica se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, considerando significativo cuando el valor de probabilidad fue menor a  $\leq 0.05$ .

## Resultados

### 1. *Construcción y tamizaje de la biblioteca genómica*

El líquido ruminal, extraído a partir de bovinos alimentados con RM durante 4 semanas, permitió la obtención de 39.06 µg de ADN microbiano de buena calidad y con un peso promedio mayor a 38 kb (Figuras 3 y 4). El cuadro 4 muestra la cantidad de ADN obtenido por muestra, la relación 260/280 del material genético, así como el método de extracción empleado. El cuadro 5 indica la cantidad inicial de ADN empleado en la construcción de la biblioteca, así como el ADN resultante de la reacción de precipitación y utilizado para la reparación de los extremos romos en la preparación del vector.

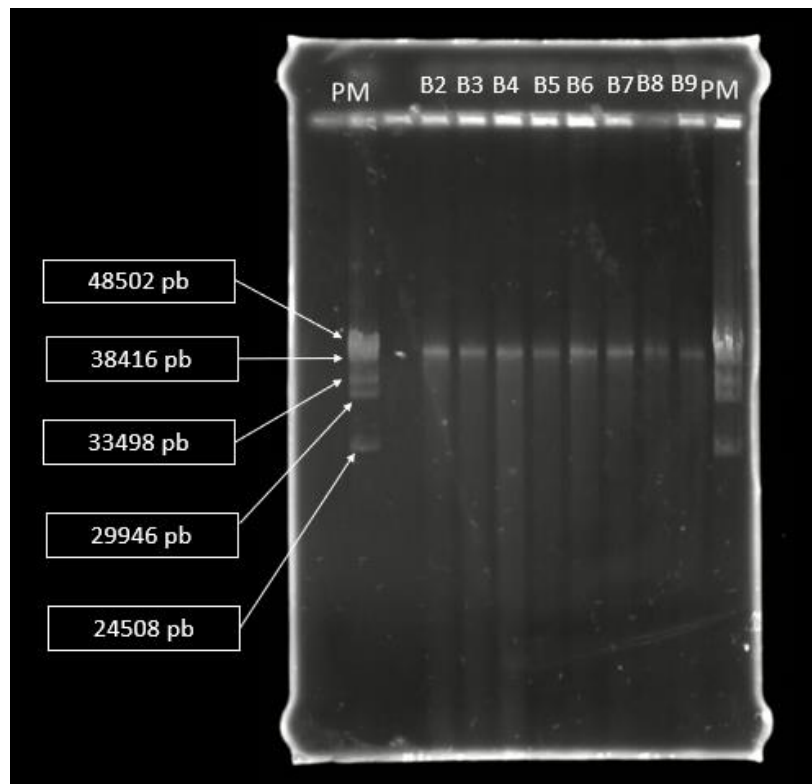


Figura 3. ADN obtenido a partir de líquido ruminal en un gel de agarosa al 0.5% usando como referencia el marcador de peso molecular Lambda DNA-Mono Cut Mix (New England Biolabs, EUA). PM: peso molecular B2-B9: muestras de ADN. Tinción con bromuro de etidio al 0.0



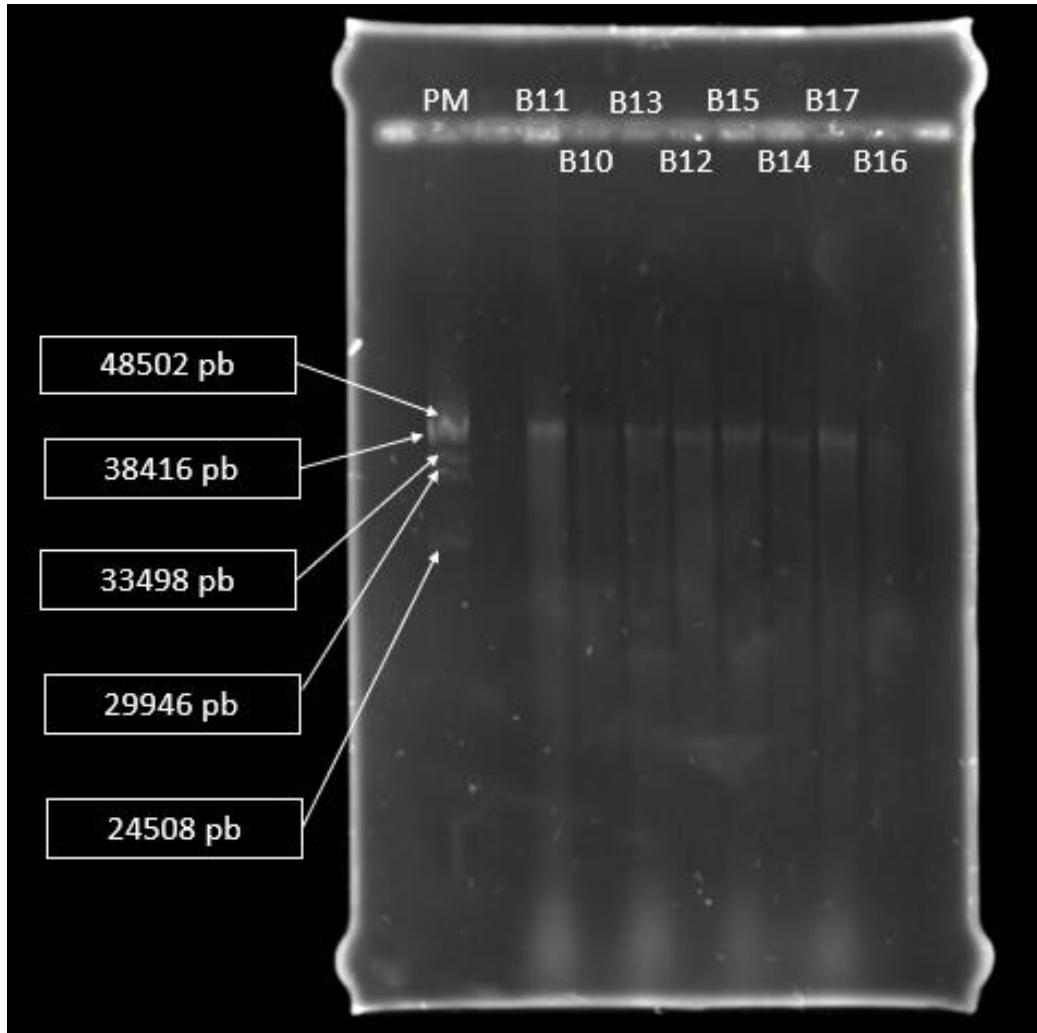


Figura 4. ADN obtenido a partir de líquido ruminal en un gel de agarosa al 0.5% usando como referencia el marcador de peso molecular Lambda DNA-Mono Cut Mix (New England Biolabs, EUA). PM: peso molecular B10-B17: muestras de ADN. Tinción con bromuro de etidio al 0.01%

Cuadro 4. Cuantificación del ADN obtenido por muestra, relación 260/280 del material genético, y método de extracción empleado para la construcción de la biblioteca genómica.

Identificación	Concentración (ng/μg)	Volumen de elución	μg totales	Relación 260/280	Método de extracción
A1	28.3	25	0.7075	1.82	Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit (Mobio, EUA)
A2	7.3	40	0.292	1.78	
A3	10.5	40	0.42	1.56	
A4	8.1	40	0.324	1.64	
A5	10.2	40	0.408	2.17	
A6	10.4	40	0.416	1.55	
A7	8.6	40	0.344	1.78	
A8	6	40	0.24	1.76	
A9	5.4	40	0.216	1.3	
A10	5.4	40	0.216	1.43	
A11	5.1	40	0.204	2.11	
A12	3.8	40	0.152	2.8	
A13	5.8	40	0.232	1.76	
A14	4.6	241	1.1086	1.77	
A15	5.3	142	0.7526	1.7	
A16	6.3	40	0.252	1.24	
B1	16.2	90	1.458	2	QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen, EUA)
B2	19.7	110	2.167	2.03	
B3	19.4	110	2.134	2.03	
B4	26.6	110	2.926	2.11	
B5	21.8	110	2.398	2.24	
B6	18.2	110	2.002	1.87	
B7	14.8	110	1.628	1.99	
B8	7.7	110	0.847	2.19	
B9	15.4	110	1.694	1.89	
B10	8.8	40	0.352	1.75	
B11	26.1	90	2.349	1.95	
B12	7	40	0.28	2.14	
B13	12.9	90	1.161	2.01	
B14	11.2	40	0.448	1.81	
B15	14.1	90	1.269	2.1	
B16	10	40	0.4	1.92	

Identificación	Concentración (ng/μg)	Volumen de elución	μg totales	Relación 260/280	Método de extracción
B17	15.8	90	1.422	1.98	
B18	12.03	40	0.4812	1.81	
B19	23.1	90	2.079	2.21	
B20	7.2	40	0.288	1.75	
B21	22.2	90	1.998	2.06	
B22	11.1	40	0.444	2.15	
B23	19	90	1.71	2.1	
B24	7	40	0.28	1.93	
B25	23.2	90	2.088	2	
B26	33.3	40	1.332	2.11	
B27	26.2	90	2.358	2.05	

Cuadro 5. Cuantificación del ADN, volumen de los reactivos empleados y relación 260/280 del material genético usado para la construcción de la biblioteca genómica

Identificación	Muestras empleadas	ADN (μg) Ci <sup>∞</sup>	Volumen de reactivos empleado			ADN (μg) Cf <sup>*</sup>	Relación 260/280
			Volúmen inicial (ml)	Acetato de Sodio (ml)	Etanol (ml)		
C	A1-A16, B1-B9	20.86	2.147	0.214	5.902	15.65	1.97
D	B10- B27	18.20	1.140	0.114	3.135	13.51	1.89

<sup>∞</sup>: concentración inicial, <sup>\*</sup>: concentración final

El material genético extraído del líquido ruminal permitió la obtención de una biblioteca genómica de 8016 clonas. La extracción de plásmidos a partir de clonas al azar y su digestión enzimática con la enzima de restricción *EcoRI* se empleó para verificar la presencia de insertos de aproximadamente 40 kb con patrones de restricción diferentes (Figura 5)

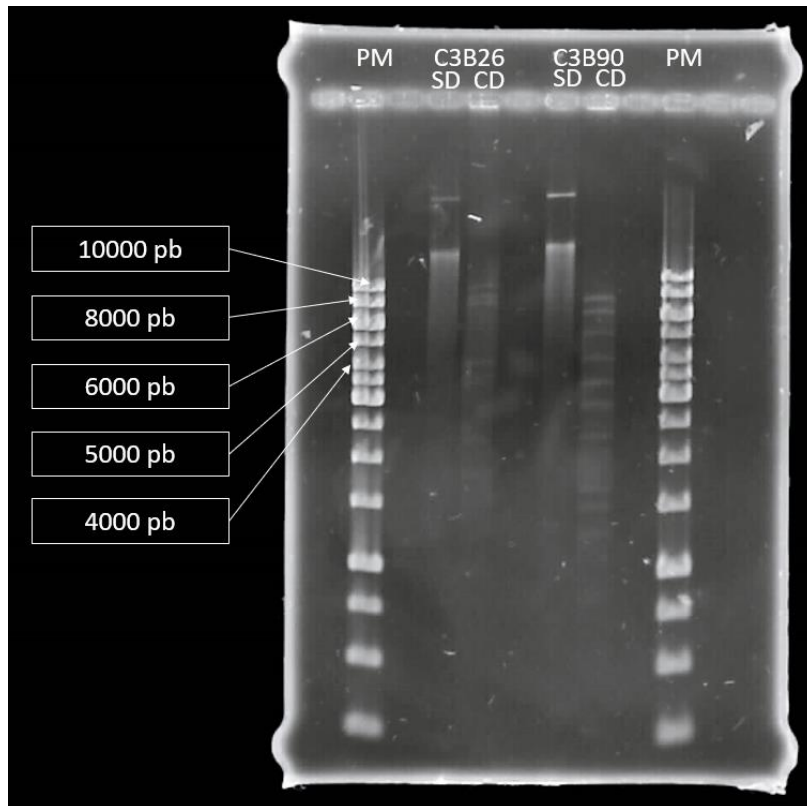


Figura 5. Gel de agarosa al 1% con Plásmido con (CD) y sin (SD) digestión enzimática con EcoRI de dos colonias (C3B26 y C3B90) tomadas al azar. Marcado de peso molecular (PM) usado como referencia: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA) Tinción con Bromuro de etidio al 0.01%.

Se probaron 3000 clonas en los medios selectivos CMC 0.5%, Guayacol, ABTS y ABTS-Mn. Ninguna clona mostró actividad positiva a peroxidasa.

Más del 80% de las clonas mostraron cambios en su pigmentación en el medio adicionado con Guayacol, sólo una de ellas mostró un fenotipo fuertemente positivo: C3B26 (Figura 6). La actividad celulolítica fue positiva en todas las clonas que mostraron crecimiento en el medio (Figura 7).

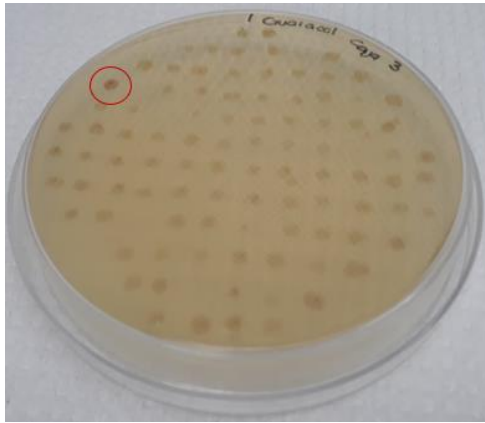


Figura 6. Cambios en la pigmentación de C3B26 en el medio adicionado con Guayacol

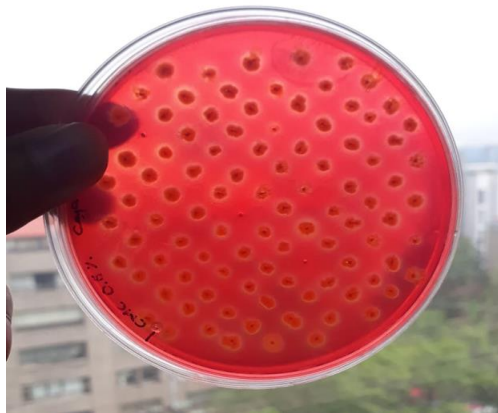


Figura 7. Clonas positivas a la actividad celulolítica en el medio CMC 0.5%

Adicionalmente se verificó si las clonas podían mostrar crecimiento usando a la lignina como única fuente de carbono. Tres clonas mostraron un ligero crecimiento poco uniforme de las 1000 probadas: C33B27, C43B86 y C70B32.

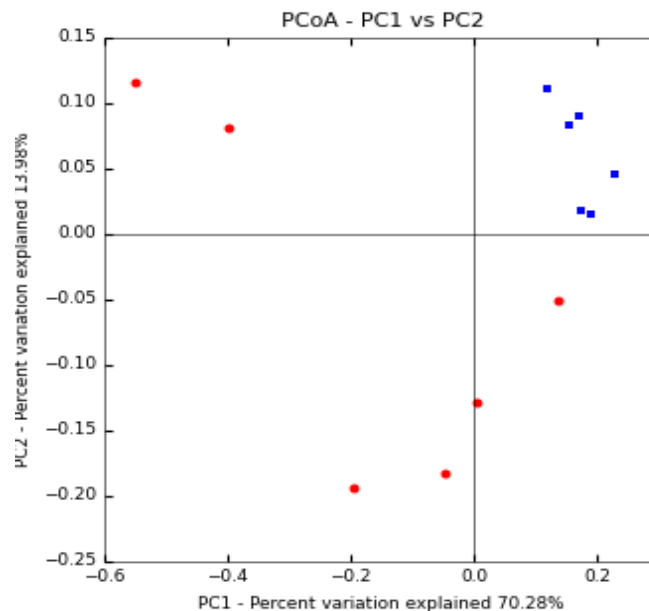
## 2. **Caracterización de la microbiota ruminal.**

Las muestras de contenido ruminal tomadas al inicio y al final del periodo experimental se utilizaron para realizar la secuenciación de las regiones V3-V4 del 16S rRNA, esto con la finalidad de estudiar la diversidad bacteriana que se ve

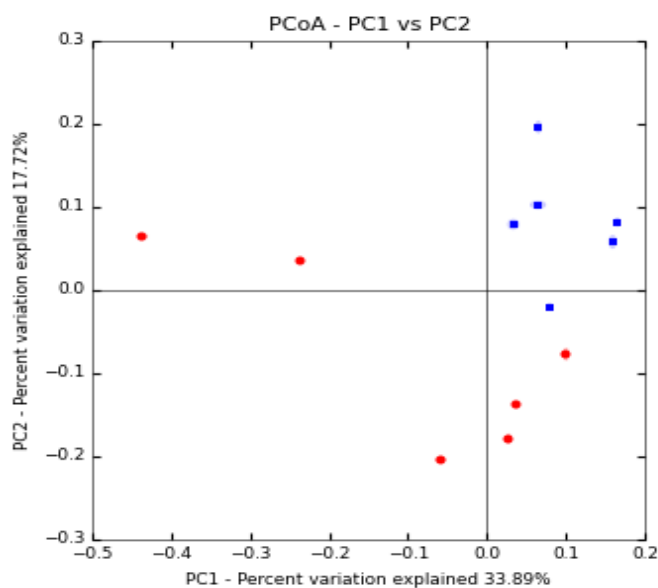
favorecida bajo una dieta con RM, el cual contiene lignina además de carbohidratos estructurales.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) a partir de la distancia filogenética en QIIME versión 1.9 para evaluar la diversidad entre la microbiota ruminal tomando en cuenta la abundancia relativa de cada unidades taxonómicas operacionales (OTU) para cada dieta (Figura 8). Tanto en las gráficas del análisis ponderado (diferencia cuantitativa entre los OTUs presentes en ambas poblaciones) y no ponderado (diferencia entre presencia o ausencia de los OTUs en ambas poblaciones) se puede ver una clara agrupación de los microorganismos presentes en el grupo de dieta base (rojo) y en el alimentado con rastrojo de maíz (azul). Sin embargo, para el análisis no ponderado se observa un menor porcentaje de variabilidad entre los grupos.

El porcentaje de varianza explicada para cada componente principal aparece indicado en cada eje.



A



B

Figura 8. Agrupamiento de las comunidades bacterianas ruminales bajo diferentes tipos de dieta mediante un análisis de componentes principales (PcoA) a partir de la matriz de distancia filogenética fracción ponderado (A) y no ponderado (B).

En la Figura 9 se presentan los cambios observados a nivel Filo y como se puede observar en el Cuadro 6 y en la Figura 10, cuando los animales consumieron la dieta RM presentan un aumento significativo en *Lentisphaerae* (0.003 a 0.01%,  $P=0.0466$ ) y en *Spirochaetes* (0.037 a 0.103%,  $P=0.0040$ ).

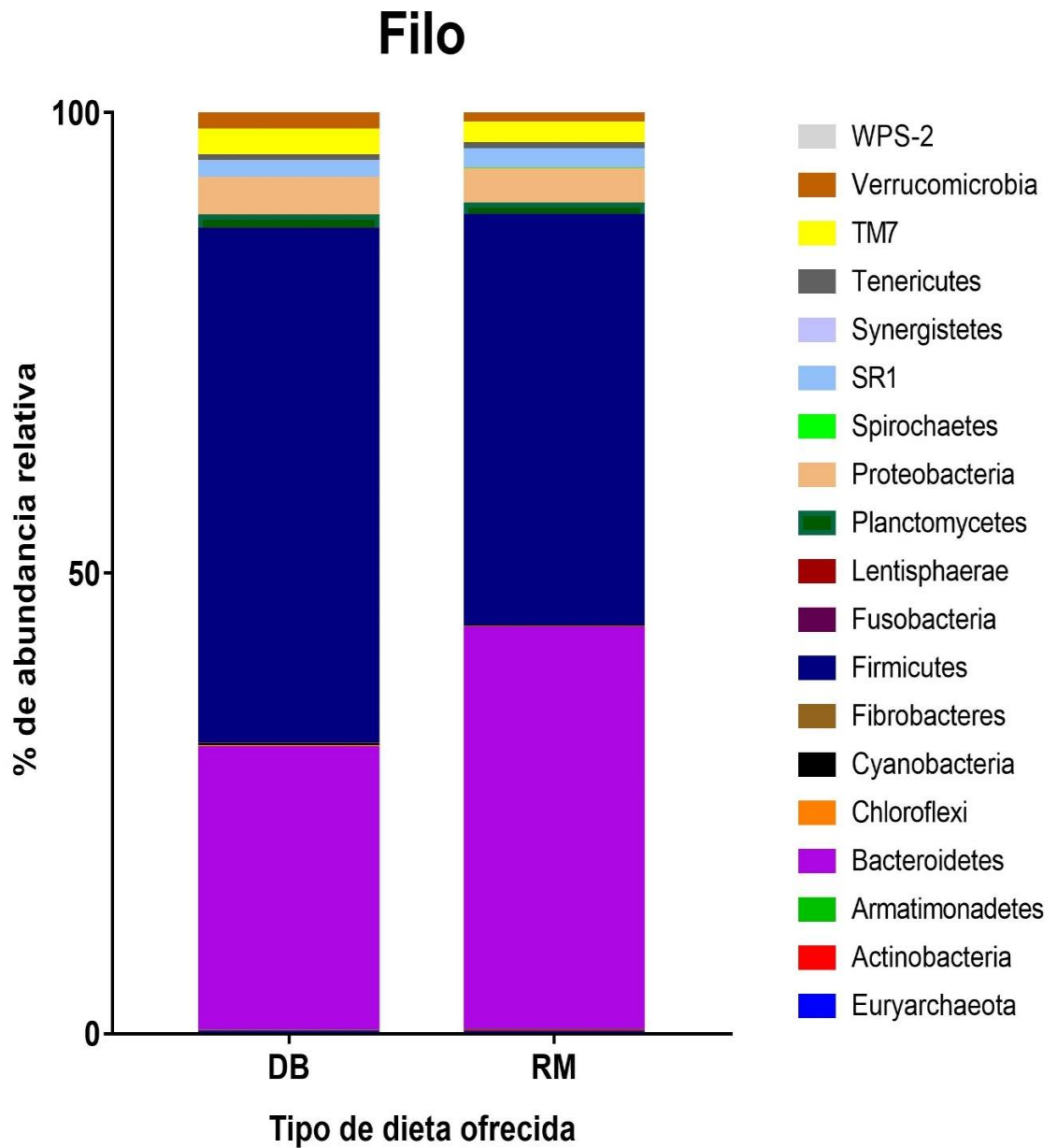


Figura 9. Microbiota presente a nivel filo en bovinos alimentados con una dieta base compuesta por ensilado de maíz y heno de avena (DB) y con una dieta de rastrojo de maíz (RM) administrada durante 45 días



Cuadro 6. Abundancia relativa de los filos encontrados en el rumen con una dieta base (ensilados de maíz y heno de avena) y bajo una dieta de rastrojo de maíz administrada durante 45 días.

Filo	Tipo de Dieta ofrecida		EEM
	Dieta base	Rastrojo de maíz	
Euryarchaeota	0.040	0.058	0.011
Actinobacteria	0.059	0.111	0.023
Armatimonadetes	0.062	0.046	0.006
Bacteroidetes	30.717	43.672	4.242
Chloroflexi	0.129	0.083	0.020
Cyanobacteria	0.202	0.130	0.104
Fibrobacteres	0.071	0.039	0.014
Firmicutes	55.928	44.602	4.495
Fusobacteria	0.060	0.006	0.024
<b>Lentisphaerae</b>	<b>0.003<sup>b</sup></b>	<b>0.010<sup>a</sup></b>	<b>0.002</b>
Planctomycetes	1.404	1.230	0.205
Proteobacteria	4.058	3.727	0.515
<b>Spirochaetes</b>	<b>0.037<sup>b</sup></b>	<b>0.103<sup>a</sup></b>	<b>0.013</b>
SR1	1.756	2.031	0.451
Synergistetes	0.014	0.035	0.008
Tenericutes	0.667	0.597	0.112
TM7	2.784	2.305	0.261
Verrucomicrobia	1.987	1.187	0.473
WPS-2	0.021	0.027	0.006

<sup>ab</sup> Literales diferentes, significan diferencia  $P < 0.05$   
EEM = Error estándar de la media

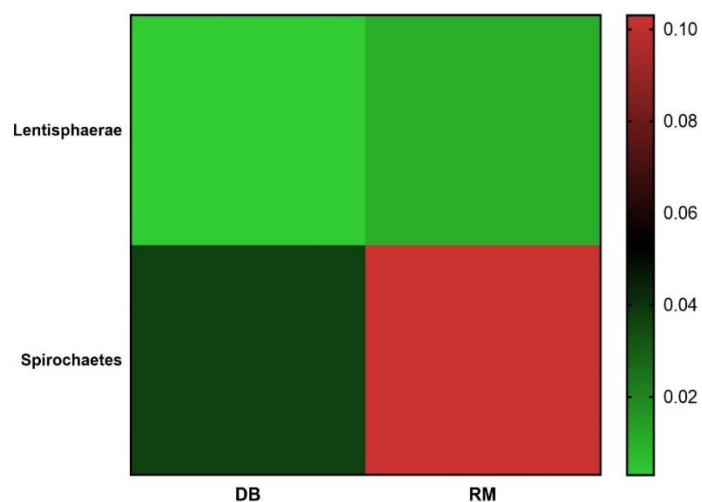


Figura 10. Abundancia de los filos que presentaron aumento después de cambiar la alimentación de una dieta base (DB) a la del rastrojo de maíz (RM)

En la Figura 11 se presentan los cambios observados a nivel de género y como se puede observar en el Cuadro 7 hay una disminución significativa en los géneros *Propionibacterium* (0.06 a 0.003%,  $P=0.0161$ ), *Bacteroides* (2.18 a 0.13%,  $P=0.0250$ ), *Odoribacter* (0.07 a 0.003%,  $P=0.0360$ ), *Paraprevotella* (0.12 a 0.003%,  $P=0.0161$ ), *SHD-231* (0.38 a 0.17%,  $P=0.0163$ ), *Fibrobacter* (0.19 a 0.08%,  $P=0.0419$ ), *Clostridium* (Clostridiaceae) (6.52 a 3.07%,  $P=0.0104$ ), *Dehalobacterium* (0.12 a 0.03%,  $P=0.0374$ ), *Coprococcus* (2.42 a 1.36%,  $P=0.0104$ ), *Lachnospira* (0.14 a 0.006%,  $P=0.0161$ ), *L7A\_E11* (0.21 a 0.08%,  $P=0.0227$ ), *Ochrobactrum* (0.07 a 0.03%,  $P=0.0250$ ), *Desulfobulbus* (0.06 a 0.02%,  $P=0.0101$ ), *Bilophila* (0.04 a 0.01%,  $P=0.0229$ ), *Desulfovibrio* (1.01 a 0.34%,  $P=0.0039$ ) y *Escherichia* (0.22 a 0.01%,  $P=0.0374$ ) con RM, y se detectó un aumento significativo (Figura 12) en los géneros *Corynebacterium* (0.002 a 0.08%,  $P=0.0033$ ), *Prevotella* (Prevotellaceae) (30.40 a 48.15%,  $P=0.0072$ ), *Lysinibacillus* (0.04 a 0.10%,  $P=0.0322$ ), *Jeotgalicoccus* (0.002 a 0.06%,  $P=0.0048$ ), *Clostridium* (Lachnospiraceae) (0.02 a 0.10%,  $P=0.0148$ ), *Pseudobutyrvibrio* (3.09 a 4.93%,  $P=0.0226$ ), *Selenomonas* (0.46 a 1.05%,  $P=0.0313$ ), *RFN20* (0.17 a 0.56%,  $P=0.0334$ ), *Sphingomonas* (0.04 a 0.17%,  $P=0.0039$ ), *Ruminobacter* (0.13 a 1.08%,

P=0.0104), *Luteimonas* (0.03 a 0.06%, P=0.0326), *Stenotrophomonas* (0.04 a 0.13%, P=0.0266), *Sphaerochaeta* (0.03 a 0.11%, P=0.007) y *Anaeroplasma* (0.02 a 0.08%, P=0.0073).

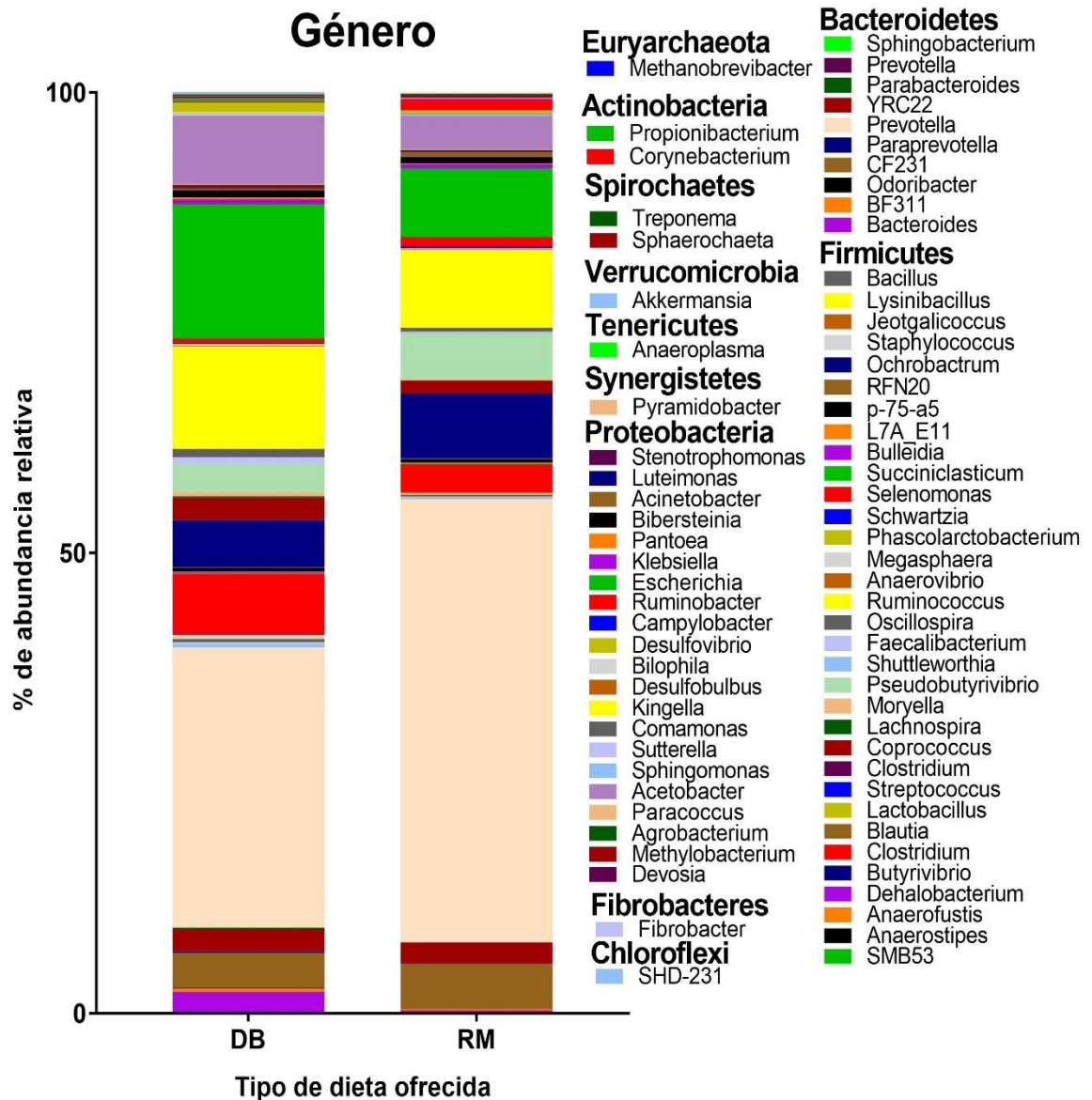


Figura 11. Microbiota presente a nivel Género en bovinos alimentados con la dieta base (DB) y rastrojo de maíz (RM) administrada durante 45 días

Cuadro 7. Abundancia relativa de los géneros bacterianos encontrados en el rumen con una dieta base (ensilados de maíz y heno de avena) y bajo una dieta de rastrojo de maíz administrada durante 45 días.

Género	Tipo de Dieta ofrecida		EEM
	Dieta base	Rastrojo de Maíz	
<i>Methanobrevibacter</i>	0.1092	0.1167	0.024
<b><i>Corynebacterium</i></b>	<b>0.0018<sup>b</sup></b>	<b>0.0791<sup>a</sup></b>	<b>0.027</b>
<b><i>Propionibacterium</i></b>	<b>0.0602<sup>a</sup></b>	<b>0.0032<sup>b</sup></b>	<b>0.023</b>
<b><i>Bacteroides</i></b>	<b>2.1809<sup>a</sup></b>	<b>0.1320<sup>b</sup></b>	<b>0.922</b>
BF311	0.3355	0.1249	0.085
<b><i>Odoribacter</i></b>	<b>0.0711<sup>a</sup></b>	<b>0.0030<sup>b</sup></b>	<b>0.036</b>
CF231	3.8241	4.9560	0.992
<b><i>Paraprevotella</i></b>	<b>0.1214<sup>a</sup></b>	<b>0.0034<sup>b</sup></b>	<b>0.047</b>
<i>Prevotella (Paraprevotellaceae)</i>	0.0576	0.0936	0.034
YRC22	2.3550	2.1800	0.490
<i>Parabacteroides</i>	0.2044	0.0077	0.101
<b><i>Prevotella (Prevotellaceae)</i></b>	<b>30.3967<sup>b</sup></b>	<b>48.1518<sup>a</sup></b>	<b>3.734</b>
<i>Sphingobacterium</i>	0.0138	0.0130	0.004
<b>SHD-231</b>	<b>0.3889<sup>a</sup></b>	<b>0.1701<sup>b</sup></b>	<b>0.072</b>
<b><i>Fibrobacter</i></b>	<b>0.1990<sup>a</sup></b>	<b>0.0847<sup>b</sup></b>	<b>0.035</b>
<i>Bacillus</i>	0.3554	0.2241	0.083
<b><i>Lysinibacillus</i></b>	<b>0.0442<sup>b</sup></b>	<b>0.0973<sup>a</sup></b>	<b>0.015</b>
<b><i>Jeotgalicoccus</i></b>	<b>0.0017<sup>b</sup></b>	<b>0.0579<sup>a</sup></b>	<b>0.023</b>
<i>Staphylococcus</i>	0.3027	0.0074	0.208
<i>Lactobacillus</i>	0.0846	0.0241	0.027
<i>Streptococcus</i>	0.0794	0.0318	0.018
<b><i>Clostridium (Clostridiaceae)</i></b>	<b>6.5282<sup>a</sup></b>	<b>3.0673<sup>b</sup></b>	<b>0.860</b>
SMB53	0.0568	0.1103	0.029
<b><i>Dehalobacterium</i></b>	<b>0.1193<sup>a</sup></b>	<b>0.0300<sup>b</sup></b>	<b>0.023</b>
<i>Anaerofustis</i>	0.0711	0.0348	0.015
<i>Anaerostipes</i>	0.4159	0.3959	0.072
<i>Blautia</i>	0.0814	0.0638	0.039
<i>Butyrivibrio</i>	5.1149	7.0045	1.144
<b><i>Clostridium (Lachnospiraceae)</i></b>	<b>0.0180<sup>b</sup></b>	<b>0.0960<sup>a</sup></b>	<b>0.019</b>
<b><i>Coprococcus</i></b>	<b>2.4225<sup>a</sup></b>	<b>1.3601<sup>b</sup></b>	<b>0.328</b>
<b><i>Lachnospira</i></b>	<b>0.1362<sup>a</sup></b>	<b>0.0056<sup>b</sup></b>	<b>0.056</b>

Género	Tipo de Dieta ofrecida		EEM
	Dieta base	Rastrojo de Maíz	
<i>Moryella</i>	0.4611	0.2210	0.072
<b><i>Pseudobutyrvibrio</i></b>	<b>3.0956<sup>b</sup></b>	<b>4.9270<sup>a</sup></b>	<b>0.481</b>
<i>Shuttleworthia</i>	0.0529	0.1006	0.022
<i>Faecalibacterium</i>	0.6406	0.0406	0.280
<i>Oscillospira</i>	0.8969	0.4454	0.265
<i>Ruminococcus</i>	11.1169	8.4666	1.810
<i>Anaerovibrio</i>	0.0803	0.0721	0.011
<i>Megasphaera</i>	0.0716	0.0755	0.019
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.1582	0.0067	0.078
<i>Schwartzia</i>	0.1237	0.1828	0.026
<b><i>Selenomonas</i></b>	<b>0.4609<sup>b</sup></b>	<b>1.0492<sup>a</sup></b>	<b>0.166</b>
<i>Succiniclasticum</i>	14.5701	7.4669	3.791
<i>Bulleidia</i>	0.5184	0.4682	0.096
<b>L7A_E11</b>	<b>0.2149<sup>a</sup></b>	<b>0.0764<sup>b</sup></b>	<b>0.036</b>
<i>p-75-a5</i>	0.7680	0.6597	0.109
<b>RFN20</b>	<b>0.1720<sup>b</sup></b>	<b>0.5596<sup>a</sup></b>	<b>0.111</b>
<b><i>Ochrobactrum</i></b>	<b>0.0691<sup>a</sup></b>	<b>0.0276<sup>b</sup></b>	<b>0.013</b>
<i>Devosia</i>	0.0292	0.0556	0.012
<i>Methylobacterium</i>	0.2599	0.0493	0.112
<i>Agrobacterium</i>	0.0486	0.0526	0.016
<i>Paracoccus</i>	0.0830	0.0869	0.019
<i>Acetobacter</i>	7.4246	3.6684	1.837
<b><i>Sphingomonas</i></b>	<b>0.0433<sup>b</sup></b>	<b>0.1719<sup>a</sup></b>	<b>0.033</b>
<i>Sutterella</i>	0.2007	0.0144	0.081
<i>Comamonas</i>	0.0410	0.0251	0.019
<i>Kingella</i>	0.0371	0.0027	0.018
<b><i>Desulfobulbus</i></b>	<b>0.0603<sup>a</sup></b>	<b>0.0209<sup>b</sup></b>	<b>0.009</b>
<b><i>Bilophila</i></b>	<b>0.0388<sup>a</sup></b>	<b>0.0120<sup>b</sup></b>	<b>0.007</b>
<b><i>Desulfovibrio</i></b>	<b>1.0149<sup>a</sup></b>	<b>0.3436<sup>b</sup></b>	<b>0.130</b>
<i>Campylobacter</i>	0.0312	0.0248	0.010
<b><i>Ruminobacter</i></b>	<b>0.1276<sup>b</sup></b>	<b>1.0777<sup>a</sup></b>	<b>0.257</b>
<b><i>Escherichia</i></b>	<b>0.2228<sup>a</sup></b>	<b>0.0114<sup>b</sup></b>	<b>0.112</b>
<i>Klebsiella</i>	0.0744	0.1111	0.021
<i>Pantoea</i>	0.0525	0.1044	0.024
<i>Bibersteinia</i>	0.1284	0.0023	0.053
<i>Acinetobacter</i>	0.1256	0.0606	0.026
<b><i>Luteimonas</i></b>	<b>0.0272<sup>b</sup></b>	<b>0.0609<sup>a</sup></b>	<b>0.010</b>

Género	Tipo de Dieta ofrecida		EEM
	Dieta base	Rastrojo de Maíz	
<b><i>Stenotrophomonas</i></b>	<b>0.0413<sup>b</sup></b>	<b>0.1346<sup>a</sup></b>	<b>0.025</b>
<b><i>Sphaerochaeta</i></b>	<b>0.0300<sup>b</sup></b>	<b>0.1073<sup>a</sup></b>	<b>0.016</b>
<i>Treponema</i>	0.0416	0.0552	0.012
<i>Pyramidobacter</i>	0.0403	0.0722	0.018
<b><i>Anaeroplasma</i></b>	<b>0.0205<sup>b</sup></b>	<b>0.0796<sup>a</sup></b>	<b>0.012</b>
<i>Akkermansia</i>	0.1322	0.0192	0.046

<sup>ab</sup> Literales diferentes, significan diferencia P < 0.05  
EEM = Error estándar de la media

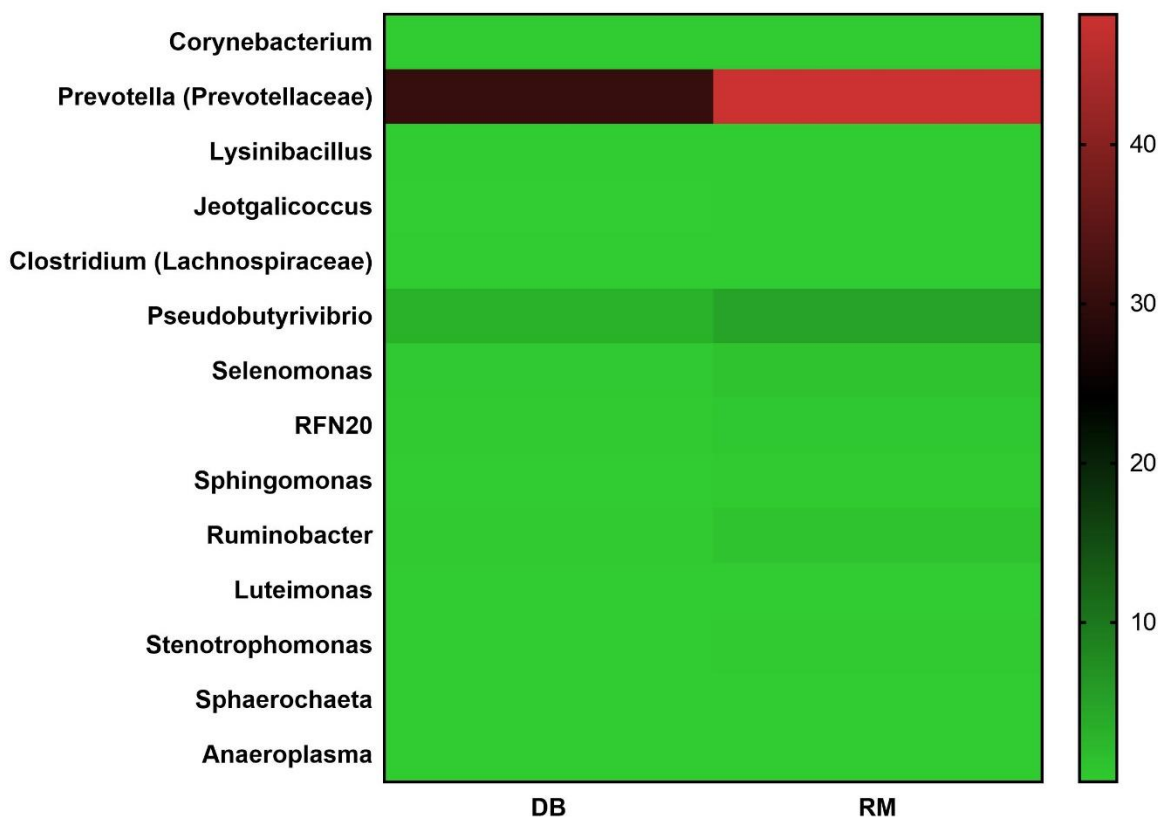


Figura 12. Abundancia de los géneros que presentaron aumento después de cambiar la alimentación de una dieta base (DB) a la del rastrojo de maíz (RM)

A nivel de especie (Cuadro 8) se observó un aumento en las especies: *Prevotella ruminicola* (6.13 a 20.91%,  $P = 0.0072$ ), *Streptococcus luteciae* (0.05 a 0.78%,  $P = 0.0033$ ), *Clostridium aminophilum* (0.45 a 3.17%,  $P = 0.0061$ ), *Selenomonas ruminantium* (5.24 a 21.84%,  $P = 0.0163$ ) y *Pantoea agglomerans* (0.75 a 3.91%,  $P = 0.0039$ ) y una disminución en los microorganismos *Propionibacterium acnes* (0.74 a 0.12%,  $P = 0.0161$ ) y *Bacteroides ovatus* (0.99 a 0.15%,  $P = 0.0104$ ) cuando se ofreció RM, como se puede observar en las Figuras 13 y 14.

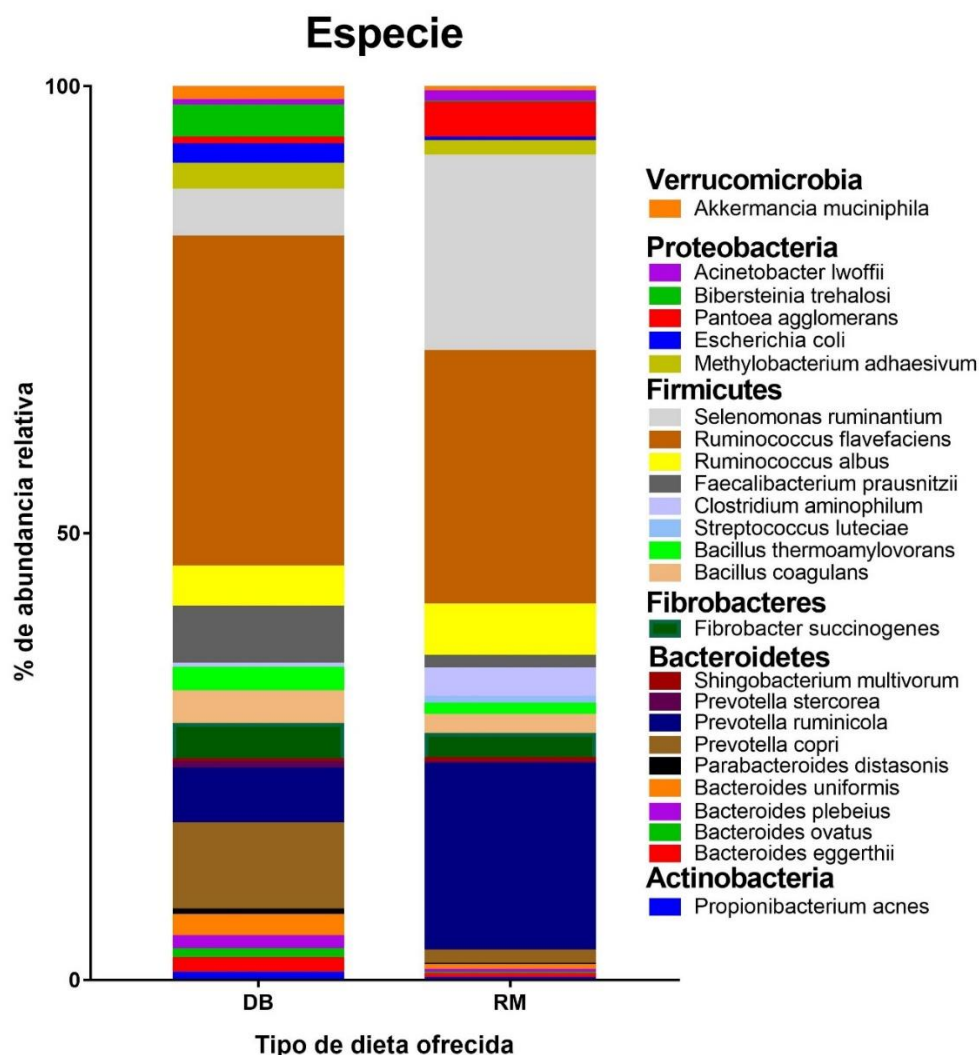


Figura 13. Microbiota presente a nivel especie en bovinos alimentados con la dieta base (DB) y rastrojo de maíz (RM) durante 45 días

Cuadro 8. Abundancia relativa de las especies microbianas encontrados en el rumen con una dieta base (ensilados de maíz y heno de avena) y bajo una dieta de rastrojo de maíz administrada durante 45 días

Especie	Tipo de dieta ofrecida		EEM
	Dieta Base	Rastrojo de Maíz	
<b><i>Propionibacterium acnes</i></b>	<b>0.7414<sup>a</sup></b>	<b>0.1226<sup>b</sup></b>	<b>0.2163</b>
<i>Bacteroides eggerthii</i>	1.6365	0.4520	0.5702
<b><i>Bacteroides ovatus</i></b>	<b>0.9994<sup>a</sup></b>	<b>0.1518<sup>b</sup></b>	<b>0.2896</b>
<i>Bacteroides plebeius</i>	1.4333	0.3490	0.5145
<i>Bacteroides uniformis</i>	2.3793	0.5072	0.7835
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.6021	0.1546	0.2432
<i>Prevotella copri</i>	9.6796	1.4862	3.6042
<b><i>Prevotella ruminicola</i></b>	<b>6.1287<sup>b</sup></b>	<b>20.9071<sup>a</sup></b>	<b>3.1063</b>
<i>Prevotella stercorea</i>	0.6945	0.1120	0.2309
<i>Shingobacterium multivorum</i>	0.3049	0.5002	0.1406
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	3.9748	2.7167	0.6108
<i>Bacillus coagulans</i>	3.6455	2.1191	1.3775
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	2.5942	1.2399	0.8148
<b><i>Streptococcus luteciae</i></b>	<b>0.0498<sup>b</sup></b>	<b>0.7847<sup>a</sup></b>	<b>0.1733</b>
<b><i>Clostridium aminophilum</i></b>	<b>0.4558<sup>b</sup></b>	<b>3.1736<sup>a</sup></b>	<b>0.5823</b>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	6.3678	1.3884	2.2124
<i>Ruminococcus albus</i>	4.4792	5.7333	1.6759
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	36.9190	28.3925	7.6403
<b><i>Selenomonas ruminantium</i></b>	<b>5.2445<sup>b</sup></b>	<b>21.8391<sup>a</sup></b>	<b>3.2938</b>
<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	2.8965	1.6622	1.1397
<i>Escherichia coli</i>	2.1693	0.3716	0.8159
<b><i>Pantoea agglomerans</i></b>	<b>0.7472<sup>b</sup></b>	<b>3.9158<sup>a</sup></b>	<b>0.8766</b>
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	3.5806	0.0769	1.3281
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0.6366	1.1621	0.3180
<i>Akkermancia muciniphila</i>	1.6396	0.6812	0.3844

<sup>ab</sup> Literales diferentes, significan diferencia P < 0.05  
EEM = Error estándar de la media



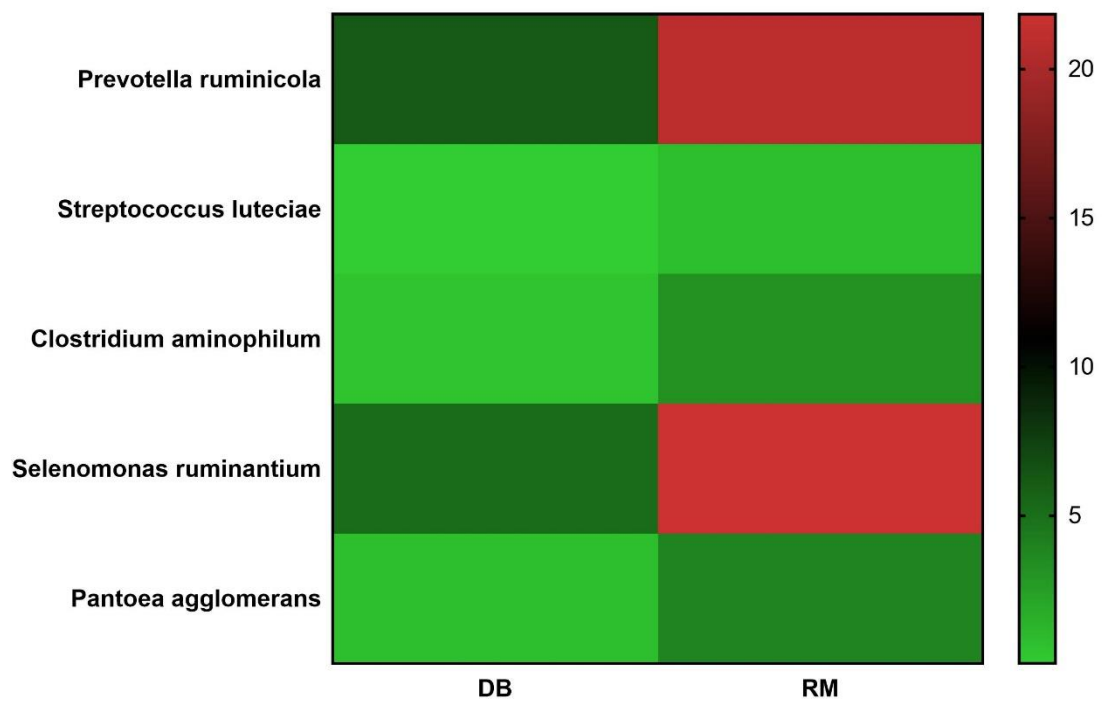


Figura 14. Abundancia de las especies que presentaron aumento después de cambiar la alimentación de una dieta base (DB) a la del rastrojo de maíz (RM)

## Discusión

El objetivo de esta investigación fue la construcción de una biblioteca genómica a partir de líquido ruminal de bovinos alimentados con un forraje lignificado y el tamizaje de ésta en medios selectivos para la identificación de genes que participen en la degradación y/o modificación del complejo lignocelulósico, así como la caracterización de los microorganismos que se ven favorecidos bajo estas condiciones ruminales.

La obtención del material genético por medio de los kits comerciales Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit (Mobio, EUA) y QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen, EUA) permitió la extracción de 39.06 µg de ADN con un peso promedio entre 48 y 38 kb y una calidad buena tendiendo a aceptable para la construcción de la biblioteca. Las adecuaciones hechas en el protocolo del primer kit mencionado, así como su tecnología para minimizar el corte en el material genético permitió la obtención de fragmentos de un buen peso molecular y con una calidad en promedio buena (Relación 260/280: 1.86). El segundo kit, permitió la extracción de una mayor cantidad de ADN con un menor número de muestras y con una calidad similar a la obtenida con el Ultra Clean (Relación 260/280: 1.9). Si bien ambos protocolos ocupan a la lisis celular como fundamento para la obtención de material genético y su posterior purificación con un sistema de columnas, puede que la composición de cada reactivo, así como el tiempo denotado en el procedimiento influya en el rendimiento cuantitativo del ADN. Diversos investigadores han reportado como el uso de diferentes métodos de extracción impactan en la calidad, rendimiento y en las comunidades microbianas que pudieran verse favorecidas según el método empleado (Vaydya, *et al*, 2018; Fliegerova, *et al*, 2014 & Villegas, *et al*, 2013). Partiendo de este punto, sería correcto suponer que el uso de diferentes técnicas podría impactar positivamente en la diversidad de las clonas obtenidas.

Los procesos de purificación, precipitación y concentración de ADN utilizados en la elaboración de la biblioteca afectaban considerablemente el rendimiento del material genético utilizado como materia prima, por lo que se decidió omitir el

proceso de selección de fragmentos en geles de agarosa de bajo punto de fusión para evitar la merma del ADN. Esto sólo fue posible tomando en cuenta la calidad del material genético, la cual fue examinada en el paso previo a la construcción de la biblioteca, así como el caso de éxito reportado en la construcción de las genotecas aun omitiendo los procesos de selección a partir de muestras árticas (Ferres, *et al*, 2015).

El material y metodología empleada permitió la obtención de una genoteca de 8016 clonas con fragmentos genómicos de 30 a 40 Kbs, constituyendo 0.28 Gbs de metagenoma bacteriano ruminal. Para llegar a este número de clonas fue necesario utilizar 5 reacciones de ligación. El bajo rendimiento obtenido por reacción puede atribuirse a errores en la cuantificación debido a la interferencia de dinucleótidos al momento de reparar los extremos del inserto para la ligación al vector.

Los medios empleados, salvo MSM-KI, fueron altamente sensibles en la identificación de la actividad enzimática, particularmente la ejercida sobre la celulosa por lo que no fue posible la selección de alguna de las clonas para la identificación de los genes. Si bien el uso del medio LB adicionado con Carboximetilcelulosa al 0.1 % y la tinción posterior al crecimiento con Rojo Congo, es la prueba principal para identificar actividad celulolítica (Chand, *et al*, 2008; Guzmán, *et al*, 2015 & Viteri, *et al*, 2016), puede que en un medio caracterizado por tener acción sobre los carbohidratos estructurales de la fibra como es el rumen no sea suficiente. Evaluar la actividad enzimática a través de un medio que utilice a la carboximetilcelulosa como única fuente de carbono podría ser una prueba más específica para identificar una actividad fuerte en la degradación de la celulosa. Sin embargo, en esta evaluación sería necesario considerar el nivel óptimo de CMC, así como del agar presente en el medio, ya que ambas cualidades han sido denotadas como factores capaces de alterar el ensayo cualitativo (Hankin, *et al*, 1977).

La metodología empleada tampoco permitió el aislamiento de una clona con actividad referente a la lignina a pesar de que el medio propuesto para su

identificación ha ofrecido buenos resultados en la identificación de oxidoreductasas a partir de muestras edafológicas en numerosos acercamientos (Sasikumar, *et al*, 2014). La solución podría estar en aumentar el número de clonas probadas tomando en cuenta el bajo nivel de actividad enzimático sobre la lignina reportado en el rumen. Un ejemplo de esto es el caso de éxito reportado por Ufarté y colaboradores (2018) al encontrar tres clonas con crecimiento positivo sobre lignina como única fuente de carbono a partir de una biblioteca de 19968 clonas, actividad que fue posible por el tipo de tecnología empleado.

Uno de los propósitos de esta investigación fue evaluar qué microorganismos se ven favorecidos por un cambio de dieta alta en materiales fibrosos, como el rastrojo de maíz, y si la presencia de ellos podía aumentar la probabilidad de encontrar genes relacionados a la degradación y/o modificación de la lignina para lo cual se utilizó la secuenciación del ARNr 16S, herramienta taxonómica comúnmente usada para el estudio del ecosistema ruminal bajo diferentes dietas o estados productivos (Tong, *et al*, 2018) ya que permite la identificación de los microorganismos presentes en pequeñas proporciones así como de los microorganismos no cultivables resultando más eficientes que las técnicas convencionales microbiológicas en relación a tiempo y precio (Rodicio, *et al*, 2004). El análisis consta de tres etapas posteriores a la extracción del ADN: la amplificación de los genes a partir de la muestra, la determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón y el análisis de la secuencia (Rodicio, *et al*, 2004).

A nivel Filo, *Bacteroides* y *Firmicutes* fueron predominantes tanto en la dieta base como en la dieta con rastrojo de maíz. Los fillos *Lentisphaerae* y *Spirochaetes* presentaron aumentos significativos cuando los animales eran alimentados con RM. Si bien, bacterias pertenecientes al filo *Spirochaetes* no presentan un perfil celulolítico, sí poseen enzimas para degradar el resto del complejo celulolítico como son pectinasas y xilanasas (Paster, *et al*, 1993). En cuanto a los microorganismos del filo *Lentisphaerae*, se ha reportado una disminución de ellos cuando la dieta es alta en carbohidratos altamente fermentables en rumiantes (Mao, *et al*, 2013) así como en humanos (Wong, *et al*, 2017).

Los resultados indican aumentos significativos ( $P < 0.05$ ) en los géneros *Prevotella*, *Lysinibacillus*, *Clostridium* (*Lachnospiraceae*), *Pseudobutyrvibrio*, *Selenomonas*, *RFN20*, *Ruminobacter*, *Sphingomonas*, *Luteimonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphaerochaeta* y *Anaeroplasma* cuando se ofreció RM. Para los géneros *Prevotella*, *Pseudobutyrvibrio* y *Selenomonas* diversos estudios han encontrado en ellos actividades principalmente hemicelulolíticas (Grilli, *et al*, 2016). En el caso de los géneros *Clostridium*, *RFN20*, *Ruminobacter*, *Sphingomonas* y *Sphaerochaeta* se ha reportado el aumento de sus poblaciones en estudios previos con niveles moderados de fibra (Li, *et al*, 2017; Klevenhusen, *et al*, 2017 y Petri, *et al*, 2017).

A nivel de especie, se detectó un aumento en los microorganismos: *P. ruminicola*, *S. ruminantium*, *C. aminophilum*, *S. luteiciae* y *P. agglomerans*. Los microorganismos antes mencionados, si bien no poseen una batería de enzimas altamente eficientes para degradar la fibra, diversos estudios han reportado su papel dentro de los microorganismos cooperadores para degradar el complejo lignocelulósico ya sea por el aprovechamiento de productos secundarios o la generación de metabolitos y entornos favorables para los microorganismos principales (Kabel, *et al*, 2011; Sawanon, *et al*, 2011 y Nyonyo, *et al*, 2014)

*P. ruminicola*, como bacteria estrictamente anaerobia, juega un papel fundamental en la degradación de los polisacáridos de la pared celular, del almidón, proteínas y péptidos en el rumen, además de que es de las especies predominantes dentro del ecosistema ruminal (Avguštin, *et al*, 1992). Las bacterias del género *Prevotella* no desempeñan un rol importante en la degradación de la celulosa. Sin embargo, debido a la presencia de xilanasas se le ha asociado una actividad simbiótica con bacterias fibrolíticas. La presencia de estas enzimas es variable dependiendo de la cepa (Parmar, *et al*, 2014) además de que en alguna se ha observado la presencia de estererasas, enzimas necesarias para escindir el enlace éster que une a los compuestos fenólicos asociados con la lignina (Kabel, *et al*, 2011).

*S. ruminantium*, presenta características similares a *P. Ruminicola*, ya que, aunque no es una bacteria celulolítica ha establecido una relación simbiótica con los microorganismos fibrolíticos: *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* (Sawanon, *et al*, 2011 y Scheifinger, *et al*, 1973).

En el caso de *C. aminophilum* es una bacteria estrictamente anaerobia caracterizada por usar aminoácidos y péptidos como fuente de carbono. Sin embargo, Nathani y colaboradores (2015) encontraron que el género *Clostridium* está relacionado con la degradación de polisacáridos estructurales debido a la presencia de módulos de unión a carbohidratos, así como glucosiltransferasas, considerando al género como un potencial degradador de fibra.

Con respecto a *P. agglomerans* se ha logrado caracterizar su actividad sobre numerosos carbohidratos sugiriendo una actividad positiva a hemicelulasas, así como a tanasas, celulasas y polifenol-oxidasas indicando una acción sobre la lignina y derivados (Acioly, *et al*, 2017). Su presencia en el rumen no se ha caracterizado del todo. Sin embargo, se ha aislado con éxito en el tracto gastrointestinal (Nelson, *et al*, 1998).

Por otra parte *R. flavefacies* presentó una disminución cuantitativa bajo la dieta alta en fibra, contrario a lo reportado en la literatura (Sigh, *et al*, 2014). *R. flavefacies* es considerada una bacteria fibrolítica por excelencia (Akin, *et al*, 1988), esta disminución podría atribuirse al mismo comportamiento de la bacteria, que, aunque posee al celulosoma y por ende su capacidad celulolítica es mayor (Artzi, *et al*, 2017), su capacidad de adhesión a las paredes celulares vegetales es lenta, disminuyendo sus probabilidades de supervivencia dentro del ambiente ruminal (Akin, *et al*, 1988).

## Conclusiones

La metodología empleada para la construcción de la biblioteca genómica no permitió la identificación de una clona con capacidad de degradar o modificar el complejo lignocelulósico. El aumento del número total de clonas en la biblioteca y el tamizaje de este en medios estandarizados podría permitir la identificación y posterior caracterización de clonas con la actividad buscada.

La dieta basada en rastrojo de maíz mostró cambios en las proporciones de 2 filos, 30 géneros y 7 especies. A nivel de especie, los microorganismos que presentaron un aumento significativo con esta dieta fueron: *P. ruminicola*, *S. ruminantium*, *C. aminophilum*, *S. luteciae* y *P. agglomerans*. Los microorganismos con proporción aumentada participan de una forma cooperadora a la descomposición del complejo lignocelulósico y estudios previos reportan el hallazgo de genes involucrados con la modificación de la fibra tanto en *P. ruminicola* como en *S. ruminantium*

## **Perspectivas**

Para la obtención de clonas con actividad celulolítica es necesario trabajar en la estandarización de medios selectivos altamente específicos. En el rumen, abundan bacterias celulolíticas por lo que los genes aislados en las clonas deben probarse de un modo más estricto para determinar cuál de ellos tiene una participación más eficiente sobre la celulosa.

Con relación a la actividad ligninolítica es recomendable ampliar el tamaño de la biblioteca para encontrar clonas positivas al crecimiento en lignina como única fuente de carbono, así como trabajar en métodos más eficientes que permitan probar la totalidad de las clonas en los medios de cultivo.

Una vez logrando el aislamiento de al menos una clona positiva gracias a los medios selectivos, será necesario el aislamiento del gen dentro del vector de clonación en la clona, así como su posterior clonación y caracterización de la actividad enzimática presente en el gen.



## Anexos

Anexo 1: Protocolo de extracción. Ultra Clean Microbial DNA Insolation Kit (Mobio, EUA)

1. En un tubo de 2 ml rotulado con el nombre de la muestra y fecha, se añadieron 1.8 ml del pellet resuspendido. La muestra fue centrifugada a 10000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
2. Después de decantar el sobrenadante se realizó una segunda centrifugación a las mismas condiciones y el sobrenadante fue extraído utilizando una pipeta para eliminar por completo el sobrenadante.
3. El pellet fue resuspendido en 300  $\mu$ l de MicroBead Solution y homogeneizado gentilmente (suaves movimientos en la pared del tubo de 2 ml). El resuspendido fue trasladado a un tubo de 2 ml limpio.
4. Se añadieron 50  $\mu$ l de la solución MD1 y la muestra se calentó en un Thermomixer Comfort (Eppendorf) a 65°C durante 10 minutos, esto con la finalidad de minimizar los cortes en el material genético
5. La muestra se pasó a un MicroBead Tube y se centrifugó a 10000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Terminada la centrifugación, el sobrenadante se colocó en un tubo de 2ml limpio.
6. Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución MD2 al sobrenadante y se homogeneizo suavemente durante 5 segundos. Después, la muestra fue incubada a 4°C durante 5 minutos.
7. Terminada la incubación, la muestra se centrifugó a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
8. Con una pipeta se extrajo el sobrenadante cuidando de no tomar parte del sedimento generado por la centrifugación. El sobrenadante se colocó en un tubo limpio de 2 ml.  $\mu$ l
9. Se añadieron 900  $\mu$ l de la solución MD3 cuidando de agitar fuertemente esta última antes de añadirla. La muestra se homogeneizó por pipeteo durante 5 segundos.

10. Se colocaron 700  $\mu$ l de la solución generada en el paso anterior en un Spin Filter colocado en un tubo de 2 ml limpio. La muestra se centrifugó a 10000 x g durante 30 segundos.
11. El filtrado fue descartado y se añadió el resto de la solución repitiendo la centrifugación a 10000 x g durante 30 segundos.
12. El Spin Filter se colocó en un tubo limpio de 2 ml y se añadieron 300  $\mu$ l de la solución MD4. Después de esto se llevó a cabo una centrifugación a 10000 x g durante 30 segundos
13. El Spin Filter se colocó en un tubo limpio de 2 ml descartando el filtrado y se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto.
14. Terminada la centrifugación se repitió el paso anterior para corroborar que no permanecieran restos de la solución MD4 en la muestra.
15. Se colocó el Spin Filter en un tubo de 2 ml limpio y debidamente rotulado con la identificación de la muestra y fecha de extracción.
16. Se añadieron 50  $\mu$ l de la solución MD5 previamente calentada (55°C) en el centro del filtro de la columna (Spin Filter), se dejó incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se realizó una centrifugación a 10000 x g durante 1 minuto.
17. El material genético colectado se almacenó a -80°C

#### Anexo 2: Protocolo de extracción QIAamp DNA Stool Mini:

1. En un tubo de 2 ml debidamente rotulado se colocaron 300  $\mu$ l de la muestra.
2. Se añadieron 1.4 ml del buffer ASL a la muestra y se homogeneizo suavemente.
3. El tubo de 2 ml se calentó en un a 90°C durante 5 minutos.
4. Terminando este periodo, la muestra se homogeneizo mediante suaves golpes al tubo de 2 ml.
5. Se realizó una centrifugación en una Centrifugue 5415R a 10000 x g durante 2 minutos.

6. Del sobrenadante del paso anterior se pipetearon 1.2 ml y se añadió una tableta InhibitEX. Para permitir la disolución de la tableta, la muestra se dejó en el vortex durante 1 minuto y se dejó reposar durante otro minuto a temperatura ambiente.
7. La suspensión fue centrifugada a 10000 x g durante 6 minutos. El sobrenadante resultante, se colectó en su totalidad en un nuevo tubo de 1.5 ml.
8. Mientras se llevaba a cabo la centrifugación, se tomaron 15 µl de proteinasa K en un tubo de 1.5 ml. A este tubo se le añadieron 200 µl del sobrenadante del paso anterior y 200 µl del buffer AL, cuidando de mantener este orden.
9. La muestra fue homogeneizada por golpecitos suaves para permitir la integración de los componentes.
10. Para inhibir la actividad enzimática, la muestra fue calentada en el Thermomixer Comfort (Eppendorf) a 70°C durante 10 minutos.
11. Se añadieron 200 µl de etanol al preparado y se permitió la integración de los componentes mediante un homogeneizado suave.
12. La suspensión obtenida se colocó en una columna (QIAamp Mini Spin Column) y se centrifugó a 10000 x g (máxima velocidad) durante 2 minutos.
13. Terminada la centrifugación, la columna se colocó en un tubo colector limpio descartando el sobrenadante.
14. Se añadieron 500 µl del buffer AW1 y se centrifugo a velocidad máxima durante 2 minutos. Nuevamente se descartó el filtrado y la columna se colocó en un tubo colector limpio
15. Se añadieron 500 µl del buffer AW2 y se centrifugo a velocidad máxima durante 2 minutos. Una vez más el filtrado fue descartado y la columna se colocó en un tubo colector limpio. Esta centrifugación se llevó a cabo hasta 3 veces para asegurar que no quedaran restos de los buffers en el material genético.
16. Terminadas las centrifugaciones, la columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml

17. Para permitir una mayor concentración del ADN, el buffer AE (elución) se calentó en el Thermomixer Comfort (Eppendorf) hasta alcanzar una temperatura de 55°C.
18. Se añadieron 100 µl del buffer de elución a la columna, se tapó el tubo y se dejó incubar por un minuto.
19. Finalmente, la columna se centrifugo a velocidad máxima por 2 minutos para obtener el material genético.

Anexo 3: Protocolo para la construcción de la biblioteca: EpiFOS Fosmid Library Production Kit (epicentre, USA).

1. Reparación de los extremos. Todos los reactivos añadidos y trabajados en este punto se trabajaron sobre una plancha con hielo.

Se fueron añadiendo uno a uno los siguientes reactivos, homogeneizando por pipeteo y siguiendo el siguiente orden.

- a. X µl de agua estéril.
- b. 8 µl End-Repair 10X Buffer.
- c. 8 µl 2.5 mM dNTP Mix
- d. 8 µl 10 mM ATP
- e. X µl de ADN de aproximadamente 40 kB a una concentración de 0.5 µg/µl
- f. 4 µl End-Repair Enzyme Mix

80 µl totales de reacción

La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos

2. Precipitación

1. Terminado el tiempo de incubación se agregó 10% v/v de Acetato de Sodio 3 M y se mezcló suavemente.
2. Se añadieron 2.5 volúmenes de etanol y se mezcló por inversión.
3. La reacción se incubó a -70°C durante al menos 12 horas

4. El ADN precipitado se centrifugó a 12000 x g. El sobrenadante resultante se removió cuidadosamente evitando tocar el pellet formado.
5. Para lavar el pellet de ADN, se añadió etanol al 70% frío y se realizó una centrifugación a 12000 x g durante 5 minutos. El lavado se realizó 2 veces.
6. Para permitir la remoción del etanol presente, se realizó una incubación a 25°C durante 5 minutos.
7. Tomando en cuenta la cantidad de ADN presente al momento de reparar los extremos de los fragmentos, se añadió agua estéril en la cantidad necesaria para lograr una concentración de 0.25 µg/µl

### 3. Ligación.

Todos los reactivos añadidos y trabajados en este punto se trabajaron sobre una plancha con hielo.

1. Los reactivos trabajados fueron añadidos uno a uno, siguiendo el siguiente orden y pipeteando cuidadosamente después de la adición de cada uno de ellos.

X µl de agua estéril

1 µl 10X Fast\_Link Ligation Buffer

1 µl 10 mM ATP

1 µl pEpiFOS-5 Vector (0.5 µg/µl)

X µl del inserto de ADN concentrado en la cantidad necesaria para tener 0.25µg

1 µl Fast-Link DNA Ligase

10 µl de reacción.

### 4. Empaquetamiento

1. Dos días previos a la reacción de empaquetamiento se sembró por estría cruzada la cepa EPI100-T1<sup>R</sup> en una caja Petri con medio LB sin antibiótico. Las bacterias se dejaron a 37°C durante 24 horas.
2. Un día previo a la reacción de empaquetamiento, se tomó una colonia de la cepa EPI100-T1<sup>R</sup> y se inoculó en 50 ml de un caldo LB adicionado con 500

μl de una solución de MgSO<sub>4</sub> 1 M. El cultivo se dejó en rotación constante durante al menos 12 horas.

3. El día del empaquetamiento, se tomaron 5 ml del cultivo obtenido del paso anterior y se agregaron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo LB adicionado con 500 μl de una solución 1 M de MgSO<sub>4</sub>. El cultivo permaneció en rotación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.8 a 1.0. Una vez alcanzada la densidad óptica las células permanecieron a 4°C.
  4. Por cada reacción de ligación, se descongeló 1 tubo de MaxPlax Lambda Packaging Extracts. La descongelación se llevó a cabo en hielo. Una vez descongelado, se tomaron 25 μl de este reactivo y se colocaron en un tubo de 2 ml junto con los 10 μl de la reacción de ligación.
  5. La reacción se mezcló repetidamente por pipeteo evitando la introducción de burbujas y se dejó incubando a 30°C por 90 minutos.
  6. Después del primer tiempo de incubación, se añadieron los 25 μl restantes del MaxPlax Lambda Packaging Extracts pipeteando repetidas veces y se realizó una segunda incubación a 30°C durante 90 minutos.
  7. Terminando la segunda incubación se añadieron 940 μl de Phage Dilution Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>) después de mezclar la solución por pipeteo se añadieron 25 μl de Cloroformo. La reacción se preservó a 4°C
5. Título de las clonas empaquetadas
1. Se realizaron diluciones seriales con la reacción resultante del paso anterior en un volumen final de 1 mL. Las diluciones fueron: 1:10<sup>0</sup>, 1:10<sup>1</sup>, 1:10<sup>2</sup> y 1:10<sup>3</sup>.
  2. De las bacterias almacenadas a 4°C (DO<sub>600</sub>: 0.8 – 1.0) se tomaron 100 μl y se colocaron en tubos de 1.5 ml, cada uno rotulado con la dilución correspondiente.
  3. A estos tubos se les añadieron 10 μl de las reacciones anteriores y fueron incubadas a 37°C durante 60 minutos.

4. Terminado el tiempo de incubación, las soluciones con las bacterias infectadas fueron espatuladas en cajas Petri con medio LB adicionado con cloranfenicol a una concentración de 12.5 µl/ µl (LB-Cm).
5. Las cajas permanecieron en incubación hasta por 48 horas para lograr un crecimiento importante de las clonas obtenidas.
6. El título de la reacción se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{(\# \text{ de colonias}) (\text{factor de dilución})(1000 \mu\text{l/ml})}{(\text{volumen del fago plaqueado})}$$

6. Amplificación de la biblioteca.
  1. Tomando en cuenta el título obtenido en el paso anterior, las partículas de fago generadas del empaquetamiento se diluyeron con un cultivo de EPI100-T1<sup>R</sup> en una proporción 10:100 y se dividió el volumen de la reacción en tubos de 1.5 ml.
  2. La reacción se dejó incubar a 37°C durante 60 minutos.
  3. Terminado el tiempo de incubación, la reacción se espatuló en cajas con medio LB-Cm y fueron incubadas a 37°C durante 48 horas
  4. Después del crecimiento de las clonas, cada una se picó y fue colocada en cajas de LB-Cm. 100 clonas fueron colocadas por caja de medio.

#### Anexo 4. Extracción de plásmidos: QIAprep Spin Miniprep Kit

1. Se tomó una colonia y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 40 mL de medio LB. El cultivo se incubó a 72°C durante 16 horas
2. Terminado el tiempo de incubación, el medio LB fue trasladado a tubos Falcon de 50 ml
3. Se realizó una centrifugación a 10000 x g durante 15 minutos para formar un pellet bacteriano.
4. Se resuspendió el pellet bacteriano con 500 µl de Buffer P1. Terminado este proceso se colocaron los 500 µl en un tubo de centrifuga de 2 ml.

5. Se añadieron 500 µl de Buffer P2. La mezcla se homogeneizó suavemente invirtiendo los tubos de 4 a 6 veces.
6. Se añadieron 700 µl de Buffer N3 y se homogeneizo por inversión de 6 a 10 veces.
7. Se realizó una centrifugación a 10000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente (15°C-25°C).
8. Se colectó todo el sobrenadante en un tubo de 2 ml limpio y se realizó una centrifugación a 10000 x g durante 5 minutos para asegurar la limpieza del sobrenadante
9. Se añadieron 800 µl del sobrenadante del paso anterior y se colocaron en una columna previamente identificada con el nombre de la muestra.
10. La columna se centrifugó a 10000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Terminado este proceso se desechó el filtrado y se colocó a la columna en un tubo colector limpio.
11. La columna se lavó con 500 µl de Buffer PB. La centrifugación se realizó en las mismas condiciones que el paso anterior, el sobrenadante se desechó y la columna se colocó en un nuevo tubo colector.
12. Se añadieron 750 µl de Buffer PE y se realizaron los mismos procedimientos del paso anterior a partir de la centrifugación.
13. La columna se centrifugó a 10000 x g durante 2 minutos para eliminar cualquier resto de los buffers de la columna. La centrifugación se repitió hasta que no apareciera ningún filtrado en los tubos colectores.
14. Se colocó la columna en un tubo colector limpio rotulado con el nombre de la clona origen y fecha de extracción y se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas previamente calentada a 70°C y se dejó incubar durante 2 minutos.
15. Finalmente, se realizó una centrifugación a 10000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente.



## Referencias

- Akin, D. E. and Benner, R. (1988) 'Degradation of Polysaccharides and Lignin by Ruminant Bacteria and Fungi', *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), pp. 1117–1125.
- Anwar, Z., Gulfraz, M. and Irshad, M. (2014) 'ScienceDirect Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy : A brief review', *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. Elsevier, 30, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.jrras.2014.02.003.
- Artzi, L., Bayer, E. A. and Morais, S. (2017) 'Cellulosomes: Bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 15(2), pp. 83–95. doi: 10.1038/nrmicro.2016.164.
- Bajpai, P. (2016) In Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. Springer Briefs in Molecular Science, pp 17–70.
- Banakas, P. *et al.* (2018) 'Physically effective fibre in ruminant nutrition : A review', *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), pp. 303–308.
- Barbetta, J. R. *et al.* (2015) 'Bacterial diversity in bovine rumen by metagenomic 16S rDNA sequencing and scanning electron microscopy', *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(3), p. 251. doi: 10.4025/actascianimsci.v37i3.26535.
- Belouqui, A. *et al.* (2006) 'Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: Biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships', *Journal of Biological Chemistry*, 281(32), pp. 22933–22942.
- Bomble, Y. J. *et al.* (2017) 'ScienceDirect Lignocellulose deconstruction in the biosphere', *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 41, pp. 61–70. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.10.013.

- Borja, B. M. *et al.* (2016) 'Structure and operation of the production chain of agricultural wastes as a forage crop', *Revista Mexicana de Agronegocios*, 39, pp. 451–464.
- Brown, M. E. and Chang, M. C. Y. (2014) 'Exploring bacterial lignin degradation', *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 19(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.11.015.
- Chand, R. *et al.* (2008) 'A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram ' s Iodine', *Current Opinion in Microbiology*, 57, pp. 503–507. doi: 10.1007/s00284-008-9276-8.
- Chávez, M. & Domine, M. E. (2013) 'Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial', *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), pp. 15–46.
- Claus, H. (2004) 'Laccases : structure , reactions , distribution', 35, pp. 93–96. doi: 10.1016/j.micron.2003.10.029.
- Clauss, M. and Hummel, J. (2017) 'Physiological adaptations of ruminants and their potential relevance for production systems', *Brazilian Journal of Animal Science*, 46(7), pp. 606–613.
- Cooper, B. B. (2013) 'Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales', *Vertientes*, 16(1), pp. 19–22.
- Cragg, S. M. *et al.* (2015) 'ScienceDirect Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life', *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 29, pp. 108–119. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.10.018.
- Cruz, C. M., Sánchez, M. J. (2006), La fibra en la alimentación del ganado lechero, *Nutrición Animal Tropical*, 6(1):39-74.
- De Gonzalo, G. De *et al.* (2016) 'Bacterial enzymes involved in lignin degradation', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 236, pp. 110–119. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.08.011.

- Dehority, B. A. (1991) 'Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen', *Proceedings of the Nutrition Society*, 50(2), pp. 149–159. doi: 10.1079/PNS19910026.
- Dehority, B. A. and Tirabasso, P. A. (2000) 'Antibiosis between Ruminal Bacteria and Ruminal Fungi', 66(7), pp. 2921–2927.
- Del Pozo, M. V *et al.* (2012) 'Microbial  $\beta$ -glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail', *Biotechnology for Biofuels*, 5(73). doi: 10.1186/1754-6834-5-73.
- Denman, S. E. and McSweeney, C. S. (2015) 'The Early Impact of Genomics and Metagenomics on Ruminal Microbiology', *Annual Review of Animal Biosciences*, 3(1), pp. 447–465. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110705.
- Deusch, S. *et al.* (2017) 'A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments', *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), pp. 1–21. doi: 10.3389/fmicb.2017.01605.
- Dhiman, S., Mukherjee, G. and Singh, A. K. (2018) 'Recent trends and advancements in microbial tannase-catalyzed biotransformation of tannins: a review', *International Microbiology*. International Microbiology.
- Dias, J. *et al.* (2017) 'Effect of pre-weaning diet on the ruminal archaeal, bacterial, and fungal communities of dairy calves', *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). doi: 10.3389/fmicb.2017.01553.
- Dimarogona, M., Topakas, E. and Christakopoulos, P. (2012) 'Cellulose degradation by oxidative enzymes', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3).
- Dror, T. W. *et al.* (2003) 'Regulation of the Cellulosomal celS ( cel48A ) Gene of *Clostridium thermocellum* Is Growth Rate Dependent', *Journal of Bacteriology*, 185(10), pp. 3042–3048. doi: 10.1128/JB.185.10.3042.

- Edwards, J. E. *et al.* (2004) '16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 86, pp. 263–281.
- Fang, L. *et al.* (2015) 'Ruminal Bacterial Diversity of Yaks ( *Bos Grunniens* ) Fed by Grazing or Indoor Regime on the Tibetan Plateau by Analysis of 16S rRNA Gene Libraries', *Italian Journal of Animal Science*, 14(4), p. 3970. doi: 10.4081/ijas.2015.3970.
- Ferrés, I. *et al.* (2015) 'Construction and screening of a functional metagenomic library to identify novel enzymes produced by Antarctic bacteria', *Advances in Polar Science*, 26(1), pp. 96–101. doi: 10.13679/j.advps.2015.1.00096.
- Fliegerova K. *et al.* (2014) 'Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumenbacterial population', *Anaerobe*, 29, pp. 80–84.
- Gasque, G. R. (2008) Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, :9-11.
- Golder, H. M. *et al.* (2014) 'Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers', *Journal of Dairy Science*. Elsevier Ltd, 97(8), pp. 5131–5150. doi: 10.3168/jds.2014-8003.
- Grilli, D. J. *et al.* (2016) 'Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet', *Anaerobe*, 42, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.07.002
- Guerriero, G. *et al.* (2016) 'Lignocellulosic biomass: Biosynthesis , degradation , and industrial utilization', pp. 1–16. doi: 10.1002/elsc.201400196.
- Guzmán, C. Á. M. *et al.* (2015) 'Isolation and selection of autochthonous bacteria from Manabí-Ecuador with cellulolytic activity', *Cultivos Tropicales*, 36(1), pp. 7–16.

- Hankin, L. and Anagnostakis, S. (1977) 'Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect C, Cellulase Activity of Micro-organisms', *Journal of General Microbiology*, 98, pp. 109–115.
- Harfoot, C. G. (1978) 'Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract', *Progress in Lipid Research*, 17, pp. 1–19.
- Hart, E. H., Creevey, C. J. and Hitch, T. (2018) 'Meta-proteomics of rumen microbiota indicates niche compartmentalisation and functional dominance in a limited number of metabolic pathways between abundant bacteria', *Scientific Reports*, 8, pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-28827-7.
- Hoover, W. H. and Miller, T. K. (1991) 'Rumen digestive physiology and microbial ecology.', *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. Elsevier Masson SAS, 7(2), pp. 311–325. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30801-X.
- Horn, S. J. *et al.* (2012) 'Novel enzymes for the degradation of cellulose Novel enzymes for the degradation of cellulose', *Biotechnology for Biofuels*, 5(45).
- Hungate 1000, 'Rumen Microbial Genomic Network', Disponible en: <http://www.rmgnetwork.org/hungate1000.html>
- Idle, J. and Gonzalez, F. (2007) 'Metabolomics', *Cell Metabolism*, 6, pp. 348–351. doi: 10.4155/EBO.13.454.
- Instituto Nacional de Tecnología Aplicada (INTA) (2014) 'Nutrición Animal Aplicada' Facultad de Ciencias Agropecuarias. Balcarce, Buenos Aires.
- Isikgor, F. H. and Becer, C. R. (2015) 'Polymer Chemistry the production of bio-based chemicals and polymers', *Polymer Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 6, pp. 4497–4559. doi: 10.1039/c5py00263j.
- Juturu, V. and Wu, J. C. (2012) 'Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 30(6), pp. 1219–1227. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.006.
- Kabel, M. A. *et al.* (2011) 'Biochemical characterization and relative expression levels of multiple carbohydrate esterases of the xylanolytic rumen

bacterium *Prevotella ruminicola* 23 grown on an ester-enriched substrate', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), pp. 5671–5681. doi: 10.1128/AEM.05321-11.

- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S. and Weinshilboum, R. M. (2008) 'Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), pp. 653–683. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715.
- Kantharaj, P. *et al.* (2017) 'Lignocellulose Degrading Enzymes from Fungi and Their Industrial Applications', *International Journal of Current Research and Review*, 9(21). doi: 10.7324/IJCRR.2017.9211.
- Kellner, R. (2000) 'Proteomics. Concepts and perspectives', *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6–7), pp. 517–524. doi: 10.1007/s002160051547.
- Klevenhusen, F. *et al.* (2017) 'Changes in fibre-adherent and fluid-associated microbial communities and fermentation profiles in the rumen of cattle fed diets differing in hay quality and concentrate amount', *FEMS Microbiology Ecology*, 93(9), pp. 1–13. doi: 10.1093/femsec/fix100.
- Krause, D. O. *et al.* (2003) 'Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics', *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), pp. 663–693. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00072-X.
- Kumar, J. and Reetu, S. (2015) 'Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments', *Biotech*, 5, pp. 337–353. doi: 10.1007/s13205-014-0246-5.
- Lagunes, E. and Zavaleta, E. (2015) 'Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios', *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, pp. 43–63. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1506-7.
- Li, R. *et al.* (2017) 'The Characterization of Hemicellulose Extract from Corn Stalk with Stepwise Alkali Extraction The Characterization of Hemicellulose

Extract from Corn Stalk with Stepwise Alkali Extraction', (August). doi: 10.7584/JKTAPPI.2017.08.49.4.29.

- Liu, J. *et al.* (2016) 'Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants', *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association, 99(12), pp. 9668–9681. doi: 10.3168/jds.2016-11398.
- Lowe, R. *et al.* (2017) 'Transcriptomics technologies', *PLoS Computational Biology*, 13(5), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005457.
- Lynd, L. R. *et al.* (2002) 'Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), pp. 506–577. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506.
- Malmuthuge, N. and Guan, L. L. (2017) 'Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation', *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1).
- Mao, S. Y. *et al.* (2013) 'Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing', *Anaerobe*. Elsevier Ltd, 24, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.08.003.
- Martínez, R. L (2009) Uso de esquilmos agrícolas e industriales en la alimentación de ovinos. Disponible en: <http://www.uno.org.mx/sistema/pdf/alimentacion/usodeesquilmos.pdf>
- Mc Govern, E. *et al.* (2018) 'Evaluating established methods for Rumen 16S rRNA amplicon sequencing with mock microbial populations', *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), pp. 1–14.
- Mc Sweeny, C. S. *et al.* (1994) 'Solubilization of Lignin by the Ruminal Anaerobic Fungus *Neocallimastix patriciarum*', *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), pp. 2985–2989.
- Mcallister, T. A. *et al.* (1994) 'Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen', *Journal of Animal Science*, 72(11), pp. 3004–3018.

- Mehta, M., Muddapur, U. M. and Priya, V. G. S. (2014) “ Fungal Production of Tanase : A Review Fungal Production of Tannase : A Review Abstract :’, *International Journal of Scientific Engineering and Technology*, 2(8), pp. 752–755.
- Moore, K. J. and Jung, H. G. (2001) ‘Lignin and fiber digestion’, *Journal of Range Management*, 54(July), pp. 420–430.
- Morais, S. *et al.* (2012) ‘Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes’, *mBio*, 3(6), pp. 1–11. doi: 10.1128/mBio.00508-12.
- Nathani, N. M. *et al.* (2013) ‘Comparative evaluation of rumen metagenome community using qPCR and MG-RAST.’, *AMB Express*. *AMB Express*, 3(1), p. 55. doi: 10.1186/2191-0855-3-55.
- Nathani, N. M. *et al.* (2015) ‘Isolation of chitinolytic *Clostridium* sp. NCR from Mehsani buffalo rumen, its genomic analysis and potential role in rumen’, *Genomics Data*. Elsevier B.V., 5, pp. 109–111. doi: 10.1016/j.gdata.2015.05.017.
- Newbold, C. J. (2015) ‘The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen’, *Frontiers in Microbiology*, 6, pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.01313.
- Ni, J. and Tokuda, G. (2013) ‘Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota’, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.005.
- Nyonyo, T., Shinkai, T. and Mitsumori, M. (2014) ‘Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen’, *FEMS Microbiology Ecology*, 88(3), pp. 528–537. doi: 10.1111/1574-6941.12318.
- Orozco, C. A. L. (2015), *Esquilmos frutales para alimento de los animales*, Monografía, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón Coahuila.



- Pando, R. R. V. and Lanz, Mendoza, H. (2009) 'La importancia de la proteómica en la salud pública', *Salud pública de México*, 51(3), p. S-386-S394.
- Paster, B. J. *et al.* (1993) 'Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov.', *International journal of systematic bacteriology*, 43(1), pp. 107–110. doi: 10.1099/00207713-43-1-107.
- Pedrolli, D. B. *et al.* (2009) 'Pectin and Pectinases: Production , Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes', pp. 9–18.
- Petri, R. M. *et al.* (2017) 'Temporal dynamics of in-situ fiber-adherent bacterial community under ruminal acidotic conditions determined by 16S rRNA gene profiling', *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0182271.
- Puniya, A. K., Singh, R. and Kamra, D. N. (2015) *Rumen microbiology: From evolution to revolution*, *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. doi: 10.1007/978-81-322-2401-3.
- Rodicio, R. M. R. *et al.* (2004) 'Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), pp. 201-257.
- Russell, J. B. and Rychlik, J. L. (2001) 'Factors That Alter Rumen Microbial Ecology', *Science*, 292, pp. 1119–1122.
- Salami, S. A. *et al.* (2018) 'Characterization of the ruminal fermentation and microbiome in lambs supplemented with hydrolysable and condensed tannins', *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5), pp. 1–21. doi: 10.1093/femsec/fiy061/4966975.
- Sánchez, E. A. *et al.* (2012) 'Rastrojo De Maíz Tratado Con Urea Y Metionina Protegida En Dietas Para Ovinos En Crecimiento', 37(May), pp. 395–399.

- Sasikumar, V. *et al.* (2014) 'Isolation and Preliminary Screening of Lignin Degrading Microbes', *Journal of Academia and Industrial Research*, 3(6), pp. 2012–2015.
- Sawanon, S., Koike, S. and Kobayashi, Y. (2011) 'Evidence for the possible involvement of *Selenomonas ruminantium* in rumen fiber digestion', *FEMS Microbiology Letters*, 325(2), pp. 170–179. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02427.x.
- Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA), (2015), *Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas primera etapa: Diagnóstico nacional*. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment-file/346963/Manejo de Residuos Reporte Ejecutivo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment-file/346963/Manejo_de_Residuos_Reporte_Ejecutivo.pdf)
- Shallom, D. and Shoham, Y. (2003) 'Microbial hemicellulases', *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), pp. 219–228. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00056-0.
- Shulaev, V. (2006) 'Metabolomics technology and bioinformatics', *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), pp. 128–139. doi: 10.1093/bib/bbl012.
- Singh, K. M. *et al.* (2014) 'Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets', *Meta Gene*. The Authors, 2(1), pp. 191–199. doi: 10.1016/j.mgene.2014.01.001.
- Stern, J. *et al.* (2016) 'Adaptor scaffolds: An original strategy for extended designer cellulosomes, inspired from nature', *mBio*, 7(2), pp. 1–10. doi: 10.1128/mBio.00083-16.
- Streit, W. R. and Schmitz, R. A. (2004) 'Metagenomics – the key to the uncultured microbes', *Current Opinion in Microbiology*, 7, pp. 492–498. doi: 10.1016/j.mib.2004.08.002.
- Tong, J. *et al.* (2018) 'Illumina sequencing analysis of the ruminal microbiota in high-yield and low-yield lactating dairy cows', pp. 1–15.

- Ufarté, L. *et al.* (2018) 'Highly Promiscuous Oxidases Discovered in the Bovine Rumen Microbiome', *Frontiers in Microbiology*, 9(May), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2018.00861.
- Vaidya, D. J. *et al.* (2018) 'The Effect of DNA Extraction Methods on Observed Microbial Communities from Fibrous and Liquid Rumen Fractions of Dairy Cows', *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2018.00092.
- Valenciaga, D. and Chongo, B. (2004) 'La pared celular . Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes', *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(4), pp. 334–350.
- Van Soest, P. J. (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY
- Villegas, R. G. *et al.* (2013) 'Evaluation of DNA extraction methods of rumen microbial populations', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, pp. 301–307. doi: 10.1007/s11274-012-1183-2.
- Viteri, F. P. A., Castillo, G. D. A. and Viteri, R. S. E. (2016) 'Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá , Colombia', *Acta Agronómica*, 65(4), pp. 362–367.
- Voragen, A. *et al.* (2009) 'Pectin , a versatile polysaccharide present in plant cell walls', pp. 263–275. doi: 10.1007/s11224-009-9442-z.
- Wang, Y. and McAllister, T. A. (2002) 'Rumen microbes, enzymes and feed digestion-A review', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(11), pp. 1659–1676. doi: 10.5713/ajas.2002.1659.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) 'RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics', *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.RNA-Seq.
- Weimer, P. J. (2015) 'Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations', *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2015.00296.

- Wong, K. *et al.* (2017) 'Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health', *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central, 15(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- Yang, W. Z. and Beauchemin, K. A. (2005) 'Effects of Physically Effective Fiber on Digestion and Milk Production by Dairy Cows Fed Diets Based on Corn Silage', *Journal of Dairy Science*. 88(3), pp. 1090–1098. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72776-4.
- Yoshida, T. and Sugano, Y. (2015) 'A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family', *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*. Elsevier Inc., (February). doi: 10.1016/j.abb.2015.01.022.
- Avguštin, G., Flint, H. J. and Whitehead, T. R. (1992) 'Distribution of xylanase genes and enzymes among strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* from the rumen', *FEMS Microbiology Letters*, 99(2–3), pp. 137–143. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05556.x.
- Parmar, N. R. *et al.* (2014) 'Metagenome of mehsani buffalo rumen microbiota: An assessment of variation in feed-dependent phylogenetic and functional classification', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 24(4), pp. 249–261. doi: 10.1159/000365054.
- Scheifinger, C. C. and Wolin, M. J. (1973) 'Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*.', *Applied microbiology*, 26(5), pp. 789–95.
- Nelson, K. E. *et al.* (1998) 'Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), pp. 3824–3830.
- Acioly, L. M. L. *et al.* (2017) 'Isolation , Identification , Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of *Pantoea agglomerans*', *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 6(11), pp. 4152–4163.