

**EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO  
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA RUMINAL EN BOVINOS**

**LINA MARCELA BOTERO RUTE**  
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL



Universidad de  
**La Sabana**

**MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

**MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA**

**CHIA, CUNDINAMARCA**

**2022**

**EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO  
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA RUMINAL EN BOVINOS**

**LINA MARCELA BOTERO RUTE**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGISTER EN DISEÑO  
Y GESTIÓN DE PROCESOS  
ÉNFASIS EN BIOPROCESOS**

**DIRECTOR:**

**Ph.D. ALEJANDRO ACOSTA GONZÁLEZ**

**CODIRECTOR:**

**Ph.D. ALEJANDRO CARO-QUINTERO**

**MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

**MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA**

**CHIA, CUNDINAMARCA**

**2022**

## **DEDICATORIA**

*Dedicado a mis padres, Nicolas y Dora. Quien sin su esfuerzo  
este camino no sería el mismo.*

*A mis hermanos Leidy, Andres y Daniel quienes sostienen este  
tejido llamado familia.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de la Sabana, por la formación y por el apoyo financiero al otorgarme la Beca de Excelencia durante toda la maestría para la realización de esta Maestría.

Agradezco a mis padres, quienes con todo su esfuerzo me han dado las bases para ser la persona que soy y por inculcarme la fortaleza de seguir adelante ante cualquier eventualidad.

A mis amigos de AGROSAVIA, quienes han creído en mí desde el día uno y alegraron mis días. Lorena, Rochi, Paola, Martha, Edwin, Gabriel, Diego por su paciencia en resolver todas mis dudas de bioinformática y en especial a Juan quien sin su amistad, paciencia y ganas de enseñarme todo sobre microbiología ruminal, este trabajo no sería una realidad.

A mis amigos incondicionales Andrea, Luisa, Laura, Catalina, Christian, quienes me brindaron infinitos momentos de apoyo y esperaron tanto este momento como yo.

A Walter por ser mi amigo incondicional desde el día uno, por haber emprendido este camino conmigo, por brindarme luz en los días más difíciles, por su amor y paciencia en todas las crisis, en los momentos de agobio y desesperación donde parecía que esto no iba a terminar. Gracias por celebrar cada logro conmigo por mínimo que pareciera y entender mis charlas de microbiología ruminal.

A los doctores Hugo Jimenez, Alejandro Acosta y Alejandro Caro, quienes de diferentes formas hicieron parte de este trabajo para su realización y confiaron en mí para realizar este trabajo e ir más allá de lo pensado.

A AGROSAVIA, por ser la casa que me vió crecer, me vió formar y me llenó de las capacidades investigativas que se reflejan en este trabajo, gracias por permitirme realizar este proyecto no como un evento aislado sino como parte de las visiones de AGROSAVIA en la Colección CMINA.

¡A todos los que se cruzaron en mi camino durante mi maestría, infinitas gracias

EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA RUMINAL EN BOVINOS	8
Resumen	8
1. Marco Teórico	11
1.1. Los bovinos	11
1.2. El ambiente ruminal	12
1.2.1. Bacterias	12
1.2.2. Hongos anaerobios	13
1.2.3. Archaeas metanógenas	14
1.2.4. Protozoos	14
1.2.5. Virus	14
1.3. Cultivabilidad de los microorganismos ruminales	14
1.3.1. Métodos dependientes de cultivo	15
1.3.2. Métodos independientes de cultivo.	16
1.4. Potencial de bioprospección	16
1.5. Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA-AGROSAVIA)	17
2. Definición del Problema y Justificación	19
3. Estado del arte	21
4. Hipótesis y Objetivos	23
4.1. Justificación	23
4.1.1. Objetivo General	23
4.2. Hipótesis específicas	23
4.2.1. Objetivos específicos	23
Capítulo I	24
EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO MULTIVARIABLE PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS RUMINALES	24
Resumen	24
5. Metodología	25
5.1. Muestreo	25
5.1.1. Preparación del Animal	25
5.2. Medios de cultivo de bacterias ruminales	25
5.3. Enriquecimiento de microorganismos ruminales	25
5.4. Procesamiento de la muestra para análisis de amplicones.	26
5.4.1. Amplificación del marcador molecular gen 16s rRNA.	27
5.4.2. Preparación de librería de amplicones 16s rRNA	27
5.5. Análisis de Datos	28
5.6. Resultados y discusión	29

5.6.1. Caracterización taxonómica de la diversidad bacteriana presente en los medios de cultivo y el fluido ruminal	29
5.6.2 Efecto de la dilución en la riqueza de especies bacterianas.	36
5.6.3 Efecto del tiempo de incubación y dilución en la composición de la comunidad, análisis multivariado.	37
5.6.4 Determinación de la distancia de las comunidades enriquecidas por los medios de cultivo y fluido ruminal	40
5.7 Conclusión	42
Referencias	43
Capítulo II	47
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RUMINALES ANAEROBIAS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO SELECCIONADOS	47
Resumen	47
6. Metodología	49
6.1 Preparación del animal y toma de muestras	49
6.2 Implementación de estrategia de cultivo	49
6.3 Aislamiento de microorganismos mediante Roll-tube	49
6.4. Caracterización de los aislados	51
6.4.1 Tinción de Gram y descripción morfológica	51
6.4.2 Caracterización molecular de la diversidad recuperada	51
6.4.3 Determinación de la estructura microbiana por microscopía electrónica (SEM)	51
6.5. Análisis taxonómicos del enriquecimiento y los aislados obtenidos en cultivo puro	52
6.5.1 Análisis del gen 16s rRNA	52
6.5.2 Librerías de amplicones	52
6.6 Resultados y discusión	53
6.6.1. Caracterización preliminar y microscópica de los medios de cultivo	53
6.6.2. Aislamiento de los microorganismos.	53
6.6.3. Identificación molecular de los aislamientos	56
6.6.4 Análisis filogenético	57
6.6.5 <i>Comparación de la diversidad cultivable y no cultivable.</i>	64
6.6.5.1 Comparación de la composición de filos	64
6.6.5.2 <i>Comparación de la composición de géneros.</i>	67
6.7 Conclusión.	70
Referencias.	71
Capítulo III POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.	73
Resumen	73
7. Metodología	74
7.1 Cultivo de microorganismos	74

7.1.1 Cultivo de BAR	74
7.1.2 Cultivo de patógeno	74
7.2 Screening de actividad antimicrobiana	74
7.2.1 Método de difusión en agar	74
7.2.2 Evaluación de la fracción con actividad antimicrobiana en placa multipozo.	75
7.3 Resultados y discusión	76
7.3.1 Screening de actividad antimicrobiana mediante difusión en agar.	76
7.2.2 Determinación de la fracción con actividad antimicrobiana	79
7.3 Conclusión	83
Referencias	84
Capítulo IV	85
Descripción del metabolismo ruminal de cepas de interés mediante reconstrucción metagenómica (Shotgun).	85
Resumen	85
8. Metodología	86
8.1 Preparación de librería metagenómica	86
8.2 Análisis de secuenciaciones Shotgun para reconstrucción metagenómica	86
8.2.1 Calidad de datos y clasificación taxonómica de lecturas.	86
8.2.2 Ensamblaje de secuencias y binning	86
8.2.3 Anotación de MAGs y clasificación filogenética.	87
8.2.4 Clasificación funcional.	87
8.3 Resultados y discusión	88
8.3.1 Análisis de secuenciaciones Shotgun para reconstrucción metagenómica	88
8.3.1.1 Número de lecturas y clasificación taxonómica	88
8.3.1.2 Ensamblaje de secuencias y binning	91
8.3.1.3 Clasificación de MAGs.	95
8.3.1.3.1 Relación de los taxones enriquecidos, aislados y reconstruidos	99
8.3.1.4 Funcionalidad de enzimas degradadoras de carbohidratos	101
8.3.1.5 Funcionalidad de módulos asociados a metabolismo del nitrógeno.	105
8.3.1.6 Funcionalidad de módulos asociados a producción de ácidos grasos de cadena corta (AGVs) y producción de alcohol.	107
8.4 Conclusión	109
Referencias	110
CONCLUSION FINAL	113
Productos	114
Material Suplementario	115

# EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA RUMINAL EN BOVINOS

## Resumen

En la transición de la economía de recolección a la de producción, la ganadería ha sido fundamental para alcanzar la seguridad alimentaria principalmente en el mundo desarrollado. En Colombia, el 51 % de la fuente de proteína alimentaria proviene del ganado bovino, con un 67 % y 33% repartido entre leche y carne. Para el 2019, el sector nacional agropecuario y pecuario representaron el 6,74 % y 28,9 % del PIB del país, generando 810.000 empleos directos en el sector. En el 2020, se estimó un total de 28 millones de cabezas en el hato ganadero, con una extensión de 34 millones de hectáreas de pastoreo para su uso. La alimentación del ganado está dominada por el consumo de forrajes que se complementan con concentrados, debido a la amplia gama de forrajes utilizados, la ganadería extensiva tiene un alto impacto ambiental. Lo anterior muestra la enorme importancia de entender el sistema fermentativo ruminal de las razas bovinas, la diversidad taxonómica y funcional asociada a la capacidad fermentativa de su microbiota, y como la modulación de este sistema a través del desarrollo de métodos y tecnologías permiten mejorar no solo la productividad animal, sino de reducir su impacto ambiental, tema poco estudiado en el país.

Esta investigación tiene como objetivo principal la evaluación de distintas estrategias de cultivo de microorganismos ruminales mediante la combinación de técnicas de microbiología clásica y el metabarcoding como nueva base para el aislamiento selectivo de poblaciones ruminales poco cultivadas hasta el momento. En el capítulo I, se evaluó la selección de bacterias anaerobias en ocho medios de cultivo (CAN, ER, GC, GOOD, KNT, KYO, NYO, TRB), 3 diluciones seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$ ) y 2 tiempos de incubación (3 y 7 días), mediante el uso de metabarcoding del gen 16S rRNA. Como resultado se encontraron diferencias en la diversidad enriquecida en cada uno de los medios de cultivo en comparación con la diversidad inicial del fluido ruminal tanto a nivel de filo como a nivel de género. A nivel de filo, los Firmicutes presentaron dominancia en los medios, mientras que los Bacteroidetes dominan el fluido ruminal. Según los análisis de coordenadas principales, el tiempo de incubación no muestra diferencias entre las poblaciones al no agruparse, mientras que el factor dilución muestra agrupación de los datos por dilución, las diluciones  $10^{-2}$  muestran cercanía con el rumen, por su parte las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$  se encuentran alejadas tanto del rumen como de la dilución  $10^{-2}$ . Este comportamiento refleja un cambio en la comunidad y diversidad el cual disminuye al aumentar la dilución. Como criterios de selección de los medios se tuvo en cuenta la diversidad enriquecida en las diluciones, la importancia de dicha diversidad a nivel ruminal y la capacidad de reproducibilidad del medio en el tiempo en términos de composición y elaboración. Con esto los medios CAN y KNT fueron seleccionados por su selectividad y enriquecimiento de microorganismos como *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Sharpea*, *Olsenella*, *Prevotella*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, y



posibles microorganismos no cultivados de la familia *Lachnospiraceae* con la utilización de la dilución  $10^{-12}$ .

En el capítulo II se evaluó la aplicación de la estrategia seleccionada para la obtención de aislamientos y su identificación, además de la comparación de la diversidad obtenida con la observada por metabarcoding. Como resultado, se recuperaron 56 aislamientos a partir de los medios CAN y KNT, identificados con los géneros *Actinomyces* sp (2), *Butyrivibrio* sp (2), *Limosilactobacillus* sp (2), *Oribacterium* sp (2), *Pediococcus* sp (1), *Pseudobutyrvibrio* sp (2), *Streptococcus* spp (14), *Staphylococcus* spp (15), *Succinivibrio* sp (13) y, *Selenomonas* sp (3). De acuerdo con las comparaciones por metabarcoding se observó que ambos medios de cultivo presentaron una alta reproducibilidad en el tiempo. La comparación entre librerías mostró que para el medio CAN se enriquecieron con una abundancia superior al 1 %, siete de los nueve géneros reportados en el capítulo I, mientras que para KNT cinco de los seis géneros reportados anteriormente fueron enriquecidos. Adicionalmente se observó el enriquecimiento de tres y diez clasificaciones entre orden, familia y género con abundancias superiores al 1 % que no se encontraban en los resultados del primer análisis por metabarcoding para CAN y KNT respectivamente. De los aislamientos obtenidos en cada medio corresponden al 20 % (CAN) y 33 % (KNT) de la diversidad abundante determinada por metabarcoding, evidenciando que su cultivabilidad requiere de modificaciones de las condiciones empleadas en este trabajo.

En el capítulo III, se determinó el potencial antimicrobiano de los aislados mediante pruebas de antagonismo de tipo cualitativo por enfrentamientos directos en la caja de petri y cuantitativo mediante la determinación del porcentaje de inhibición en placa multipozo con lecturas de absorbancia, utilizando tratamientos a partir del cultivo de cada antagonista. Como patógeno se utilizó una cepa de *E. coli* OH:157 y 9 aislados recuperados de los géneros *Streptococcus* (*S. equinus*, *S. lutetiensis*, *S. orisasini*, *S. salivarius*) y *Staphylococcus* (*S. pasteurii* y *S. warneri*). Como microorganismos antagónicos se utilizaron un total de 33 aislados y una cepa control del grupo de las Bacterias Ácido-Lácticas de CMINA. Como resultado cualitativo un total de 21 aislados mostraron potencial de inhibir *E. coli* OH:157. De los cuatro tipos de tratamientos evaluados cuantitativamente, del tratamiento “células en solución salina” (CSN), 7 aislamientos presentaron inhibición por encima del 50 %, mientras que, del tratamiento “sobrenadante filtrado concentrado” (SFC), 5 aislados mostraron promoción de crecimiento del patógeno entre un 5 y 15 % por encima del crecimiento bajo condiciones normales.

Finalmente, en el capítulo IV se presentan los resultados de la reconstrucción y caracterización de genomas metagenómicos ensamblados (MAGs) obtenidos a partir de la secuenciación shotgun de las muestras CAN12-3D, CAN12-7D, KNT12-3D, KNT12-3D. Los datos obtenidos de la secuenciación fueron ensamblados, anotados, clasificados filogenética y funcionalmente. Para la determinación funcional se estableció la presencia de enzimas degradadoras de azúcares estructurales (CAZymes), junto a la asociación de

degradación de sustratos de carbono, además de establecer la funcionalidad de módulos asociados a los metabolismos de nitrógeno, producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs) y la producción de alcohol. Como resultado, un total de 33 MAGs fueron reconstruidos, anotados y clasificados. Los genomas de los organismos reconstruidos pertenecen a *Acidaminococcus fermentans*, *Butyrivibrio sp*, *B.hungatei*, *Caecibacter massiliensis*, *Clostridium aminophilum*, *Denitrobacter detoxificans*, *Desulfovibrio sp*, *Enterococcus faecalis*, 2 MAGs *Kandleria vitulina*, 3 MAGs *Lachnospiraceae*(familia), *Marseille-P3106*, *Methanomethylophilus sp*, *Olsenella sp*, *O. umbonata*, *Prevotella sp*, *P. albensis*, *P. bryantii*, *P. ruminicola*, *Pyramidobacter sp*, RC9, *Schwartzia succinovorans*, 2 MAGs *Selenomonadaceae*, 2 MAGs *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus lutetiensis*, 2 MAGs *Succinivibrio dextrinosolvens*, *UBA1232* y *UBA9732*. Se encontró una abundancia alta de las enzimas Glicosil-Transferasa (GT) y Glicosil-Hidrolasa (GH) en los 33 MAGs, mientras que las enzimas de Actividades-Auxiliares (AA) y Polisacárido-Liasas (PL) se encontraron en 14 y 7 MAGs respectivamente. Para las funciones asociadas a metabolismo, se estableció la presencia de los diferentes módulos del metabolismo del nitrógeno únicamente en 7 MAGs, mientras que en la producción de AGVs y de alcohol, 26 MAGs están relacionados en la producción de acetato, 18 en lactato, 12 en butirato, 3 en propionato y 7 en alcohol; la determinación de estas capacidades muestra las posibles rutas de selección de estos microorganismos en los medios de cultivo utilizados. Los resultados generados en los cuatro capítulos componen las bases para la generación de otras estrategias que permitan entender no solo el rol ecológico de la microbiota ruminal, sino la disponibilidad de alternativas para el aislamiento de microorganismos anaerobios mediante el uso de herramientas moleculares y microbiológicas. Los microorganismos obtenidos formarán parte de la Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) pertenecientes al banco de germoplasma de AGROSAVIA.

## 1. Marco Teórico

### 1.1. Los bovinos

La familia Bovidae compone una de las seis familias de rumiantes con mayor número de especies dentro de las que se encuentran animales importantes en ganadería como el ganado vacuno [1]. Los rumiantes han evolucionado a lo largo de 50 millones de años en tamaño, morfología dental, ósea y sistema digestivo. Los primeros rumiantes eran de un tamaño similar a los conejos, con dientes de corona baja, incisivos pequeños, cráneos largos y estrechos aptos para alimentarse de frutas e insectos, por ende, carecían de microbiota ruminal. Los bovinos evolucionaron hace 23 a 18 millones de años junto con otros rumiantes de gran tamaño como las jirafas, así como los cambios climáticos y vegetativos, obligando a realizar adaptaciones de estos rumiantes. Su composición craneal y dental cambió en orden de poder alimentarse de hojas, hierba y más tarde de pastizales [2], [3], de igual manera el sistema digestivo también sufrió adaptaciones, con el desarrollo de un estómago multi-compartimental con diferencias fisiológicas, permitiendo la obtención de energía mediante la ingesta de material vegetal.

El proceso de fermentación en los bovinos inicia en el retículo en el cual se clasifica el alimento tanto fermentado y nuevo para ser transportado hacia el omaso mediante las contracciones o hacia el rumen, donde se lleva a cabo el proceso de fermentación microbiana; estos dos forman una cámara que mantiene las condiciones ruminales favorables para la fermentación anaerobia. Durante el proceso de fermentación intervienen varios factores además de los microorganismos para la degradación del material vegetal, la mezcla de saliva, las contracciones y la rumia contribuyen al rompimiento en pequeños trozos para seguir su proceso en el rumen. La microbiota puede hidrolizar los compuestos como celulosa, hemicelulosa, pectina, xilano, fructanos, almidones y otros oligosacáridos a monosacáridos o disacáridos, además de otros compuestos esenciales para el metabolismo de otras poblaciones microbianas [4]–[6]. Los ácidos grasos volátiles (AGVs) de cadena corta son los productos finales en la fermentación ruminal, estos son absorbidos por la pared ruminal hacia el torrente sanguíneo y posteriormente al hígado donde serán convertidos en azúcares y lípidos para la obtención de energía y construcción de tejido. Algunos productos del metabolismo microbiano, así como el amoniaco y el CO<sub>2</sub> producido permiten la síntesis de células microbianas, estas a su vez benefician al animal como fuente de proteína. Como tercer compartimento gástrico se encuentra el omaso lugar en el cual se reabsorbe el líquido junto con los residuos de AGVs que no hayan sido absorbidos en el rumen, además de filtrar el material sólido mediante sus papilas las cuales son transportadas hacia el abomaso, siendo el estómago verdadero donde se secretan jugos gástricos y enzimas digestivas para la degradación de proteína proveniente tanto del alimento como de los microorganismos [4], [6], a pesar de considerarse al abomaso como el estómago verdadero por emular las capacidades y funciones de los estómagos en animales mamíferos monogástricos, estudios recientes [1] han reportado cambios evolutivos de adaptación en el abomaso para digerir la

proteína microbiana, explicada en el aumento en el número de copias del gen de la lisozima C encargada de la degradación. Estas adaptaciones claramente muestran el enorme papel de los microorganismos como presión de selección en las adaptaciones adquiridas por los rumiantes.

## **1.2. El ambiente ruminal**

El sistema digestivo en bovinos se caracteriza por poseer un estómago con cuatro compartimientos siendo estos: rumen, retículo, omaso, abomaso [7]. El rumen es el compartimiento en el cual ocurren los procesos de degradación del bolo alimenticio, ayudado por las continuas contracciones del rumen que mezclan del contenido ruminal. El ambiente ruminal está constituido en un 65% por CO<sub>2</sub> y 35% por metano, otros gases como, N<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> también se encuentran presentes en menor cantidad [8]. En cuanto a sus propiedades físicas este es un ambiente estrictamente anaeróbico, posee un contenido de materia seca de 10 al 18%, una temperatura que alcanza los 40°C. En cuanto a la acidez, el rumen presenta un pH de 5.5-7.0 el cual puede equilibrarse por su gran capacidad buffer, gracias a la presencia de ácidos orgánicos, junto con el continuo paso de saliva, compuesto por bicarbonato y fosfatos. La osmolaridad del rumen depende del momento en el cual se alimenta, pasando por estados de hipotónico a hipertónico, pero con el paso del tiempo se mantiene en su estado hipotónico. Los microorganismos ruminales son los encargados de la degradación de carbohidratos complejos y síntesis de proteínas a partir de nitrógeno no proteico, los compuestos resultantes como ácidos grasos volátiles, proteínas y vitaminas del grupo B y K, serán utilizados por el animal [9].

### *1.2.1. Bacterias*

La colonización de la microbiota intestinal y ruminal en los bovinos se da desde el nacimiento 38 horas post parto y su establecimiento se da en un periodo de 8 a 13 semanas [10], [11]. En la actualidad se ha determinado que existe una gran diversidad de microorganismos en el tracto gastrointestinal de los bovinos, los cuales cumplen funciones de degradación y absorción, dependientes de la parte gástrica del animal [12]. En el ecosistema ruminal se han determinado cinco grupos de microorganismos, bacterias, hongos, archaeas de tipo metanógeno, protozoarios y virus de tipo bacteriófago [13].

La mayor parte de la población microbiana se encuentra dominada por bacterias, según estudios moleculares independientes de cultivo se han considerado la existencia de un grupo de “bacterias dominantes del rumen”, las cuales pertenecen a las siguientes clasificaciones: filo Firmicutes y Bacteroidetes, familias de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* y *Clostridiales* y a los géneros de *Prevotella*, *Butyrivibrio*, y *Ruminococcus* principalmente. Gran parte de lo que se conoce de estas bacterias ha sido obtenido mediante

técnicas dependientes de cultivo, lo cual ha permitido la caracterización fisiológica de dichos microorganismos [8], [14].

Las bacterias ruminales pueden ser clasificadas en su mayoría como anaerobias estrictas, un 75% de ellas se encuentra adheridas a las partículas de material vegetal en descomposición en el rumen o en simbiosis con protozoarios, sin embargo, una minoría hace parte de las anaerobias facultativas, estas bacterias se encuentran unidas a la pared del rumen lo que permite la captación del O<sub>2</sub> disponible [13], [15], [16]. Adicionalmente se pueden clasificar según sus funciones en degradación del forraje, como lo son bacterias fibrolíticas, ácido lácticas, acetogénicas, amilolíticas entre otras, la prevalencia de estos grupos está relacionado con la dieta del animal; por ejemplo, dietas ricas en carbohidratos simples como melaza genera una dominancia de bacterias sacarolíticas, o por el contrario dietas con altos contenidos de carbohidratos complejos como forrajes, implica la dominancia de bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas y pectinolíticas [17].

### 1.2.2. Hongos anaerobios

Los hongos ruminales son parte integral del ecosistema del rumen, representan cerca del 20% del total de microorganismos en él, son considerados los principales degradadores de material fibroso, se han reportado que producen grandes cantidades de enzimas hidrolíticas, incluyendo celulasas, hemicelulasas, proteasas, amilasas, amiloglicosidas, feruloil y p-cumaroil esterasas, pectinasas y varias disacaridasas [13], [18], las cuales tienen una mayor eficiencia que las enzimas presentadas por las bacterias. Los hongos ruminales, poseen alta variabilidad in vitro y su convergencia evolutiva hacen poco eficiente la caracterización y clasificación taxonómica; en la pasada década solo se conocían seis géneros reportados y menos de 30 especies, sin embargo, actualmente se conocen 20 géneros, siendo estos en su totalidad: *Aestipascuomyces*, *Agriosomyces*, *Aklioshbomyces*, *Anaeromyces*, *Buwchfawromyces*, *Caecomycetes*, *Capellomyces*, *Cyllamyces*, *Feramyces*, *Ghazallomyces*, *Joblinomyces*, *Khoyollomyces*, *Liebetanzomyces*, *Neocallimastix*, *Oontomyces*, *Orpinomyces*, *Paucimyces*, *Piromyces*, *Pecaromyces*, y *Tahromyces*. aislados de rumiantes, de herbívoros silvestres y herbívoros de zoológico [19]–[31]. Estos hongos a diferencia de los aerobios, carecen de mitocondria como sistema productor de energía, en cambio poseen hidrogenosomas, los cuales son glóbulos amorfos rodeados por una sola membrana con una matriz electrodensa; en las propiedades de los hidrogenosomas al igual que las mitocondrias se describen: un gradiente de pH transmembranal y el lumen alcalino, pero difieren por la generación de enzimas como hidrogenasa y piruvato/ferrodoxin oxidoreductasa en vez de presentar la enzima piruvato deshidrogenasa típica de las mitocondrias [13], [32].

### 1.2.3. *Archaeas metanógenas*

Los microorganismos metanógenos hacen parte del 2-4% del total de la población microbiana del rumen, los cuales hacen parte del dominio de las archaeas, su diferencia con las bacterias está constituida principalmente por la pared celular, la cual consta de pseudomureinas y no de peptidoglicano como en el caso de las bacterias. Su metabolismo depende de los productos finales de la fermentación dentro del rumen, produciendo metano CH<sub>4</sub> a partir de la utilización de H<sub>2</sub> y reducción de CO<sub>2</sub> [6], [33]. Dentro de las archaeas metanógenas ruminales se describe un género dominante *Methanobrevibacter* [34] y en segundo lugar el género *Methanobacterium* [13].

### 1.2.4 *Protozoos*

Los protozoos ruminales fueron los primeros microorganismos en ser descubiertos debido a su tamaño y motilidad, pueden constituir hasta el 60 % de la biomasa microbiana que habita el rumen [8], se han clasificado en dos grupos entodiniomorfos y holotricos, su función ecológica en el rumen se ha centrado en su capacidad fibrolítica y su producción y transferencia de H<sub>2</sub> para la generación de metano [35], [36]. Sin embargo, aun cuando la información de su función es poca, se ha determinado que su presencia no es obligatoria en este ecosistema y pueden ser retirados sin efecto alguno mediante procesos de defaunación. Se ha demostrado que la alta presencia de protozoos afecta la cantidad de proteína disponible para el animal siendo menor debido al comportamiento predatorio sobre las bacterias. De forma favorable, la ausencia de protozoos en el rumen decrecen las emisiones de metano [37].

### 1.2.5 *Virus*

De las poblaciones microbianas que coexisten en el rumen, se encuentran los virus o fagos en concentraciones mayores a 10<sup>9</sup> partículas por mililitro, estos se caracterizan por infectar de manera específica a bacterias, no obstante, recientemente se ha establecido la presencia de archaeafagos en el rumen. Su rol en el rumen se ha centrado en la depredación de bacterias dentro de las que se encuentran géneros “core” como *Prevotella*, *Butyrivibrio* y *Ruminococcus* dentro de las familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* y *Bacteroidales*. Esta capacidad de lisis contribuye a la conversión de biomasa bacteriana en proteína y aminoácidos disponibles para el animal. Adicionalmente, la selectividad de los virus puede ser usada en la remoción de poblaciones tanto de bacterias y archaeas no deseadas en el rumen. [13], [38].

## 1.3. **Cultivabilidad de los microorganismos ruminales**

La posibilidad de aislar microorganismos mediante técnicas de cultivo han permitido la descripción de más de 12,000 especies durante 150 años; se estima, que los esfuerzos de cultivo en cada año generan la descripción de aproximadamente 800 especies de bacterias nuevas por año, sin embargo, estos números no superan los números en diversidad bacteriana global, alcanzando ordenes de 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> especies [39]. Uno de los microbiomas aeróbicos más estudiados es el microbioma gastrointestinal humano, su importancia radica en el impacto en

la salud humana y en las enfermedades asociadas a los microorganismos intestinales, su avance se debe al desarrollo de estudios moleculares de alto rendimiento que han permitido la caracterización de la composición microbiana y el establecimiento de los roles funcionales en dicho ecosistema [40]. El cultivo y conservación adecuado de los microorganismos debe tener la importancia suficiente, puesto que son la manera de enseñar, aprender y realizar investigaciones de sus roles funcionales en diversos aspectos de la vida [41], sin embargo, debido al auge de las omicas para las aproximaciones en culturómica, la tasa de aislamiento y descubrimiento de nuevas especies microbianas ha disminuido en los últimos años [42], [43]

En el rumen la composición del microbioma puede influenciar la eficiencia o ineficiencia del animal en la capacidad de captar energía del alimento, al igual que otros factores tanto ambientales como de dieta. El entendimiento de los roles ecológicos de estos microorganismos ha logrado ser abordado desde el uso de las omicas, la secuenciación de metagenomas, metatranscriptomas, proteómica y metabolómica de gran escala ha aumentado el conocimiento de este ecosistema, sin embargo, los datos generados deben ser interpretados y correlacionados con datos de aislamientos disponibles [44],[45].

### *1.3.1. Métodos dependientes de cultivo*

El ecosistema ruminal contiene un gran número de microorganismos, bacterias, hongos y archaeas, la interacción entre estas comunidades resulta ser compleja, ya que de esto depende la degradación del alimento y el suplir de nutrientes al animal. Parte de lo que se conoce sobre los microorganismos ruminales ha sido gracias a métodos dependientes de cultivo. El aislamiento de dichos microorganismos ha sido reportado desde 1912 [46] con la utilización del método de Lentz, a partir de esta fecha una de las metodologías más importantes y descritas ha sido la técnica del roll tube desarrollado por Hungate [47], esta técnica se ha convertido en el gold estándar para la recuperación de microorganismos anaerobios, la cual consiste en la preparación de un medio sólido reducido en oxígeno y depositado en tubos Hungate, la técnica genera una capa fina de medio de cultivo suficiente para el crecimiento de colonias que pueden repicarse posteriormente. Sin embargo, esta no ha sido la única técnica utilizada, también se ha reportado metodologías que incluyen uso de diluciones y utilización de medios que incluyan fluido ruminal como fuente de carbono [11], [48], [49]; otras técnicas han optado por realizar aislamientos mediante incubación in-situ [50]. A pesar de ello, estas técnicas son limitadas pues los requerimientos de cultivo no abarcan a todos los microorganismos, se estima que solo un 10-20 % de la población ruminal es cultivable por las técnicas tradicionales [51]. Numerosos esfuerzos han sido realizados para el aislamiento de microorganismos ruminales, según Zehavi, al 2018 solo el 3.6 % (61/ 1,698 OTUs) de los OTUs reportados por secuenciación, cuentan con representantes cultivados, según la base RDP, y solo 117 especies bacterianas del rumen se encuentran en las diferentes colecciones de cultivo de referencia, estos cultivos no representan la composición filogenética del rumen [44]. Estudios como el de Nakamura, Nyonyo, Kenters, Das Chandra y Zehavi [11], [44], [52]–[54] dan cuenta de la posibilidad de aislar bacterias comunes y nuevas del rumen bajo estrategias de cultivo microbiológicas tradicionales, así como el empleo de otras variables

que ejercen selección sobre la comunidad (dilución seriada, medios enriquecidos, agentes gelificantes, entre otros).

### *1.3.2 Métodos independientes de cultivo.*

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y juegan un papel importante en procesos de regulación en diferentes ecosistemas, sin embargo, se estima que el 99% de los microorganismos no son cultivables utilizando técnicas tradicionales de cultivo [55]. Esta dificultad es generada por la incapacidad de recrear las condiciones ambientales, fisiológicas, metabólicas y las relaciones entre comunidades de microorganismos [56], [57]. Como parte de la solución, la aplicación de métodos moleculares ha permitido enumerar y caracterizar comunidades microbianas antes desconocidas, que en el caso de la microbiota asociada a hospederos se ha determinado que para ampliar el conocimiento sobre las interacciones microbianas es necesario el aislamiento de estos o de la comunidad.

En la actualidad se conoce el papel fundamental que tienen los microorganismos en el ambiente, su presencia es ubicua y se encuentran en todos los ecosistemas descritos, sin embargo, se sabe que un gran porcentaje de ellos no han sido cultivados por las metodologías tradicionales de cultivo, por esto una de las formas más rápidas de establecer tanto la diversidad de especies en el rumen ha sido la biología molecular basados en la secuenciación de los genes 16s/18s rARN/rDNA e ITS [58], [59], en librerías genómicas y sus respectivos análisis metagenómicos (OTUs); actualmente se han realizado estudios de diversidad microbiana mediante técnicas como single cell genomics, metaproteómica y SARST [60]–[62]

### **1.4. Potencial de bioprospección**

El ecosistema ruminal se ha definido como un quimiostato capaz de mantener múltiples procesos microbianos y diferentes reacciones bioquímicas al tiempo, debido a sus características es un ecosistema aun con un porcentaje inexplorado, se ha dicho que la comunidad microbiana ruminal presenta un recurso potencial de enzimas hidrolíticas únicas capaces de optimizar los procesos al interior [63]. Parte de la dieta principal de los rumiantes está constituida de material vegetal compuesta por celulosa, hemicelulosa, ligninas, xilan, oligómeros de xilan, almidón, amilopectina, amilosa, cutinas entre otros, los cuales deben ser degradados mediante la utilización de enzimas proveídas por las bacterias y hongos anaerobios, como las enzimas fibrolíticas, amilolíticas, hemicelulasas, xilasas, xilanasas, arabinofuranosidas, celuladas, glucanohidrolasas, glucosidas, endoglucanadas, amilasas, estereras y cutinasas [32]. Diversos estudios en metagenómica se han enfocado en la búsqueda de estas enzimas que puedan responder a las necesidades de la industria sin necesidad de aislar microorganismos. Ferrer et al., 2005 [32] identificaron actividades hidrolíticas específicas de tipo estereras, endo- $\beta$ 1,4-glucanasas y ciclodextrinasas en 22 clones utilizando el vector de fago lambda. El 36% de estas enzimas fueron catalogadas como nuevas al no estar relacionadas con ningún microorganismo cercano, dichas enzimas no solo sugieren la aplicación biotecnológica en biocatálisis, sino también nuevas estructuras



proteicas y mecanismos catalíticos; estas nuevas enzimas podrían estar relacionadas a aquellos microorganismos no cultivables y sin asignación taxonómica en el rumen. Por otra parte, Duque et al., 2018 [64], reportaron la utilización de clones en fosmidos con actividad endoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasa con baja similitud con la familia de las glicosil hidrolasas (GH), estas enzimas fueron secuenciadas, clonadas, expresadas y purificadas en *E. coli* BL21, alcanzando actividades 10 veces más que la actividad de productos comerciales. El uso de este tipo de enzimas hidrolíticas se encuentra en sectores industriales como la bioenergía, producción de bioetanol, industria de detergentes y papel. Recientemente Quartinello et al., 2021 [62] demostraron la habilidad de bacterias y hongos ruminales en degradar tres tipos de poliésteres sintéticos (PET, PBAT, PEF), utilizando enzimas de tipo esterases, lipasas, cutinasas y proteasas, con una actividad más alta en comparación con otros estudios de enzimas purificadas o sobrenadantes de microorganismos puros, la degradación puede estar influenciada no por un solo tipo de enzima sino por la acción sinérgica entre estas; a diferencia de los estudios de Ferrer y Duque, Quartinello sugiere la importancia en la identificación y cultivabilidad de los microorganismos responsables de la actividad, por los cambios que pueden existir en la comunidad durante la incubación con los poliésteres. No obstante, la bioprospección no solo se ha basado en la búsqueda de nuevas enzimas hidrolíticas de compuestos, también se han realizado búsquedas de moléculas capaces de inhibir microorganismos. Dentro de la comunidad ruminal, existen interacciones de competencia, cuando estas competencias se dan, las bacterias regulan la producción de genes codificantes de péptidos antimicrobianos (AMPs) con el fin de inhibir el crecimiento de otra población, estas moléculas son de amplio espectro capaces de inhibir bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con una acción rápida que afecta la pared citoplasmática, lo que contribuye a la disminución en la tasa de resistencia de microorganismos patógenos, a pesar de la baja cultivabilidad las herramientas metagenómicas han permitido la caracterización de nuevas moléculas [64]. Mantovani et al., 2002 [60] caracterizaron la Bovicina HC5, una bacteriocina aislada de *Streptococcus bovis* capaz de inhibir cepas susceptibles y resistentes a la nisina, así como bacterias Gram-positivas. Oyama et al., 2017 [64] identificaron 181 moléculas potenciales de AMPs en el metagenoma ruminal, de los cuales tres (Lynronne-1, Lynronne-2 and Lynronne-3) mostraron ser eficaces contra numerosos patógenos bacterianos, incluyendo a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Además de identificar la Buwchitina un AMP identificada, clonada y expresada y purificada a partir de un metagenoma bacteriano ruminal capaz de inhibir a *Enterococcus faecalis* [65].

### **1.5. Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA-AGROSAVIA)**

AGROSAVIA es la Corporación colombiana de investigación agropecuaria, una entidad pública descentralizada de participación mixta y que forma parte del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia. Dentro de la estructura de la corporación se encuentra desde 1994 el Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación

Colombiana, destinados para la conservación de la diversidad genética de diferentes especies de interés agropecuario [58]. La Colección de Microorganismos con Interés en Nutrición Animal (CMINA) fundada en 1996 hace parte de uno de los subsistemas de Bancos, la cual se ha encargado de aislar microorganismos anaerobios tanto bacterias y hongos de ambientes ruminales (BAR y HAR) y de sistemas gástricos de diferentes animales como: bovinos criollos, chigüiro, danta y agutí. También, de aislar bacterias ácido-lácticas (BAL) a partir de ensilajes de avena y maíz del altiplano cundiboyacense. La intención de aislar estos dos grupos de microorganismos de ambientes diferentes se centra en la necesidad de caracterizar y conservar el microbioma de diversos hospederos bajo las condiciones del territorio, además de buscar características de preservación de ensilajes para la nutrición animal. Como resultado de 26 años de actividades de la colección, actualmente se conserva un total de 162 accesiones entre bacterias y hongos anaerobios ruminales y bacterias ácido lácticas, con géneros bacterianos representativos como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Paenibacillus*, *Pediococcus*, *Ruminococcus* y *Streptococcus*. Fruto de los esfuerzos por aislar y conservar estos microorganismos, se tiene actualmente, un bioproducto denominado RUMITEC<sup>®</sup>, un probiótico para terneros en etapa de iniciación, elaborado a base de tres bacterias anaerobias ruminales, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Streptococcus bovis*. Todas las accesiones de la colección yacen conservadas en dos sistemas, congelación (-80 °C) y ultracongelación por nitrógeno líquido (-196 °C), actualmente accesiones del grupo de BAL también se conservan mediante liofilización. Todos los microorganismos contenidos en esta colección son nativos y han sido colectados en el país, ellos representan una riqueza genética de la diversidad microbiana colombiana.

## 2. Definición del Problema y Justificación

El ecosistema ruminal alberga una amplia diversidad de microorganismos, muchos de ellos coexistiendo de manera sinérgica mediante la transformación y asimilación de nutrientes a partir de la degradación de material vegetal ingerido por el animal. Un desequilibrio en la funcionalidad de este ecosistema repercute directamente en el detrimento de la salud y la productividad del animal. La complejidad del ecosistema ruminal está determinada principalmente por las condiciones anóxicas (estrictas) con presencia de diversos gases (entre ellos, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>), la temperatura ligeramente termófila (40°C) y la abundante presencia de ácidos grasos volátiles. Características como estas hacen que estudiar el microbioma ruminal sea relevante desde el punto de vista de la nutrición animal, ya que la degradación del material vegetal depende de las dinámicas de las comunidades microbianas presentes a lo largo del proceso. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos (bacterias, archaeas y hongos) no han podido cultivarse mediante las técnicas tradicionales usadas en microbiología. En la actualidad las estrategias y metodologías de cultivo empleadas para la recuperación de microorganismos se ve limitada por la baja tasa de recuperación y viabilidad de los aislamientos. Tal situación exige el desarrollo de nuevas estrategias de cultivo y aislamiento, con técnicas y métodos diferentes, que sean capaces de suplir los requerimientos que necesitan dichos microorganismos para crecer en cultivo puro o consorcio en el laboratorio. Vale la pena destacar que el uso de la biología molecular como herramienta tanto de identificación como de caracterización funcional dentro del campo de la bioprospección ha permitido identificar taxones microbianos que no han sido cultivados hasta el momento, y de forma paralela, explorar el potencial de prospección de tales comunidades debido a la descripción de genes, rutas metabólicas o enzimas asociadas a procesos que pueden ser útiles en el campo de la biotecnología. CMINA, es la primera y única colección constituida y reportada a nivel nacional en poseer microorganismos anaerobios aislados de ambientes ruminales y gástricos, además de contar con el Registro Nacional de Colecciones biológicas (RNC) (<http://rnc.humboldt.org.co/admin/index.php/registros/detail/2040>) y el registro en el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia SiB Colombia) [67]. En CMINA, las metodologías empleadas en la recuperación de las BAR han sido las mismas durante toda su trayectoria, empleando medios con alto contenido de carbohidratos simples en mezcla con ácidos grasos volátiles y/o fluido ruminal para fomentar el desarrollo y recuperación de estos. Sin embargo, su extensa utilización ha derivado en la recuperación redundante de microorganismos, limitando las posibilidades de aumentar la diversidad y caracterizar otras poblaciones importantes en el ambiente ruminal. Hasta la fecha anterior a la ejecución de este trabajo, la colección no contaba con trabajos de investigación enfocados en otras estrategias de cultivo que permitiera solventar la redundancia mencionada anteriormente, así como tampoco de aumentar el conocimiento en técnicas independientes de cultivo. Por ende, este trabajo es relevante no solo para la colección sino para el país, al permitir describir el ecosistema ruminal de bovinos a través de una metodología alternativa, basada en la exploración de medios de cultivo con variables como extinción de muestra por dilución y

tiempo de incubación, en conjunto con la exploración de metataxonomía como herramienta de discriminación de comunidades a nivel molecular. Permitiendo el aislamiento de nuevas especies para la colección, además de poder ahondar en una de sus múltiples capacidades como lo son las interacciones antagónicas con los aislados resultantes. Finalmente, y sin desconocer la dificultad que representa el aislamiento de bacterias anaerobias ruminales, la estrategia también contempla la reconstrucción de genomas de microorganismos que no son posibles de aislar bajo las técnicas anaeróbicas comúnmente utilizadas, el conocimiento que se desprende de esta reconstrucción aumenta la información de las capacidades metabólicas que pueden dar a lugar a la captura de estos bajo condiciones específicas. Se contempla que lo expuesto anteriormente y los resultados obtenidos proporcionen conocimiento a un campo que actualmente permanecía inexplorado en el país, y que puedan dar paso al abordar temas como la manipulación de la microbiota ruminal con fines de mejorar la productividad ganadera, gracias a la posibilidad de caracterizarlos de forma *in-vitro*. Con el anterior preámbulo, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿De qué manera se puede mejorar el aislamiento de microorganismos ruminales mediante nuevas estrategias de cultivo?

### 3. Estado del arte

En Colombia, la ganadería juega un papel económico muy relevante, ya que representa una participación estimada en el PIB Nacional de casi un 6,74%. Dentro del sector agropecuario, su participación es de un 28,9% del PIB agropecuario y del 48,7% del PIB pecuario, lo que impacta la economía rural colombiana en gran nivel. Actualmente el país cuenta con 23 millones de cabezas de bovinos de diferentes razas donde el 72% corresponde a ganado *Bos Indicus* (Cebuinos), el 15% a *Bos Taurus* (razas europeas) y el 13% a razas criollas y sus cruces (BON-Blanco Oreji Negro, Romosinuano, Chino santandereano, Costeño con cuernos, Sanmartinero, Casanareño, entre otros). Su distribución geográfica está determinada por sus propias características genéticas y se distribuyen entre el trópico bajo y el trópico alto [68]. Sorprendentemente, se conoce muy poco sobre la diversidad genética microbiana que existe en nuestro ganado; sin embargo, aproximaciones como la realizadas por Hernandez et al., 2021 [69] muestra que mediante un fraccionamiento celular de acuerdo con el tamaño de la población microbiana y la posterior amplificación y secuenciación masiva del gen 16s rRNA de las fracciones, sólo tres géneros bacterianos son dominantes. Adicionalmente, la mayoría de las comunidades dentro de estas fracciones poseen una baja resolución para ser identificados hasta nivel de género, siendo determinadas sólo a nivel de filo. La microbiota ruminal está constituida por un complejo de comunidades microbianas anaerobias de bacterias, archaeas, hongos y protozoarios, junto a los virus. Dentro del grupo de bacterias se han establecido taxa dominantes de los géneros *Butyrivibrio*, *Prevotella* y *Ruminococcus* principalmente; y se estima que, de la población ruminal total, la población bacteriana alcanza la densidad de  $10^{10}$  -  $10^{11}$  bacterias/mL siendo equivalente a un rango de 40 a 90 % de la masa microbiana [70], [71]. Se estima que cerca del 15-20 % de la microbiota ruminal ha sido caracterizado bajo técnicas microbiológicas de cultivo clásicas, el bajo porcentaje de recuperación refleja la carencia de metodologías de aislamiento efectivas. Diversos estudios se han enfocado en determinar las capacidades catabólicas de bacterias y hongos ruminales, agrupándolos ampliamente en degradadores de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, pectina, entre otros), proteolíticos y lipolíticos, donde su abundancia y diversidad están relacionadas con la dieta del animal. La productividad bovina en carne y leche depende de los procesos de fermentación que ocurren dentro del animal, debido a que éstos no producen enzimas que degradan la fibra del material vegetal. Por lo tanto, los animales dependen de la acción de los microorganismos ruminales. Actualmente no se tiene claro cuántas especies bacterianas hacen parte de la microbiota ruminal, aun cuando técnicas moleculares como la asignación de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) han permitido determinar su clasificación aproximada, otro número de OTUs permanece sin identificación, junto con la descripción de su funcionalidad. En el estudio de Kim, Morrison, & 2011a [70], se concluye que es necesario tener un mínimo de más de setenta mil secuencias de bacterias para lograr un 99 % de cobertura a nivel de especie de acuerdo con el número de secuencias encontradas en su estudio, siendo de 13,478 filotipos clasificados usando ARN ribosomal (ARNr). Recientemente se realizó el ensamblaje de 913 genomas de metagenomas albergados en

bases de datos de rumen, dichos ensamblajes constituyen una fuente de mejora para la caracterización taxonómica del microbioma ruminal; sin embargo, cabe destacar que la correlación de los cambios que ocurren en el metagenoma del microbioma de los diferentes animales rumiantes y de cómo estos pueden ser utilizados sigue siendo poco explorado [72]; albergando un gran potencial en bioprospección para nuevas moléculas y funciones de interés. La carencia de investigaciones asociadas a la ecología microbiana ruminal en Colombia hace que la apuesta de explorar la diversidad microbiana en nuestras razas adquiera un gran potencial para la generación de nuevo conocimiento con mucho impacto a nivel nacional. Hasta el momento proyectos como el de Hernandez et al., 2021 [69], [73] han dado los primeros pasos en dar a conocer dicha diversidad. Dentro de las posibles líneas de investigación, la identificación, el aislamiento y la caracterización de nuevas moléculas con potencial antimicrobiano apunta a resolver las amenazas emergentes como el aumento de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos que causan enfermedades en el ganado vacuno. Un objetivo alcanzable dentro de esta perspectiva de investigación es la posible identificación de compuestos antimicrobianos producidos por la microbiota y el aislamiento de los microorganismos responsables de la producción de estos. Estudiar la diversidad microbiana ruminal de bovinos mediante otras estrategias microbiológicas de aislamiento en bovinos permitirá establecer una estrategia capaz de recuperar y aislar parte de los microorganismos presentes, además de contribuir a la generación de conocimiento tanto en el país como en la comunidad científica.

## **4. Hipótesis y Objetivos**

### **4.1. Justificación**

Las metodologías utilizadas actualmente en Colombia para el aislamiento de microorganismos ruminales recuperan una baja diversidad con una alta redundancia. Limitando las aplicaciones biotecnológicas y bioprospectivas para el desarrollo de tecnologías que mejoren la productividad y la salud animal y del ambiente.

#### **4.1.1 Objetivo General**

Evaluar estrategias de cultivo microbiológico alternativas para mejorar el aislamiento de microorganismos ruminales presentes en bovinos.

### **4.2. Hipótesis específicas**

- 1) El uso de estrategias de cultivo alternativas influenciará en el enriquecimiento de microorganismos ruminales.
- 2) La selección de una estrategia de cultivo alternativa permitirá el aislamiento y caracterización de poblaciones ruminales poco caracterizadas.
- 3) Alguno de los microorganismos ruminales aislados presentará un potencial antimicrobiano contra patógenos de relevancia en ganadería.

#### **4.2.1 Objetivos específicos**

1. Seleccionar una estrategia de cultivo que permita el enriquecimiento de microorganismos ruminales poco caracterizados.
2. Determinar el potencial de aislamiento de la estrategia de cultivo seleccionada por su capacidad de enriquecimiento de poblaciones de interés
3. Determinar el potencial antimicrobiano de los microorganismos recuperados contra patógenos de relevancia en ganadería
4. Describir el metabolismo ruminal de poblaciones de interés mediante una reconstrucción metagenómica (Shotgun).

## Capítulo I

### EVALUACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO MULTIVARIABLE PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS RUMINALES

Asociado al objetivo: Seleccionar una estrategia de cultivo que permita el enriquecimiento de microorganismos ruminales poco caracterizados.

#### Resumen

La microbiota ruminal está estructurada por relaciones sintróficas complejas, que permiten la degradación de los azúcares estructurales. Estas interacciones hacen del contenido ruminal un ambiente complejo y altamente diverso. Debido a esta alta diversidad y complejidad funcional, una gran proporción de esta comunidad no ha sido aislada aún, siendo necesario y fundamental el desarrollo de estrategias de cultivo que permitan continuar la caracterización funcional de este sistema. Este capítulo presenta los resultados de los esfuerzos de evaluación de nuevas estrategias de cultivo, que usan la secuenciación del marcador molecular 16S ARNr, para establecer con menor sesgo la capacidad de los medios de recuperar una parte de la comunidad bacteriana del rumen. Con esta estrategia se evaluaron ocho medios de cultivo usados en la recuperación de bacterias anaeróbicas. Para cada medio se evaluaron tres diluciones del contenido ruminal ( $10^{-2}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$ ) y dos tiempos de incubación (48 y 72 h), y cada uno de estos tratamientos se realizó por triplicado. La diversidad bacteriana recuperada por cada tratamiento se evaluó de forma independiente de cultivo, mediante, la extracción de ADN de los medios líquidos, preparación de librerías de amplicones del gen 16S rRNA y secuenciación de Illumina. También se prepararon librerías de contenido ruminal como referencia para la comparación con los medios de cultivo. La evaluación de los medios de cultivo muestra, como es de esperarse, una recuperación de sólo una fracción de la comunidad microbiana. Una de las tendencias más contrastantes es la proporción Bacteroides:Firmicutes, que en el rumen se encuentra alrededor de 70:20, mientras que en los medios de cultivo se encuentran en promedio en un 10:80. Las diferencias entre el rumen y los medios de cultivo también son evidentes en grupos como las Actinobacterias y Proteobacteria, los cuales son observadas en porcentaje más alto en los medios de cultivo. Los análisis multivariados (PCoA) realizados para establecer patrones de ordenamiento entre las comunidades bacterianas para cada medio, indican que de los parámetros evaluados la dilución tiene el mayor efecto sobre la composición de las comunidades bacterianas seleccionadas, donde la composición de la dilución  $10^{-12}$  presenta la mayor diferencia, con un menor índice de riqueza y una mayor distancia con respecto al rumen. creando una mayor selectividad del medio. Por otra parte, los medios son capaces de recuperar poblaciones descritas por su importancia ruminal como, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Sharpea*, *Streptococcus* y *Succinivibrio*, así como fracciones de microorganismos menos abundantes y poco caracterizados tales como *Anerovibrio*, *Acidaminococcus*, *Olsenella*, *Shuttleworthia*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroidales*, *Enterobacteriaceae*, teniendo en cuenta esto y con el fin de favorecer la reproducibilidad del medio por su composición y elaboración, dos medios de cultivo fueron seleccionados para el aislamiento de la población cultivable para el capítulo 2.



## **5. Metodología**

### **5.1 Muestreo**

Para la realización del presente trabajo se utilizó un bovino macho fistulado de raza Holstein con edad de tres años, perteneciente a AGROSAVIA C.I, sede Tibaitatá. El uso del animal contó con el aval del comité de AGROSAVIA de acuerdo con “Formato para Uso de Animales” (AGROSAVIA) y a la ley 84 de 1989 del Congreso de la República. El muestreo se llevó a cabo asegurando el bienestar del animal, según la normativa interna de la corporación y la legislación colombiana anteriormente mencionada.

#### *5.1.1 Preparación del Animal*

El animal se sometió a una dieta continua de forraje y agua durante una semana; posteriormente se indujo a una condición de ayuno durante 16 horas, cumplido el tiempo se dejó alimentar al animal durante la hora siguiente, pasada la hora de alimentación se tomaron tres muestras consideradas como réplicas biológicas a través de una fístula colectando fluido ruminal en tubos falcon previamente gasificados con mezcla de CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (80:20), llenando los tubos hasta el tope. Luego, el fluido fue inoculado en tubos con medio de dilución anaerobios (150mL L<sup>-1</sup> Sal I, 150mL L<sup>-1</sup> Sal II, 6 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 1 mL L<sup>-1</sup> Resazurina 0.1 %, 1g L<sup>-1</sup> HCl-Cisteína [49], las condiciones anaerobias fueron mantenidas utilizando un Atmosbag glove bag (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) con atmósfera de CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (80:20); una vez inoculados fueron depositados en termos que garantizaran la temperatura constante de 40 °C manteniendo las condiciones ruminales anaerobias hasta ser procesadas en el laboratorio. El fluido colectado fue conservado como contramuestra por congelación a -20 °C con solución de glicerol anaerobio al 15 % como crioprotectante.

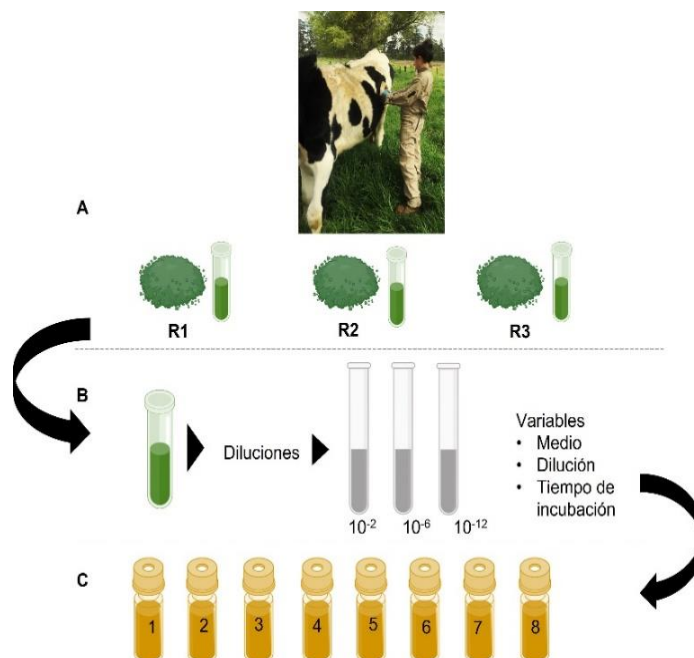
### **5.2 Medios de cultivo de bacterias ruminales**

Para el cultivo de microorganismos ruminales se prepararon tubos de 10 mL de ocho medios referenciados a continuación: Medio E para Anaerobios (ER), medio Agar Anaerobio (CAN) [74], medio glucosa/celobiosa (GC) [49], medio Goodman (GOOD) [75], medio Kenters (KNT) [11], medio Nyonyo (NYO) [53], medio kikuyo (KYO) y medio trébol rojo (TRB); estos dos últimos diseñados por el grupo de laboratorio (Material Suplementario S1).

### **5.3 Enriquecimiento de microorganismos ruminales**

Las muestras de fluido ruminal colectadas fueron diluidas en serie hasta alcanzar la dilución 10<sup>-12</sup>; del set de diluciones se seleccionaron las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-12</sup> para ser utilizadas como inóculo. Se establecieron los tiempos de 3 días y 7 días como tiempos de incubación para cada uno de los medios y cada una de las diluciones. A partir de las diluciones

mencionadas anteriormente se tomó 1 mL para ser inoculado en todos los tratamientos resultantes (Figura 5.1) Los medios fueron incubados a temperatura de 39 °C, sin agitación.



**Figura 5.1.** Diseño del muestreo experimental. La figura muestra las tres etapas del diseño. A: Colecta de tres réplicas biológicas de fluido ruminal; B: Elaboración de diluciones a partir la muestra y selección de las diluciones a evaluar ( $10^{-2}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-12}$ ); C: Inoculación de las diluciones seleccionadas en los ocho medios de cultivo (1: CAN, 2: ER, 3: GC, 4: GOOD, 5: KNT, 6: KYO, 7: NYO, 8: TRB) bajo las variables descritas. Este procedimiento fue utilizado para cada una de las réplicas biológicas.

#### 5.4 Procesamiento de la muestra para análisis de amplicones.

Posterior al tiempo de incubación se concentraron las células por centrifugación a 10000 g por 10 min a 4 °C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 2 mL de solución salina estéril al 0.85 %, dicho volumen se dispensó en partes iguales en crioviales, dejando uno de ellos como contramuestra. La extracción de ADN fue realizada por el método de fenol: cloroformo (Material Suplementario S2). Se verificó calidad y concentración del ADN obtenido mediante gel de agarosa al 1.5 % y cuantificación en NanoDrop ratios 260/230, 260/280. Teniendo en cuenta la concentración de los ADNs obtenidos, se realizaron ajustes de concentración a 20 ug/uL utilizando agua ultrapura estéril.

#### 5.4.1 Amplificación del marcador molecular gen 16s rRNA.

Se realizó la amplificación de la región V3-V4 del 16S rRNA utilizando el set de primers 515F-806R (515F-5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'; 806R- 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') con una secuencia adaptadora en la región 5' (Listado de adaptadores en Material Suplementario S1.1). Posteriormente se usaron primers barcoding con secuencia de 10 bp complementaria a la adaptadora, generando un amplicon con un barcode diferente en cada muestra [76].

#### 5.4.2 Preparación de librería de amplicones 16s rRNA

La preparación de las librerías requiere de dos amplificaciones por PCR, donde se hace primero la amplificación de los marcadores moleculares y luego se hace la adición del “barcode” mediante dos PCRs consecutivas. La primera reacción de PCR se realizó por triplicado para cada muestra, la reacción contenía 0.1 µl de Taq Platinum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE. UU.), 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2.5 Buffer-Mg 10X, 0.5 µl dNTPs 10 mM, 0.5 µl (10 µM) de cada uno de los cebadores, 2 µl DNA y 18.15 µl de agua destilada ultrapura (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE. UU.), bajo las siguientes condiciones: 1) 94 °C por 3 minutos, 2) 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 60 segundos, y 72 °C por 90 segundos, y 3) una extensión final a 72 °C por 10 min. Las amplificaciones se verificaron en geles de agarosa al 1.5 %, los triplicados fueron purificados con AMPure XP beads (BeckMan Coulter, IN, EE. UU.) y combinados en una sola muestra. Posteriormente se realizó la segunda PCR con el producto combinado y purificado de la primera reacción, utilizando para la segunda reacción de amplificación se usaron los primers de barcoding (1 µl), 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2.5 µL Buffer-Mg 10X, 0.5 µl dNTPs 10 mM, 5 µl DNA y 14.15 µl de agua destilada ultrapura (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE. UU.). El producto final de PCR se purificó de nuevo con AMPure XP beads (BeckMan Coulter, IN, EE. UU.) y se verificó la calidad del producto en gel de agarosa al 1.5 %.

Para la determinación del volumen de producto purificado que debe usarse en la combinación de la librería, se utilizó la siguiente fórmula:

$$= \frac{\text{Promedio de concentración de los productos} * (1 * 10^6)}{(649 * \text{Tamaño del fragmento esperado})}$$

Las librerías se ajustaron en la concentración requerida para la secuenciación en el sistema MiSeq de la plataforma Illumina ® Las librerías se combinaron a igual concentración y se secuenciaron bidireccionalmente en un arreglo de 2 x 350 bp con el equipo MiSEQ (Illumina). La calidad de las librerías se determinó utilizando Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE. UU) [77]. Las muestras fueron procesadas en Bogotá, Colombia. Laboratorio Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA), Universidad el Bosque.

## 5.5 Análisis de Datos

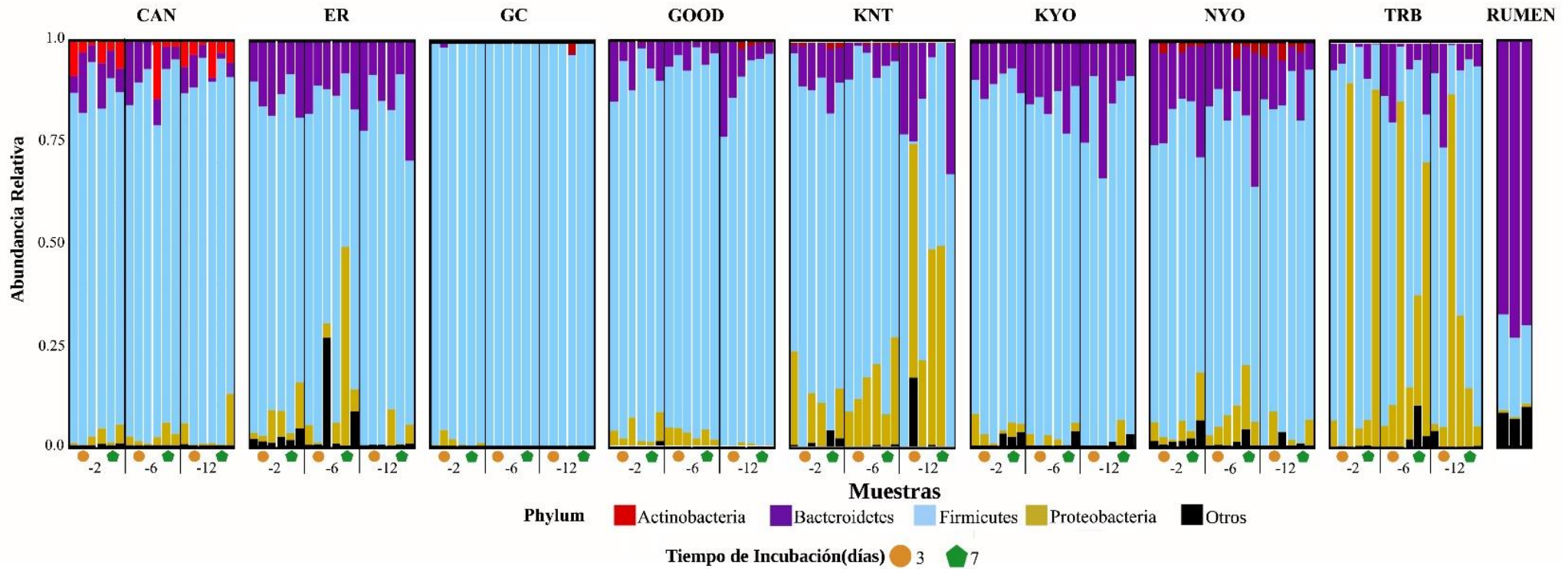
Los análisis para las muestras secuenciadas fueron realizados en el programa Qiime2 (versión 2019.7) [78], el proceso contempló las siguientes etapas; etapa inicial: Demultiplexación cada una de las muestras según la combinación de barcodes, permitiendo identificar cada una de las muestras y conocer el número de lecturas asociadas a cada muestra, así como la calidad de las secuencias crudas; etapa dos: Control de calidad mediante el comando DADA2, permitiendo filtrar secuencias, eliminar secuencias quiméricas y establecer los parámetros de *trim* y *trunc* permitiendo conservar las secuencias con alta calidad; etapa tres: determinación de los índices de alfa y beta diversidad y su visualización mediante análisis de coordenadas principales (PCoA) para beta diversidad; etapa final: Análisis taxonómico de las muestras y asignación de OTUS (Unidades Taxonómicas Operacionales) utilizando como clasificador de referencia, la base de datos de 16s rRNA Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>), se utilizó el porcentaje de 97 % como parámetro mínimo de similitud para la asignación taxonómica. Los análisis de alfa y beta diversidad, así como los análisis taxonómicos de abundancia relativa se realizaron en RStudio (v.3.5.3), utilizando el paquete Qiime2R, se utilizó PERMANOVA (999 permutaciones) para la determinación de significancia de la beta diversidad entre comunidades (*p-value*: <0.05), para cada variable (medio, dilución y tiempo). Las distribuciones de las distancias obtenidas en la beta diversidad se determinaron con la métrica UniFrac utilizando PAST (v.3.24).

## 5.6 Resultados y discusión

### 5.6.1. Caracterización taxonómica de la diversidad bacteriana presente en los medios de cultivo y el fluido ruminal

Un total de 147 muestras, 48 tratamientos de 3 réplicas biológicas de fluido ruminal y 3 muestras de fluido (Tabla S2.1 Material Suplementario), fueron secuenciadas y analizadas, obteniendo un promedio de 39538 lecturas por muestra con una longitud de 272 pb. Las lecturas fueron clasificadas en 3764 OTUS asignados a 14 filos (Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Lentisphaerae, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes y Verrucomicrobia).

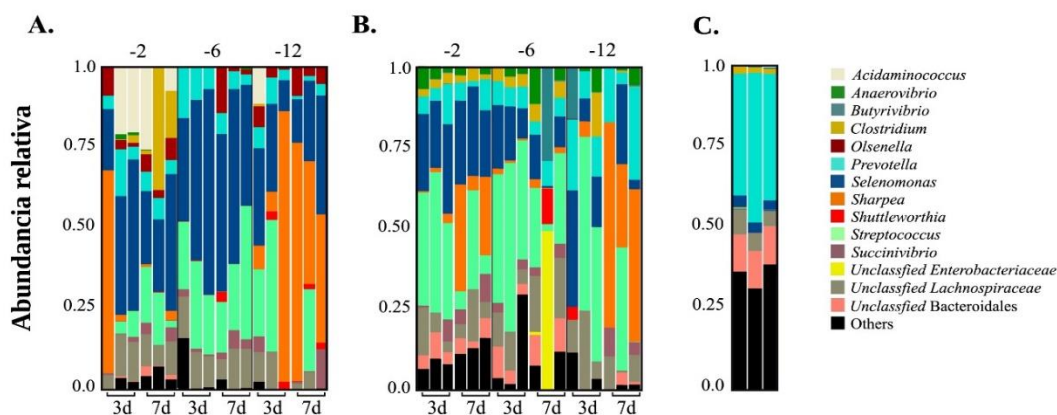
De acuerdo con la caracterización taxonómica del fluido ruminal en comparación con los medios de cultivo, se observa a nivel de filo (Figura 5.2) con una abundancia relativa superior al 1%, la dominancia por Bacteroidetes con un 72 %, seguido por Firmicutes con un 20 % y un 8 % del grupo de “Otros” donde se agrupan aquellos filos con una abundancia inferior al 1 %. Esto contrasta con la distribución observada en los medios de cultivo, siendo de Firmicutes (79 %), Bacteroidetes (11 %), Proteobacteria (8%), en último lugar Actinobacteria (1%), y la clasificación “Otros” (1%). Para la mayoría de los medios se observa la presencia de los filos Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria no obstante cada uno de los medios presenta una distribución diferente de los filos mencionados. Las Actinobacterias se encuentran enriquecidas en los medios CAN, GOOD, KNT y NYO, mientras que el filo de Proteobacterias se enriquece de manera abundante en los medios ER, KNT y TRB, también se destaca la selectividad del filo Firmicutes en el medio GC y la abundancia de otros filos no abundantes de “Otros” en los medios ER y KNT. Esta distribución taxonómica muestra que los medios de cultivo utilizados en este ensayo no reflejan la composición del contenido ruminal, siendo los Firmicutes el filo con mayor abundancia y probabilidad de ser recuperado [79].



**Figura 5.2.** Abundancia relativa de los filos más abundantes para cada uno de los tratamientos y el rumen. En la parte inferior se observan los tratamientos correspondientes a: (i) Diluciones: -2 ( $10^{-2}$ ), -6 ( $10^{-6}$ ) y -12 ( $10^{-12}$ ); y (ii) Tiempos de incubación: 3 días (circulo naranja) y 7 días (pentágono verde) de incubación.

La distribución taxonómica a nivel de género en el fluido ruminal (Sección C, en Figura 5.3-5.6) está dominada por *Prevotella* (Bacteroidetes) con un 50 %, seguido del grupo de “Otros” con 30 % lo que corresponde a un número elevado de OTUs con clasificaciones fuera del nivel de género, como familia, orden y clase. La abundancia de *Prevotella* en el fluido ruminal, ha sido reportada en animales con dietas tanto de forraje como de ensilaje de maíz, en fase líquida y sólida del rumen, con abundancias del filo Bacteroidetes en un 33% [80][81]. El alto porcentaje de OTUS con abundancias menores a 1 % se relaciona con microorganismos que no se han descrito y/o caracterizado generando clasificaciones que agrupan más de un microorganismo como familia u orden, lo cual soporta la idea de que el rumen es un ecosistema que comprende una población bacteriana altamente diversa [68]. Al observar los géneros que componen los filos más abundantes en los medios (Figura 5.3 - 5.6), se destacan 11 géneros con una abundancia superior al 1% correspondientes a: *Acidaminococcus*, *Anaerovibrio*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Olsenella*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Sharpea*, *Shuttleworthia*, *Streptococcus* y *Succinivibrio*, además de 2 familias y 1 orden identificados como *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* y Bacteroidales respectivamente.

En el medio CAN se observa a *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* y la familia *Lachnospiraceae* como parte de la abundancia relativa dominante (Figura 5.3A), la cual fluctúa entre las diluciones, aumentando de la dilución  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  y disminuyendo en la dilución más alta. Los géneros *Acidaminococcus*, *Clostridium*, *Olsenella* y *Succinivibrio*, muestran una alta variación en la abundancia siendo mayor en la dilución  $10^{-2}$  y disminuyendo al aumentar la dilución, esto no se observa con *Sharpea* quien aumenta en  $10^{-12}$ . El medio CAN es un medio rico en fuentes nitrogenadas, las cuales compone el 80 % del medio, seguido de una única fuente de carbono (i.e., glucosa) y dos tipos de sales, este medio carece de fluido ruminal o ácidos grasos volátiles (AGVs), pudiendo considerarse como parte fundamental para la recuperación de microorganismos ruminales [11], [53], [75].

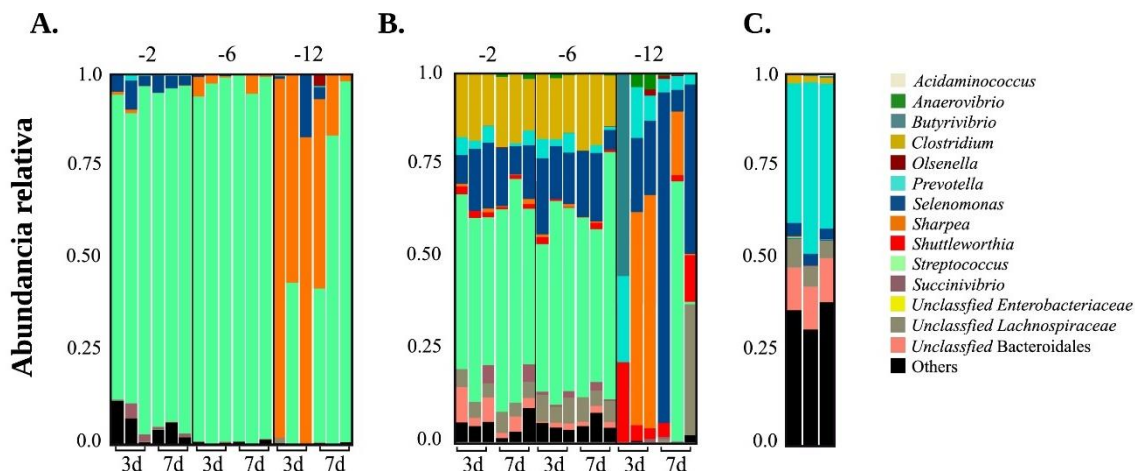


**Figura 5.3.** Abundancia relativa de la diversidad de los medios CAN (A) y ER (B) a nivel de género

Para el medio ER (Figura 5.3B) se observa la dominancia de los géneros *Prevotella*, *Selenomonas*, *Sharpea*, *Streptococcus*, el Orden Bacteroidales y la familia *Lachnospiraceae*, manteniéndose presentes en las diluciones evaluadas; no obstante, su abundancia fluctúa de una dilución a otra. A diferencia del medio CAN, *Anaerovibrio*, *Clostridium* se encuentran presentes en la mayoría de los tratamientos, aunque en baja abundancia, mientras que el grupo “*Otros*” se observa en una mayor proporción. En cuanto a la dilución  $10^{-12}$  existe una disminución de los grupos mencionados con anterioridad a excepción de *Prevotella*, *Streptococcus* y *Sharpea* el cual aumenta en 7 días de incubación cuando *Streptococcus* se encuentra disminuido. El medio ER, a diferencia del medio CAN está compuesto de tres fuentes de carbono (glucosa, maltosa y almidón soluble), una solución de varias sales y fluido ruminal filtrado; esta diferencia en composición puede tener un efecto en el enriquecimiento de otros OTUS en baja abundancia del grupo de “*Otros*”. Los medios CAN y ER son medios descritos para la recuperación de microorganismos anaerobios y anaerobios ruminales [74] aunque su capacidad de aislamiento no ha sido reportada previamente en la literatura.

El medio GC (Figura 5.4A) está dominado principalmente por *Streptococcus* y por menos del 5% de otros géneros como *Selenomonas* en la dilución  $10^{-2}$ , en comparación con los otros medios este es el único que está dominado por un género. Para la dilución  $10^{-12}$  se da un cambio considerable con el enriquecimiento de *Sharpea*. El medio GC, es un medio simple compuesto de dos fuentes de carbono, siendo glucosa un monosacárido y celobiosa un disacárido formado por dos glucosas, ambas fuentes son de fermentación rápida generando que microorganismos como *Streptococcus* puedan crecer de forma rápida, produciendo altas cantidades de ácido láctico, generando una caída en el pH, acidificando el medio e inhibiendo el crecimiento de microorganismos celulíticos y bacterias gram negativas como *Selenomonas ruminantium* [82]; lo anterior se relaciona con lo observado en la figura 5.5A, donde al diluir la muestra en la dilución es posible reducir la concentración de *Streptococcus*, dando paso a otros microorganismos como *Sharpea* productora de ácido láctico [83].

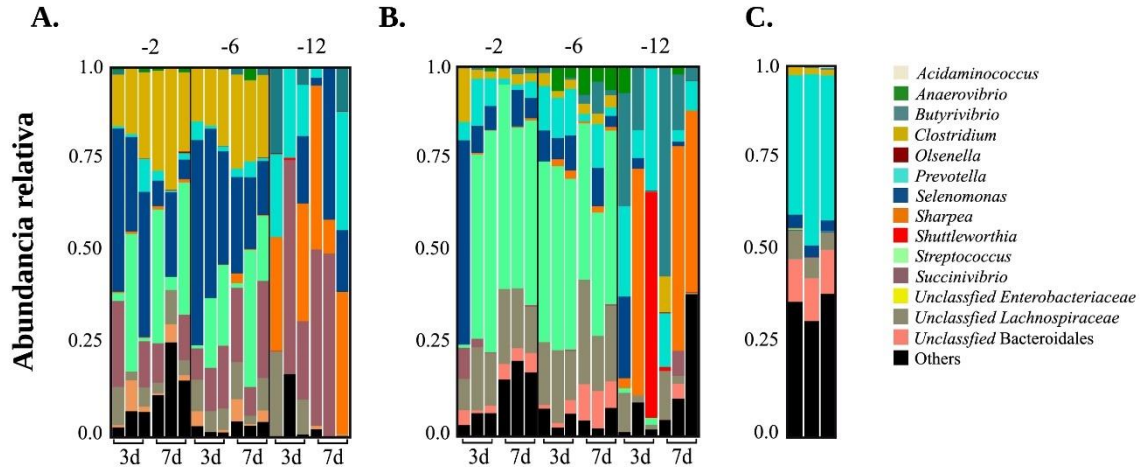




**Figura 5.4.** Abundancia relativa de la diversidad de los medios GC (A) y GOOD (B) a nivel de género.

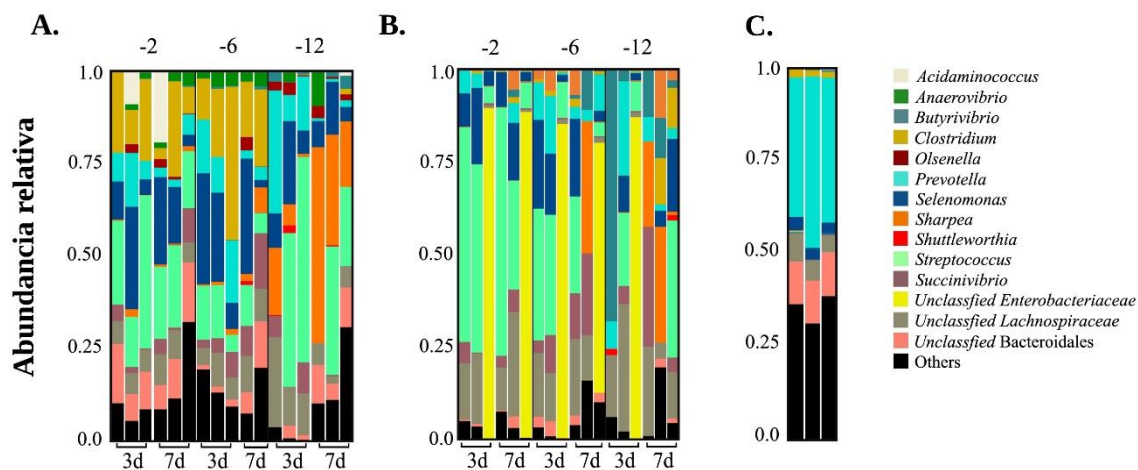
El medio GOOD (Figura 5.4B) muestra una estabilidad en la abundancia en las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  de las poblaciones *Clostridium*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, familia *Lachnospiraceae*, orden Bacteroidales y “Otros”. En  $10^{-12}$  se da un aumento de *Sharpea*, *Selenomonas* y *Shuttleworthia*, los demás microorganismos dejan de estar presentes en esta dilución. Según Goodman et al., 2011 [75] el medio GMM (nombrado GOOD en este estudio), permite la recuperación de microorganismos de los phyla Verrucomicrobia, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, de los cuales el filo Firmicutes con la clase Clostridia constituyen el grupo en mayor abundancia cultivado, ese resultado es comparable con lo encontrado para este estudio, donde el medio es capaz de enriquecer poblaciones del género *Clostridium* en la mayoría de los tratamientos a pesar de no ser el de mayor abundancia.

En el medio KNT (Figura 5.5A) se observan a los géneros de *Clostridium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, familia *Lachnospiraceae*, el orden Bacteroidales y el grupo “Otros” como parte de las dos primeras diluciones donde posteriormente su abundancia disminuye. *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Sharpea* y *Succinivibrio* componen la abundancia total de la última dilución donde a diferencia de todos los medios este último género muestra una mayor abundancia en  $10^{-12}$  en ambos tiempos de incubación. En el 2011 Kenters et al., [11] desarrollaron un medio (nombrado KNT en este estudio) mineral suplementado con vitaminas y fluido ruminal enriquecido, que recrea la composición de nutrientes del rumen, donde al ser utilizado con diluciones es capaz de aislar bacterias ruminales, este medio fue utilizado en ovejas. Los microorganismos de los géneros *Butyrivibrio*, *Clostridium* y *Prevotella* fueron enriquecidos tanto por lo reportado por el autor como en este estudio.



**Figura 5.5.** Abundancia relativa de la diversidad de los medios KNT (A) y KYO (B) a nivel de género

La Figura 5.5B muestra una alta diversidad de microorganismos en las tres diluciones, el comportamiento de  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  se da de forma similar a otros medios, manteniéndose un core de microorganismos, con alta abundancia en *Streptococcus*, la familia *Lachnospiraceae* y el grupo de “Otros” presente en la mayoría de los tratamientos. La dilución  $10^{-12}$  está caracterizada por el enriquecimiento de *Butyrivibrio* el cual se encontraba en una abundancia mínima para las anteriores diluciones, junto a *Prevotella* y *Sharpea* componen la diversidad de esta dilución. Los medios KYO (Kikuyo) y TRB (Trébol), están constituidos por una solución de sales y una única fuente de energía siendo el zumo del forraje, este zumo puede presentar material particulado. El kikuyo, es un pasto utilizado como forraje, con baja digestibilidad y disponibilidad de carbohidratos de rápida fermentación, por su composición de celulosa, hemicelulosa y la alta cantidad de almidón [84] es necesario la participación de microorganismos con actividad celulolítica, con enzimas que permitan su degradación. Como parte de los resultados y pese a que el medio presenta una composición mínima, su diversidad parece ser alta y selectiva en diluciones más altas, al observar el aumento de poblaciones de *Butyrivibrio* y *Prevotella* especializados en la degradación de xilanasas con actividad endoglucanasa y xilosidasas para la fermentación de la xilosa liberada [85].



**Figura 5.6.** Abundancia relativa de la diversidad de los medios NYO (A) y TRB (B) a nivel de género

Como resultado para el medio NYO (Figura 5.6A) se observa el cambio de las abundancias de los géneros a través de las diluciones, en la dilución  $10^{-12}$  se da la disminución de *Clostridium*, *Selenomonas* y el orden Bacteroidales, mientras que *Prevotella*, *Streptococcus* y la familia *Lachnospiraceae* se observa de manera abundante y únicamente a los 3 días de incubación, para los 7 días el grupo de “Otros” aumenta, junto con *Sharpea*. En el 2014 Nyonyo et al.,[53] implementaron un medio a partir de agar y goma gellam con azo-carboximetilcelulosa como fuente de carbono para el aislamiento de bacterias celulolíticas del rumen, este medio (nombrado NYO en este estudio) fue implementado en este estudio sin el uso del agar. De los resultados obtenidos por el autor y en este estudio, se destaca el crecimiento de los microorganismos *Anaerovibrio*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Succinivibrio* y *Butyrivibrio* (Figura 5.6A), importantes por su actividad xilanolítica y endoglucanasa

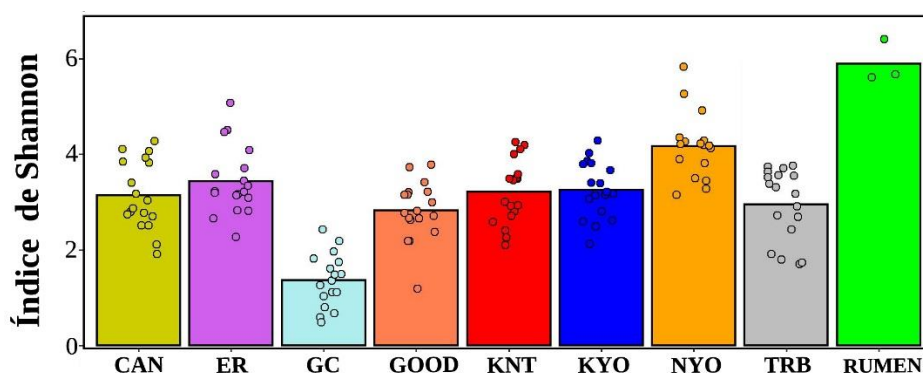
El medio TRB (Figura 5.7B) posee una abundancia mínima del género *Clostridium*, que, al revisar su clasificación de especie, hace referencia a *C. aminophilum* (datos no mostrados). La abundancia de la familia *Enterobacteriaceae* se observa de manera única en este medio con enriquecimiento en una réplica para cada dilución, su abundancia supera el 70 % de la muestra, adicionalmente la familia *Lachnospiraceae* alcanza el 25 % de abundancia en promedio. Se destaca que la dilución  $10^{-12}$  es heterogénea en todas las réplicas de los tratamientos a 3 y 7 días, mostrando una composición diferente en cada uno, su presencia puede tratarse de un posible artefacto en el procesamiento de la muestra. El trébol rojo es un forraje de tipo leguminosa de alta importancia por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo cual reduce los costos de fertilización del suelo. A diferencia del Kikuyo, el trébol rojo tiene un mayor potencial tanto de ingesta como de rendimiento en rumiantes, con una concentración mayor de proteína [86]; dentro de su composición se encuentran

polifenoles e isoflavonoides que reaccionan con las proteínas presentes haciéndolas resistentes de proteólisis, además de inhibir bacterias ruminales hiperproductoras de amoniaco (HAB), las cuales inhiben la utilización de aminoácidos por parte del rumiante [87]. Dentro del grupo de las HAB, se encuentran *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* [88]. Los medios GOOD, KNT y NYO en comparación con la literatura, muestran que pueden ser reproducibles para la obtención de ciertos microorganismos, tanto reportados por los autores como reportados aquí, aun cuando las condiciones no son reproducibles en un 100 %; también es posible que las características y capacidades de estos microorganismos cambien según el medio en el cual sean aislados generando nuevos conceptos de cuáles son los microorganismos encargados en diversas funciones como lo es la degradación de los polisacáridos presentes en los forrajes [53].

Los cambios de la composición microbiana presentados en cada uno de los medios están no solo dados por el uso de las diluciones sino también con procesos estocásticos o de “drift” ecológico, donde existen cambios en la abundancia e identidad de las especies que componen dicha comunidad en un tiempo, estos cambios están comprendidos por los cambios aleatorios relacionados a nacimiento, muerte y reproducción, se ha establecido que este efecto es mayor sobre taxones microbianos denominados raros [89].

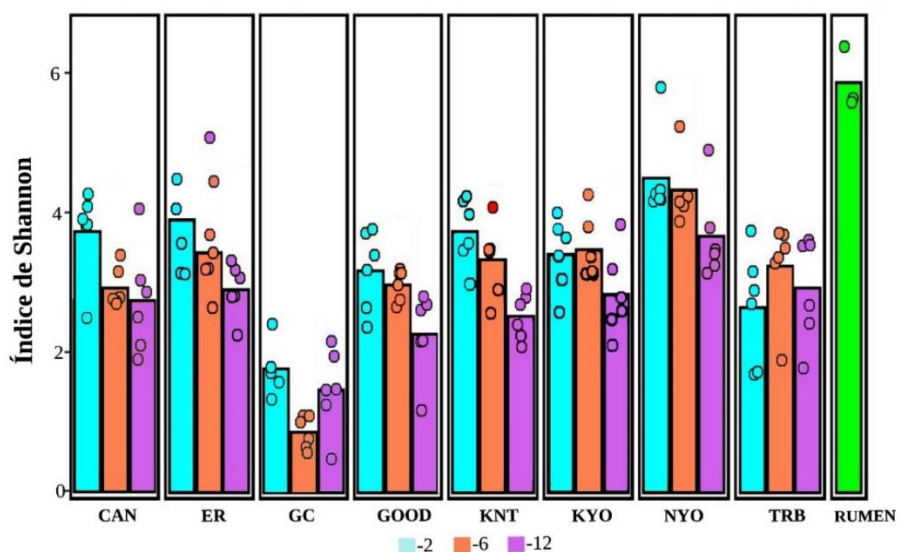
### 5.6.2 Efecto de la dilución en la riqueza de especies bacterianas.

Como medición de alfa-diversidad se utilizó el índice de Shannon, la Figura 5.7, muestra la riqueza obtenida con el índice para los medios utilizados, de manera comparativa se observa al rumen con la riqueza más alta, para los medios se observan tres grupos según la riqueza, el medio NYO y el medio ER encabezan el índice con la mayor riqueza obtenida (4-6), seguido de los medios CAN, KYO, KNT, GOOD con una riqueza media (3-4) y los medios GC y TRB con la menor riqueza según el índice (1-3).



**Figura 5.7.** Alfa diversidad del índice de Shannon para los ocho medios evaluados.

En el caso del uso de las diluciones sobre la riqueza, la Figura 5.8 muestra en la mayoría de los casos que la dilución  $10^{-2}$  posee el índice de riqueza más alto, el cual se ve afectado al diluir la muestra. Los medios GC y TRB presentan un patrón diferente para las diluciones, mostrando un índice de riqueza similar tanto en la dilución más baja como en la más alta. Díaz-García et al., 2021 [90] mostraron que el uso de diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$   $10^{-7}$ ) y de los procesos estocásticos afectan la manera en que las comunidades se ensamblan en cada una de las réplicas biológicas, observando diferencias en la diversidad obtenida. Los análisis de alfa diversidad realizados sobre las diluciones son similares a los observados en este trabajo donde se observa un gradiente de disminución en el índice al implementar al aumentar la dilución.



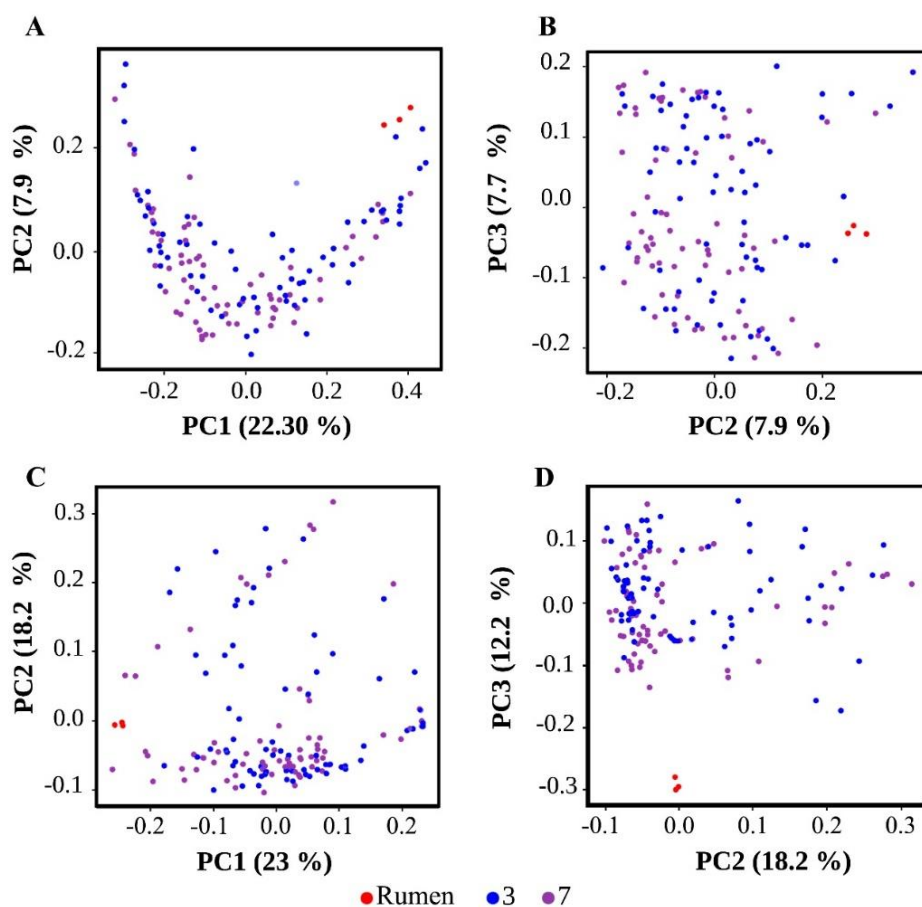
**Figura 5.8.** Alfa diversidad del índice de Shannon para las diluciones empleadas como variable en cada uno de los medios. Azul: Dilución  $10^{-2}$ . Naranja: Dilución  $10^{-6}$ . Rosado: Dilución  $10^{-12}$ , Amarillo: Rumen.

### 5.6.3 Efecto del tiempo de incubación y dilución en la composición de la comunidad, análisis multivariado.

La determinación del efecto de las variables sobre la comunidad fue realizada utilizando el índice Unifrac ( $\beta$ -diversidad) el cuál compara las muestras utilizando las medidas de distancias filogenéticas entre las comunidades, teniendo las diferencias en abundancia relativa o en ausencia o presencia de los OTUs (Weighted (ponderado) y Unweighted (no ponderado))[91]. Esta matriz de distancias entre muestras es utilizada por Qiime2 para la construcción del análisis de coordenadas principales (PCoA).

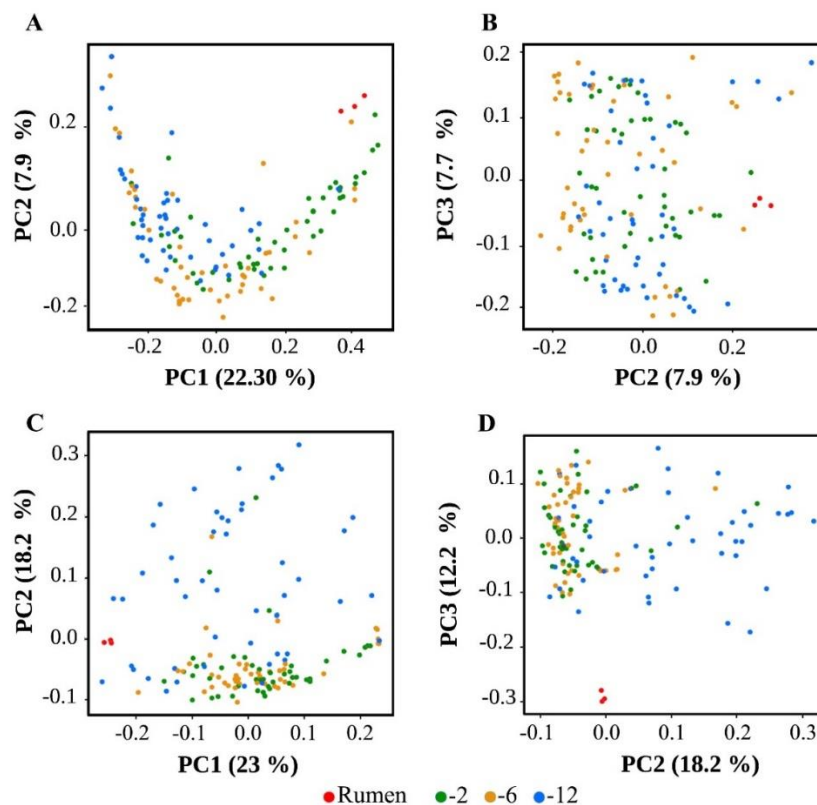
Los PCoA de la Figura 5.9 muestra la agrupación de las muestras coloreadas por tiempos de incubación, incluyendo muestras de contenido ruminal. Los dos primeros ejes explican un

22.3 % (PC1) y 7.9 % (PC2) de la variabilidad para Weighted, y un 23 % (PC1) 18.2 % (PC2) para Unweighted respectivamente. Los patrones de localización de las librerías no muestran una agrupación diferencial entre los tiempos de incubación 3 y 7 días, superponiéndose entre sí; este comportamiento se observa, con los ejes PC1 vs PC2 y PC2 vs PC3, para los datos Unweighted (Figura 5.9-A, B) y Weighted (Figura 5.9-C, D); a pesar de no observar separación por el tiempo, en el análisis de PERMANOVA para ambos casos se obtuvo significancia (weighted  $p\text{-value}_{3-7\text{días}}:0.041$ , unweighted  $p\text{-value}_{3-7\text{días}}:0.002$ ). Otros trabajos previos han evaluado el efecto del uso de distintos tiempos de incubación, Kenters et al., 2011; y Nyonyo et al., 2014 [11], [53] realizaron incubaciones por periodos de 3, 8, 9 hasta 14 días para el aislamiento de colonias, a pesar de ello, los autores no especifican si existen diferencias de aislamiento en cada uno de los días de incubación.



**Figura 5.9.** Análisis de clúster para la variable de tiempo de incubación, mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), utilizando la métrica Unifrac, A-B: gráficos Unweighted, C-D: gráficos Weighted. Rojo: Muestras de rumen. Azul: Datos a los 3 días de incubación. Morado: Datos a los 7 días de incubación.

El efecto de la dilución sobre la agrupación de las comunidades se determinó por la formación de clusters de los datos, estas agrupaciones se dan por el tipo de dilución. El PCoA (Figura 5.10-A) muestra tres agrupamientos de los datos con respecto al rumen; un grupo que se ubica de manera cercana al rumen siendo de la dilución  $10^{-2}$ , seguido de la dilución  $10^{-6}$  en una distancia media y como grupo más lejano la dilución  $10^{-12}$ ; el comportamiento descrito no es distinguible al utilizar los ejes PC2 vs PC3 donde los datos se sobrelapan (Figura 5.10-B). La figura 5.10C y 5.10D muestran el comportamiento de los datos teniendo en cuenta la abundancia relativa de cada muestra, en el que se distingue un clúster de datos perteneciente a la dilución  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  sugiriendo que la abundancia relativa de estas muestras es similar, los cuales se alejan de la dilución  $10^{-12}$ , lo que sugiere un cambio tanto poblacional como de abundancia, este comportamiento se sustenta en los cambios observados a nivel taxonómico para cada una de las diluciones (Figuras 5.3-5.6), lo cual se corrobora con el análisis de PERMANOVA donde se estableció la significancia entre dos grupos de datos de la siguiente manera:  $G1_{Rumen}$  - $G2_{dos-seis-doce}$ ,  $G1_{doce}$  - $G2_{dos-seis}$ , y  $G1_{dos}$ - $G2_{seis}$ . En todos los casos para unweighted y weightedse obtuvo significancia ( $p$ -value:0.001), a excepción de,  $G1_{dos}$ - $G2_{seis}$  weighted  $p$ -value:0.596).



**Figura 5.10.** Análisis de clúster para la variable de dilución, mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), utilizando la métrica Unifrac, A-B: gráficos Unweighted,

C-D: gráficos Weighted. Rojo: Muestras de rumen. Verde: Datos con dilución  $10^{-2}$ , Amarillo: Datos con la dilución  $10^{-6}$ , Azul: Datos con la dilución  $10^{-12}$ .

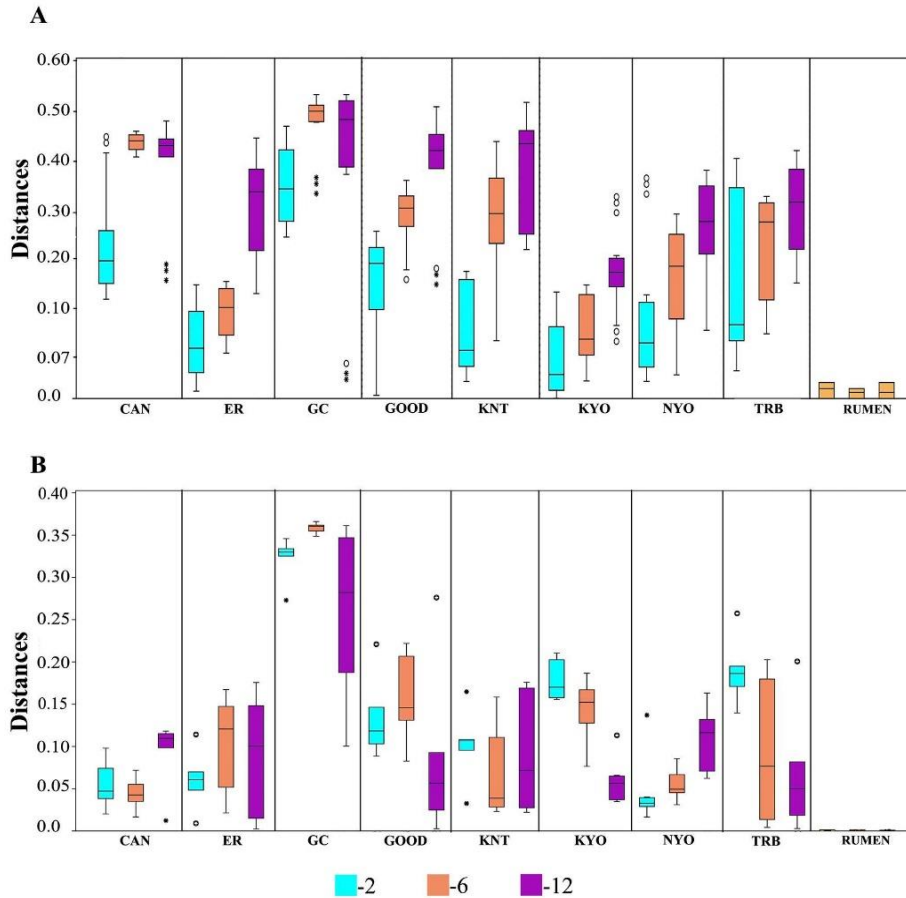
#### 5.6.4 Determinación de la distancia de las comunidades enriquecidas por los medios de cultivo y fluido ruminal

Utilizando la distancia Unifrac de las comunidades de los medios de cultivo con respecto al rumen se realizaron gráficos de distribución boxplot, las Figura 5.11A-B consolidan los datos de cada medio agrupándolas por la dilución despreciando el tiempo de incubación de los tratamientos, estas distribuciones representan el valor de la coordenada del dato vs la coordenada del rumen en valor absoluto generando un valor de distancia, permitiendo determinar los comportamientos de los tratamientos de forma conjunta asociando el medio de cultivo.

Los datos de distribución Unweighted (Figura 5.11-A) muestra tres tipos de patrones, el primero es un patrón de las distancias más lejanas del rumen, el segundo un patrón de distancia intermedia al rumen, y tercero el patrón con la distancia más cercana al rumen. El primer patrón se caracteriza por presentar las tres diluciones con la distancia más lejana al rumen, además una agrupación de los datos correspondientes a la dilución  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$  a la misma distancia, los medios CAN y GC presentan dicho patrón con un rango de distancia entre 0.48 y 0.55 respectivamente. El segundo patrón con distancia intermedia al rumen muestra que la dilución  $10^{-2}$  presenta datos cercanos al rumen con distancias de 0.01, mientras que los datos en  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$  se observan separados entre sí y se alejan con distancias entre 0.4 a 0.48, siendo una distancia mayor con respecto al rumen, este comportamiento se observa en los medios ER, GOOD y KNT. Las distancias de los datos de las diluciones sugieren una similitud de los OTUs del medio con los del rumen y segundo el efecto de la dilución de la muestra en las diluciones altas. El tercer patrón presenta las distancias más cercanas al rumen para las tres diluciones en un rango entre la dilución menor y mayor de 0.03-0.42 y 0.01-0.25 para los medios NYO y KYO respectivamente. Fuera de los tres patrones descritos se observa que el medio TRB muestra una dispersión mayor de sus datos en las diluciones, además presenta rangos de distancia similar entre las diluciones.

El boxplot para los datos Weighted (Figura 5.11-B) muestra que los datos de las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  presentan similitudes en los rangos de distancia dentro del medio, relacionándose con los resultados de las abundancias taxonómicas para uno. No obstante, la distancia de dichas diluciones con respecto al rumen difiere según el caso. La dilución  $10^{-12}$  muestra un comportamiento heterogéneo entre los tratamientos, observando que la distancia de esta dilución con respecto a los datos del medio puede ser mayor, igual o menor que las dos diluciones anteriores. Los datos correspondientes al rumen muestran distancia entre sí, aunque esa distancia es despreciable.





**Figura 5.11.** Comportamiento de la distancia de los datos agrupados por dilución para cada uno de los medios evaluados mediante el gráfico de boxplot y su relación intra e intermedio y su relación con el rumen. Azul : $10^{-2}$ . Naranja: $10^{-6}$ , Morado:  $10^{-12}$ .

El efecto de las diluciones sobre la diversidad estructural microbiana en un ecosistema ha sido estudiado por Franklin et al., 2001 [92], donde establece que el uso de diluciones ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) en una comunidad microbiana de aguas residuales, tiene un efecto no-lineal sobre los parámetros de diversidad, riqueza y homogeneidad, encontrando que las diluciones más cercanas a la muestra inicial ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) tienen características de diversidad y riqueza similares, posterior a la dilución  $10^{-3}$  disminuyen significativamente, mientras que la comunidad se vuelve más homogénea en la dilución más alta ( $10^{-6}$ ). Lo anterior puede responder a lo observado tanto en los PCoAs como en los boxplot de distancias, donde los datos de las diluciones  $10^{-2}$  son más cercanas a las muestras del rumen así mismo  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  mantienen una relación donde los datos son cercanos intra-dilución, pero se separan de forma inter-dilución al tener en cuenta la diversidad de OTUs. Además, la separación de la dilución más alta de las muestras menos diluidas es observada tanto por el autor [92] como por este trabajo. A diferencia de estos trabajos, esta investigación utilizó

la secuenciación de marcadores moleculares lo cual permite examinar más ampliamente la composición de la diversidad independiente de cultivo, a pesar de esto una limitante del uso de marcadores moleculares es que pueden amplificar genes de bacterias muertas o no activas metabólicamente lo cual no fue determinado en esta parte del proyecto, esto conlleva a que existan diferencias en el momento de comparar la diversidad por metataxonomía versus en el aislamiento de colonias.

## 5.7 Conclusión

Desde el establecimiento de la colección de microorganismos ruminales CMINA, se han utilizado medios como el GC, que en este estudio muestran una limitada capacidad de recuperación de microorganismos ruminales. Este es el primer estudio que además de generar una estrategia de evaluación de medios utilizables en la recuperación de microorganismos ruminales, intenta dilucidar y establecer cómo las variables de tiempo de incubación y dilución afecta el enriquecimiento de grupos taxonómicos microbianos. En general la composición taxonómica de los medios muestra un core de microorganismos similar aun cuando los medios difieren de su composición nutricional, y en comparación con el fluido ruminal muestreado se observaron diferencias significativas. El bajo enriquecimiento del filo Bacteroidetes en las muestras de los medios de cultivo indica que esta población requiere probablemente de otras condiciones de cultivo que permitan su recuperación. El uso de diluciones confirma los resultados de otros autores que, junto con este trabajo, permite una mayor selectividad y por ende una menor diversidad de microorganismos en diluciones altas. De forma contraria a lo esperado, el tiempo no muestra una diferenciación en la comunidad recuperada. Todos los resultados permitieron seleccionar una estrategia siendo el uso de los medios CAN, KNT y el uso de la dilución  $10^{-12}$  para la continuación de este estudio, la recuperación de microorganismos de interés como *Sharpea*, *Selenomonas*, *Olsenella*, *Succinivibrio*, *Prevotella*, *Butyrivibrio* y su reproducibilidad los hacen adecuados, para la realización del objetivo 2. Hasta la fecha, este es el primer estudio que reúne diferentes medios de cultivo anaerobios reportados y de uso propio, para ser comparados mediante metataxonomía en su capacidad de recuperar la microbiota ruminal.

## Referencias

- [1] L. Chen et al., "Large-Scale Ruminant Genome Sequencing Provides Insights Into Their Evolution and Distinct Traits," *Science* (1979), Vol. 364, No. 6446, Jun. 2019, Doi: 10.1126/Science.Aav6202.
- [2] T. J. Hackmann and J. N. Spain, "Invited Review: Ruminant Ecology And Evolution: Perspectives Useful To Ruminant Livestock Research And Production," *Journal Of Dairy Science*, Vol. 93, No. 4. Pp. 1320–1334, 2010. Doi: 10.3168/Jds.2009-2071.
- [3] C. Janis, "The Evolutionary Strategy Of The Equidae And The Origins Of Rumen and Cecal Digestion," *Evolution (N Y)*, Vol. 30, No. 4, P. 757, 1976, Doi: 10.2307/2407816.
- [4] M. Clauss and G. E. Rössner, "Old World Ruminant Morphophysiology, Life History, And Fossil Record: Exploring Key Innovations Of A Diversification Sequence," *Annales Zoologici Fennici*, Vol. 51, No. 1–2, Pp. 80–94, 2014, Doi: 10.5735/086.051.0210.
- [5] J. García and M. Gingins, "Conferencia: Anatomía Y Fisiología Del Aparato Digestivo De Los Rumiantes," Dpto. Zootecnia, Facultad De Agricultura Y Veterinaria Uba, Pp. 1–2, 1969.
- [6] P. N. Hobson and C. S. Steward, *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blacde Academic & Professional, 1997. Doi: 10.1007/978-94-009-1453-7.
- [7] S. Ghazanfar and A. Azim, "Metagenomics and Its Application In Rumen Ecosystem: Potential Biotechnological Prospects," *Pakistan Journal Of Nutrition*, Vol. 8, No. 8. Pp. 1309–1315, 2009. Doi: 10.3923/Pjn.2009.1309.1315.
- [8] T. G. Nagaraja, *Rumenology*. 2016. Doi: 10.1007/978-3-319-30533-2.
- [9] C. P. Rosewarne, P. B. Pope, J. L. Cheung, And M. Morrison, "Analysis Of The Bovine Rumen Microbiome Reveals A Diversity Of Sus-Like Polysaccharide Utilization Loci From The Bacterial Phylum Bacteroidetes," *Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology*, Vol. 41, No. 3, Pp. 601–606, 2014, Doi: 10.1007/S10295-013-1395-Y.
- [10] M. P. Bryant, N. Small, C. Bouma, and I. Robinson, "Studies On The Composition Of The Ruminant Flora And Fauna Of Young Calves," *Journal Of Dairy Science*, Vol. 41, No. 12, Pp. 1747–1767, 1958, Doi: 10.3168/Jds.S0022-0302(58)91160-3.
- [11] N. Kenters, G. Henderson, J. Jeyanathan, S. Kittelmann, and P. H. Janssen, "Isolation Of Previously Uncultured Rumen Bacteria By Dilution To Extinction Using A New Liquid Culture Medium," *Journal Of Microbiological Methods*, Vol. 84, No. 1, Pp. 52–60, 2011, Doi: 10.1016/J.Mimet.2010.10.011.
- [12] S. Mao, M. Zhang, J. Liu, And W. Zhu, "Characterising The Bacterial Microbiota Across The Gastrointestinal Tracts Of Dairy Cattle: Membership And Potential Function," *Scientific Reports*, Vol. 5, No. April, Pp. 1–14, 2015, Doi: 10.1038/Srep16116.
- [13] A. K. Puniya, R. Singh, And D. N. Kamra, *Rumen Microbiology: From Evolution To Revolution*. 2015. Doi: 10.1007/978-81-322-2401-3.
- [14] G. Henderson, F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, And W. Young, "Rumen Microbial Community Composition Varies With Diet And Host , But A Core Microbiome Is Found Across A Wide Geographical Range," No. April, 2015, Doi: 10.1038/Srep14567.
- [15] W. M. Craig, G. A Broderick, And D. B. Ricker, "Quantitation Of Microorganisms Associated With The Particulate Phase Of Ruminant Ingesta.," *J Nutr*, Vol. 117, No. 1, Pp. 56–62, 1987.
- [16] Andrés. Londoño-Zapata, Jaime. Fernández-Correa, Licet. Molina-Guzmán, Diana. Polanco-Echeverry, And Lina. Gutiérrez-Builes, "Cuantificación De Bacterias Celulolíticas Anaerobias Provenientes Del Rumen De Ganado Bovino : Comparación De Tres Técnicas.," *Hechos Microbiol.*, Vol. 2, No. 1, Pp. 51–59, 2011.
- [17] A. Söllinger et al., "Holistic Assessment Of Rumen Microbiome Dynamics Through Quantitative Metatranscriptomics Reveals Multifunctional Redundancy During Key Steps Of Anaerobic Feed Degradation," *Msystems*, Vol. 3, No. 4, Pp. E00038-18, 2018, Doi: 10.1128/Msystems.00038-18.
- [18] D. E. Akin And W. S. Borneman, "Role Of Rumen Fungi In Fiber Degradation," *Journal Of Dairy Science*, Vol. 73, No. 10, Pp. 3023–3032, 1990.
- [19] I. B. Heath, T. Bauchop, And R. A. Skipp, "Assignment Of The Rumen Anaerobe *Neocallimastix Frontalis* To The Spizellomycetales (Chytridiomycetes) On The Basis Of Its Polyflagellate Zoospore Ultrastructure," *Canadian Journal Of Botany*, Vol. 61, No. 1, Pp. 295–307, Jan. 1983, Doi: 10.1139/B83-033.
- [20] J. J. Gold, I. Brent Heath, And T. Bauchop, "Ultrastructural Description Of A New Chytrid Genus Of Caecum Anaerobe, *Caecomycetes Equi* Gen. Nov., Sp. Nov., Assigned To The Neocallimastixaceae," *Biosystems*, Vol. 21, No. 3–4, Pp. 403–415, Jan. 1988, Doi: 10.1016/0303-2647(88)90039-1.
- [21] R. A. Hanafy, M. S. Elshahed, And N. H. Youssef, "*Feromyces Austini* , Gen. Nov., Sp. Nov., An Anaerobic Gut Fungus From Rumen And Fecal Samples Of Wild Barbary Sheep And Fallow Deer," *Mycologia*, Vol. 0, No. 0, Pp. 1–13, 2018, Doi: 10.1080/00275514.2018.1466610.
- [22] R. A. Hanafy, M. S. Elshahed, A. S. Ligginstoffer, G. W. Griffith, And N. H. Youssef, "*Pecoromyces Ruminantium*, Gen. Nov., Sp. Nov., An Anaerobic Gut Fungus From The Feces Of Cattle And Sheep," *Mycologia*, Vol. 109, No. 2, Pp. 231–243, 2017, Doi: 10.1080/00275514.2017.1317190.
- [23] R. A. Hanafy et al., "Seven New Neocallimastigomycota Genera From Fecal Samples Of Wild, Zoo-Housed, And Domesticated Herbivores: Description Of *Ghazallomyces Constrictus* Gen. Nov., Sp. Nov., *Aklioshbomyces Papillarum* Gen. Nov., Sp. Nov., *Agriosomyces Longus* Gen. Nov., Sp. Nov.," *Biorxiv*, P. 642694, 2019, Doi: 10.1101/642694.
- [24] R. A. Hanafy, N. H. Youssef, And M. S. Elshahed, "*Paucimycetes Polynucleatus* Gen. Nov, Sp. Nov., A Novel Polycentric Genus Of Anaerobic Gut Fungi From The Faeces Of A Wild Blackbuck Antelope," *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, Vol. 71, No. 6, P. 004832, Jun. 2021, Doi: 10.1099/Ijsem.0.004832.
- [25] M. Stabel et al., "*Aestipascuomyces Dupliciliberans* Gen. Nov, Sp. Nov., The First Cultured Representative Of The Uncultured Sk4 Clade From Aoudad Sheep And Alpaca," *Microorganisms*, Vol. 8, No. 11, Pp. 1–17, Nov. 2020, Doi: 10.3390/Microorganisms8111734.
- [26] A. Breton, A. Bernalier, M. Dusser, G. Fonty, B. Gaillard-Martinie, And J. Guillot, "*Anaeromyces Mucronatus* Nov. Gen., Nov. Sp. A New Strictly Anaerobic Rumen Fungus With Polycentric Thallus," *Fems Microbiology Letters*, Vol. 70, No. 2, Pp. 177–182, Jul. 2006, Doi: 10.1111/J.1574-6968.1990.Tb13974.X.
- [27] D. J. S. Barr, H. Kudo, K. D. Jakober, And K.-J. Cheng, "Morphology And Development Of Rumen Fungi: *Neocallimastix* Sp., *Piromyces Communis* , And *Orpinomyces Bovis* Gen. Nov., Sp. Nov.," *Canadian Journal Of Botany*, Vol. 67, No. 9, Pp. 2815–2824, Sep. 1989, Doi: 10.1139/B89-361.

- [28] S. S. Dagar et al., "A New Anaerobic Fungus (*Oontomyces Anksri* Gen. Nov., Sp. Nov.) From The Digestive Tract Of The Indian Camel (*Camelus Dromedarius*)," *Fungal Biology*, Vol. 119, No. 8, Pp. 731–737, Aug. 2015, Doi: 10.1016/J.Funbio.2015.04.005.
- [29] T. M. Callaghan et al., "Buwchfawromyces Eastonii Gen. Nov., Sp. Nov.: A New Anaerobic Fungus (Neocallimastigomycota) Isolated From Buffalo Faeces," *Myckeys*, Vol. 9, Pp. 11–28, 2015, Doi: 10.3897/Myckeys.9.9032.
- [30] A. Joshi, V. B. Lanjekar, P. K. Dhakephalkar, T. M. Callaghan, G. W. Griffith, And S. S. Dagar, "Liebetanzomyces Polymorphus Gen. et Sp. Nov., A New Anaerobic Fungus (Neocallimastigomycota) Isolated From The Rumen Of A Goat," *Myckeys*, Vol. 40, Pp. 89–110, 2018, Doi: 10.3897/Myckeys.40.28337.
- [31] E. Ozkose, B. J. Thomas, D. R. Davies, G. W. Griffith, And M. K. Theodorou, "Cyllamyces Aberensis Gen. Nov. Sp. Nov., A New Anaerobic Gut Fungus With Branched Sporangiophores Isolated From Cattle," *Canadian Journal Of Botany*, Vol. 79, No. 6, Pp. 666–673, Jun. 2001, Doi: 10.1139/B01-047.
- [32] M. Ferrer et al., "Novel Hydrolase Diversity Retrieved From A Metagenome Library Of Bovine Rumen Microflora," *Environmental Microbiology*, Vol. 7, No. 12, Pp. 1996–2010, 2005, Doi: 10.1111/J.1462-2920.2005.00920.X.
- [33] D. D. Millen, M. D. B. Arrigoni, And R. D. L. Pacheco, *Rumenology*. Switzerland: Springer Nature, 2016.
- [34] R. Danielsson et al., "Methane Production In Dairy Cows Correlates With Rumen Methanogenic And Bacterial Community Structure," *Frontiers In Microbiology*, Vol. 8, No. Feb, Pp. 1–15, 2017, Doi: 10.3389/Fmicb.2017.00226.
- [35] D. P. Morgavi, C. Martin, J. P. Jouany, And M. J. Ranilla, "Rumen Protozoa And Methanogenesis: Not A Simple Cause–Effect Relationship," *British Journal Of Nutrition*, Vol. 107, No. 3, Pp. 388–397, Feb. 2012, Doi: 10.1017/S0007114511002935.
- [36] C. L. Williams, B. J. Thomas, N. R. Mcewan, P. Rees Stevens, C. J. Creevey, And S. A. Huws, "Rumen Protozoa Play A Significant Role In Fungal Predation And Plant Carbohydrate Breakdown," *Frontiers In Microbiology*, Vol. 11, P. 720, Apr. 2020, Doi: 10.3389/Fmicb.2020.00720/BibTex.
- [37] R. Solomon et al., "Protozoa Populations Are Ecosystem Engineers That Shape Prokaryotic Community Structure And Function Of The Rumen Microbial Ecosystem," *Isme J*, Vol. 16, No. 4, Pp. 1187–1197, Apr. 2022, Doi: 10.1038/S41396-021-01170-Y.
- [38] R. A. Gilbert et al., "Rumen Virus Populations: Technological Advances Enhancing Current Understanding," *Frontiers In Microbiology*, Vol. 11, No. March, Pp. 1–26, 2020, Doi: 10.3389/Fmicb.2020.00450.
- [39] J. Overmann, B. Abt, And J. Sikorski, "Present And Future Of Culturing Bacteria," *Annual Review Of Microbiology*, Vol. 71, No. 1, Pp. 711–730, 2017, Doi: 10.1146/Annurev-Micro-090816-093449.
- [40] Nagaraja T. G., "A Microbiologist ' S View On Improving Nutrient Utilization In Ruminants," *Proc 23rd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, Pp. 135–161, 2012.
- [41] R. Sharma, Y. Nimonkar, A. Sharma, R. S. Rathore, And O. Prakash, "Concept Of Microbial Preservation: Past, Present And Future," 2018, Pp. 35–54. Doi: 10.1007/978-3-319-96971-8\_2.
- [42] J. C. Lagier, P. Hugon, S. Khelaifia, P. E. Fournier, B. La Scola, And D. Raoult, "The Rebirth Of Culture In Microbiology Through The Example Of Culturomics To Study Human Gut Microbiota," *Clin Microbiol Rev*, Vol. 28, No. 1, Pp. 237–264, Jan. 2015, Doi: 10.1128/Cmr.00014-14.
- [43] J. C. Lagier et al., "Culture Of Previously Uncultured Members Of The Human Gut Microbiota By Culturomics," *Nature Microbiology* 2016 1:12, Vol. 1, No. 12, Pp. 1–8, Nov. 2016, Doi: 10.1038/Nmicrobiol.2016.203.
- [44] T. Zehavi, M. Probst, and I. Mizrahi, "Insights Into The Culturomics Of The Rumen Microbiome," *Frontiers In Microbiology*, Vol. 9, No. August, Pp. 1–10, 2018, Doi: 10.3389/Fmicb.2018.01999.
- [45] J. L. Jany and G. Barbier, "Culture-Independent Methods For Identifying Microbial Communities In Cheese," *Food Microbiology*, Vol. 25, No. 7, Pp. 839–848, 2008, Doi: 10.1016/J.Fm.2008.06.003.
- [46] B. J. W. M. Leod And A. Leetwer, "A Method For Plate Culture Of Anaerobic Bacteria," *Journal Of Pathology*, Vol. 17, Pp. 454–457, 1912.
- [47] R. E. Hungate, "Chapter Iv A Roll Tube Method For Cultivation Of Strict Anaerobes," *Methods In Microbiology*, Vol. 3, No. Part B, Pp. 117–132, 1969, Doi: 10.1016/S0580-9517(08)70503-8.
- [48] M. L. Kalmokoff and R. M. Teather, "Isolation And Characterization Of A Bacteriocin (*Butyrivibriocin Ar10*) From The Ruminal Anaerobe *Butyrivibrio Fibrisolvens* Ar10: Evidence In Support Of The Widespread Occurrence Of Bacteriocin-Like Activity Among Ruminal Isolates Of *B. Fibrisolvens*," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 2, Pp. 394–402, 1997.
- [49] F. Rodríguez et al., *Manual De Laboratorio Para El Estudio De Microorganismos Anaerobios Obligados*. Corpoica, 2011.
- [50] S. Koike et al., "Molecular Monitoring And Isolation Of Previously Uncultured Bacterial Strains From The Sheep Rumen," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 6, Pp. 1887–1894, 2010, Doi: 10.1128/Aem.02606-09.
- [51] G. W. Griffith, E. Ozkose, M. K. Theodorou, And D. R. Davies, "Diversity Of Anaerobic Fungal Populations In Cattle Revealed By Selective Enrichment Culture Using Different Carbon Sources," *Fungal Ecology*, Vol. 2, No. 2, Pp. 87–97, 2009, Doi: 10.1016/J.Funeco.2009.01.005.
- [52] K. Nakamura et al., "A Six-Well Plate Method: Less Laborious And Effective Method For Cultivation Of Obligate Anaerobic Microorganisms," *Microbes And Environments*, Vol. 26, No. 4, Pp. 301–306, 2011, Doi: 10.1264/Jsme2.Me11120.
- [53] T. Nyonyo, T. Shinkai, And M. Mitsumori, "Improved Culturability Of Cellulolytic Rumen Bacteria And Phylogenetic Diversity Of Culturable Cellulolytic And Xylanolytic Bacteria Newly Isolated From The Bovine Rumen," *Fems Microbiology Ecology*, Vol. 88, No. 3, Pp. 528–537, 2014, Doi: 10.1111/1574-6941.12318.
- [54] C. Su, L. Lei, Y. Duan, K. Q. Zhang, And J. Yang, "Culture-Independent Methods For Studying Environmental Microorganisms: Methods, Application, And Perspective," *Applied Microbiology And Biotechnology*, Vol. 93, No. 3, Pp. 993–1003, 2012, Doi: 10.1007/S00253-011-3800-7.
- [55] J. Overmann, B. Abt, And J. Sikorski, "Present And Future Of Culturing Bacteria," *Annual Review Of Microbiology*, Vol. 71, No. 1, Pp. 711–730, Sep. 2017, Doi: 10.1146/Annurev-Micro-090816-093449.
- [56] M. O. A. Sommer, "Advancing Gut Microbiome Research Using Cultivation," *Current Opinion In Microbiology*, Vol. 27, Pp. 127–132, 2015, Doi: 10.1016/J.Mib.2015.08.004.
- [57] S. Kittelmann, G. E. Naylor, J. P. Koolaard, And P. H. Janssen, "A Proposed Taxonomy Of Anaerobic Fungi (Class Neocallimastigomycetes) Suitable For Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis," *Plos One*, Vol. 7, No. 5, Pp. 1–13, 2012, Doi: 10.1371/Journal.Pone.0036866.
- [58] R. Seshadri et al., "Cultivation And Sequencing Of Rumen Microbiome Members From The Hungate1000 Collection," *Nature Biotechnology*, Vol. 36, No. 4, Pp. 359–367, 2018, Doi: 10.1038/Nbt.4110.
- [59] S. Koike And Y. Kobayashi, "Fibrolitic Rumen Bacteria: Their Ecology And Functions," *Asian-Australasian Journal Of Animal*

- Sciences, Vol. 22, No. 1, Pp. 131–138, 2009, Doi: 10.5713/Ajas.2009.R.01.
- [60] H. C. Mantovani, H. Hu, R. W. Warobo, And J. B. Russell, “Bovicin Hc5, A Bacteriocin From *Streptococcus Bovis* Hc5,” *Microbiology (N Y)*, Vol. 148, No. 11, Pp. 3347–3352, 2002, Doi: 10.1099/00221287-148-11-3347.
- [61] R. E. Mueller, E. L. Iannotti, And J. M. Asplund, “Isolation And Identification Of Adherent Epimural Bacteria During Succession In Young Lambs,” *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 47, No. 4, Pp. 724–730, 1984.
- [62] F. Quartarello et al., “Together Is Better: The Rumen Microbial Community As Biological Toolbox For Degradation Of Synthetic Polyesters,” *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, Vol. 9, No. July, Pp. 1–11, 2021, Doi: 10.3389/Fbioe.2021.684459.
- [63] E. Duque Et al., “Ruminal Metagenomic Libraries As A Source Of Relevant Hemicellulolytic Enzymes For Biofuel Production,” *Microbial Biotechnology*, Vol. 11, No. 4, Pp. 781–787, 2018, Doi: 10.1111/1751-7915.13269.
- [64] L. B. Oyama et al., “The Rumen Microbiome: An Underexplored Resource For Novel Antimicrobial Discovery,” *Npj Biofilms And Microbiomes*, Vol. 3, No. 1, Pp. 1–9, 2017, Doi: 10.1038/S41522-017-0042-1.
- [65] L. B. Oyama et Al., “Buwchitin: A Ruminal Peptide With Antimicrobial Potential Against *Enterococcus Faecalis*,” *Frontiers In Chemistry*, Vol. 5, No. July, Pp. 1–12, 2017, Doi: 10.3389/Fchem.2017.00051.
- [66] C. González Almario et al., *Historia De Los Bancos De Germoplasma De Microorganismos Agrosavia (Bgm-A). Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (Agrosavia)*, 2020. Doi: 10.21930/Agrosavia.Brochure.7403633.
- [67] J. C. Ovalle Masmela, L. M. Botero Rute, F. Rodriguez Villamizar, R. Herrera León, And H. R. Jimenez Sabogal, “Colección De Microorganismos Con Interés En Nutrición Animal,” *Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria - Agrosavia. Dataset/Occurrence*, 2021. <https://doi.org/10.15472/Dpbwjh> (Accessed Aug. 07, 2022).
- [68] Fedegan, “Plan Estratégico De La Ganadería Colombiana 2019,” Fedegan, 2006. <http://www.fedegan.org.co/plan-estrategico-de-la-ganaderia-colombiana-2019>
- [69] R. Hernández, H. Jimenez, C. Vargas-García, A. Caro-Quintero, And A. Reyes, “Disentangling The Complexity Of The Rumen Microbial Diversity Through Fractionation Using A Sucrose Density Gradient,” *Frontiers In Microbiology*, Vol. 0, P. 1883, Jul. 2021, Doi: 10.3389/Fmicb.2021.664754.
- [70] M. Kim, M. Morrison, And Z. Yu, “Status Of The Phylogenetic Diversity Census Of Ruminal Microbiomes,” *Fems Microbiology Ecology*, Vol. 76, No. 1, Pp. 49–63, 2011, Doi: 10.1111/J.1574-6941.2010.01029.X.
- [71] Z. Yu, M. Yu, And M. Morrison, “Improved Serial Analysis Of V1 Ribosomal Sequence Tags (Sarst-V1) Provides A Rapid, Comprehensive, Sequence-Based Characterization Of Bacterial Diversity And Community Composition,” *Environmental Microbiology*, Vol. 8, No. 4, Pp. 603–611, 2006, Doi: 10.1111/J.1462-2920.2005.00933.X.
- [72] R. D. Stewart et al., “Assembly Of 913 Microbial Genomes From Metagenomic Sequencing Of The Cow Rumen,” *Nature Communications*, Vol. 9, No. 1, Pp. 1–11, 2018, Doi: 10.1038/S41467-018-03317-6.
- [73] R. Hernández, M. Chaib De Mares, H. Jimenez, A. Reyes, And A. Caro-Quintero, “Functional And Phylogenetic Characterization Of Bacteria In Bovine Rumen Using Fractionation Of Ruminal Fluid,” *Frontiers In Microbiology*, Vol. 13, P. 453, Mar. 2022, Doi: 10.3389/Fmicb.2022.813002/Bibtext.
- [74] R. Atlas, *Handbook Of Microbiological Media*, Fourth Edition. 2010. Doi: 10.1201/Ebk1439804063.
- [75] A. L. Goodman et al., “Extensive Personal Human Gut Microbiota Culture Collections Characterized And Manipulated In Gnotobiotic Mice,” *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, Vol. 108, No. 15, Pp. 6252–6257, 2011, Doi: 10.1073/Pnas.1102938108.
- [76] J. J. Faith et al., “The Long-Term Stability Of The Human Gut Microbiota,” *Science (1979)*, Vol. 341, No. 6141, 2013, Doi: 10.1126/Science.1237439.
- [77] J. G. Caporaso et al., “Ultra-High-Throughput Microbial Community Analysis On The Illumina Hiseq And Miseq Platforms,” *ISME Journal*, Vol. 6, No. 8, Pp. 1621–1624, 2012, Doi: 10.1038/Ismej.2012.8.
- [78] E. Bolyen et al., “Reproducible, Interactive, Scalable And Extensible Microbiome Data Science Using Qiime 2,” *Nature Biotechnology*, Vol. 37, No. 8, Pp. 852–857, 2019, Doi: 10.1038/S41587-019-0209-9.
- [79] C. J. Creevey, W. J. Kelly, G. Henderson, And S. C. Leahy, “Determining The Culturability Of The Rumen Bacterial Microbiome,” *Microbial Biotechnology*, Vol. 7, No. 5, Pp. 467–479, 2014, Doi: 10.1111/1751-7915.12141.
- [80] S. Deusch, A. Camarinha-Silva, J. Conrad, U. Beifuss, M. Rodehutschord, And J. Seifert, “A Structural And Functional Elucidation Of The Rumen Microbiome Influenced By Various Diets And Microenvironments,” *Frontiers In Microbiology*, Vol. 8, No. Aug, P. 1605, 2017, Doi: 10.3389/Fmicb.2017.01605.
- [81] M. Kim, M. Morrison, And Z. Yu, “Phylogenetic Diversity Of Bacterial Communities In Bovine Rumen As Affected By Diets And Microenvironments,” *Folia Microbiologica*, Vol. 56, No. 5, Pp. 453–458, 2011, Doi: 10.1007/S12223-011-0066-5.
- [82] D. Aphale, A. Natu, S. Laldas, And A. Kulkarni, “Administration Of *Streptococcus Bovis* Isolated From Sheep Rumen Digesta On Rumen Function And Physiology As Evaluated In A Rumen Simulation Technique System,” *Veterinary World*, Vol. 12, No. 9, Pp. 1362–1371, 2019, Doi: 10.14202/Vetworld.2019.1362-1371.
- [83] S. Kumar et al., “*Sharpea* And *Kandleria* Are Lactic Acid Producing Rumen Bacteria That Do Not Change Their Fermentation Products When Co-Cultured With A Methanogen,” *Anaerobe*, Vol. 54, Pp. 31–38, Dec. 2018, Doi: 10.1016/J.Anaerobe.2018.07.008.
- [84] L. A. Prado Barragán, J. J. B. Figueroa, L. V. Rodríguez Durán, C. N. Aguilar González, And C. Hennigs, “Fermentative Production Methods,” In *Biotransformation Of Agricultural Waste And By-Products: The Food, Feed, Fibre, Fuel (4f) Economy*, Elsevier, 2016, Pp. 189–217. Doi: 10.1016/B978-0-12-803622-8.00007-0.
- [85] D. O. Krause et al., “Opportunities To Improve Fiber Degradation In The Rumen: Microbiology, Ecology, And Genomics,” *Fems Microbiology Reviews*, Vol. 27, No. 5, Pp. 663–693, 2003, Doi: 10.1016/S0168-6445(03)00072-X.
- [86] K. Kuoppala, S. Ahvenjärvi, M. Rinne, And A. Vanhatalo, “Effects Of Feeding Grass Or Red Clover Silage Cut At Two Maturity Stages In Dairy Cows. 2. Dry Matter Intake And Cell Wall Digestion Kinetics,” *Journal Of Dairy Science*, Vol. 92, No. 11, Pp. 5634–5644, 2009, Doi: 10.3168/Jds.2009-2250.
- [87] I. A. Kagan, B. M. Goff, And M. D. Flythe, “Soluble Phenolic Compounds In Different Cultivars Of Red Clover And Alfalfa, And Their Implication For Protection Against Proteolysis And Ammonia Production In Ruminants,” *Natural Product Communications*, Vol. 10, No. 7, Pp. 1263–1267, 2015, Doi: 10.1177/1934578x1501000732.
- [88] J. L. Rychlik And J. B. Russell, “Mathematical Estimations Of Hyper-Ammonia Producing Ruminal Bacteria And Evidence For Bacterial Antagonism That Decreases Ruminal Ammonia Production1,” *Fems Microbiology Ecology*, Vol. 32, No. 2, Pp. 121–128, 2006, Doi: 10.1111/J.1574-6941.2000.Tb00706.X.

- [89] J. Zhou And D. Ning, "Stochastic Community Assembly: Does It Matter In Microbial Ecology?," *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, Vol. 81, No. 4, Dec. 2017, Doi: 10.1128/Mmbr.00002-17.
- [90] L. Diaz-Garcia et al., "Dilution-To-Stimulation/Extinction Method: A Combination Enrichment Strategy To Develop A Minimal And Versatile Lignocellulolytic Bacterial Consortium," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 87, No. 2, Pp. 1–15, Jan. 2020, Doi: 10.1128/Aem.02427-20.
- [91] C. Lozupone, M. E. Lladser, D. Knights, J. Stombaugh, And R. Knight, "Unifrac: An Effective Distance Metric For Microbial Community Comparison," *Isme Journal*, Vol. 5, No. 2. Pp. 169–172, 2011. Doi: 10.1038/Ismej.2010.133.
- [92] R. B. Franklin, J. L. Garland, C. H. Bolster, And A. L. Mills, "Impact Of Dilution On Microbial Community Structure And Functional Potential: Comparison Of Numerical Simulations And Batch Culture Experiments," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 2, Pp. 702–712, 2001, Doi: 10.1128/Aem.67.2.702-712.2001.

## Capítulo II

### CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS RUMINALES ANAEROBIAS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO SELECCIONADOS

Asociado al objetivo: Determinar el potencial de aislamiento de la estrategia de cultivo seleccionada por su capacidad de enriquecimiento de poblaciones de interés.

#### Resumen

El aislamiento de las bacterias anaerobias es un paso fundamental para caracterizar sus capacidades metabólicas y determinar su posible rol en el ecosistema ruminal. No obstante, la comparación entre la diversidad de especies cultivadas y las observadas en estudios moleculares independientes de cultivo, indica que una gran proporción de microorganismos no ha podido ser recuperada todavía por los medios de cultivo tradicionales. Esta dificultad en el aislamiento de los diferentes grupos de microorganismos ruminales se debe a múltiples factores como los requerimientos nutricionales especiales tales como, concentración de minerales, vitaminas, ácidos orgánicos y fuentes de carbono complejas. Además de las interacciones entre poblaciones como el cross-feeding, factores intrínsecos de cada animal, entre otros. Por lo tanto, para mejorar la caracterización del ecosistema ruminal, es necesario una evaluación sistemática de nuevos medios de cultivo junto a múltiples condiciones de aislamiento. Por esa razón, en este capítulo se caracterizó la población bacteriana ruminal cultivable mediante el uso de dos medios de cultivo seleccionados en el capítulo anterior por su diferente capacidad de enriquecimiento (medios CAN y KNT). Estos medios pueden elaborarse de forma reproducible y han mostrado un enriquecimiento consistente de grupos taxonómicos microbianos, en concordancia con lo reportado en la literatura. El aislamiento de microorganismos se realizó en seis etapas, bajo condiciones estrictas de anaerobiosis: Toma de las muestras de fluido ruminal y dilución del fluido ruminal hasta la dilución  $10^{-12}$ ; inoculación e incubación en los medios CAN y KNT por 3 y 7 días; inoculación en roll tubes y pase de colonias aisladas a caldos CAN y KNT; verificación de pureza de aislados por microscopía y re-inoculación en roll tubes, y finalmente la elaboración de banco de cepas de trabajo. Las colonias obtenidas una vez purificadas fueron caracterizadas por tinción de gram, morfología en microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica SEM, e identificación molecular con la secuenciación SANGER del gen 16S ARNr. Adicionalmente, con los medios líquidos CAN y KNT de la etapa dos, se realizó un análisis metataxonómico utilizando el gen 16S ARNr de los cultivos utilizados para el aislamiento. Como resultados se obtuvieron 60 aislamientos, de los cuales 54 fueron identificados por secuenciación. Los aislados identificados corresponden a los géneros: *Staphylococcus* (15), *Streptococcus* (14), *Succinivibrio* (12), *Selenomonas* (2), *Butyrivibrio* (2), *Pseudobutyrvibrio* (2), *Oribacterium* (2), *Lactobacillus* (2), *Actinomyces* (2), *Pediococcus* (1). Los análisis metataxonómicos

muestran que existe una alta reproducibilidad a nivel de filo en ambos medios, a nivel de géneros, el medio CAN enriquece los mismos géneros observados en el capítulo I, mientras que en el medio KNT existe una mayor diversidad de estos entre librerías, aun así, este resultado es comparable con lo reportado en literatura para este medio. Para la determinación de la fracción cultivable de cada medio se tuvo en cuenta únicamente los géneros clasificados, se observó que solo el 15 % del enriquecimiento del medio CAN es recuperado, mientras que en el medio KNT es del 40 %. Para ambos casos se observó que varios de los aislamientos no se encontraban presentes en los OTUs clasificados. Estos resultados sugieren que, la evaluación de la diversidad por metataxonómica en medios de cultivos puede guiar la recuperación de colonias de organismos poco caracterizados, como los aislamientos de *Actinomyces ruminicola*, *Streptococcus orisasini*, *Oribacterium sp*, por medio del ajuste de las metodologías de plaqueo, selección, y aislamiento de colonias.



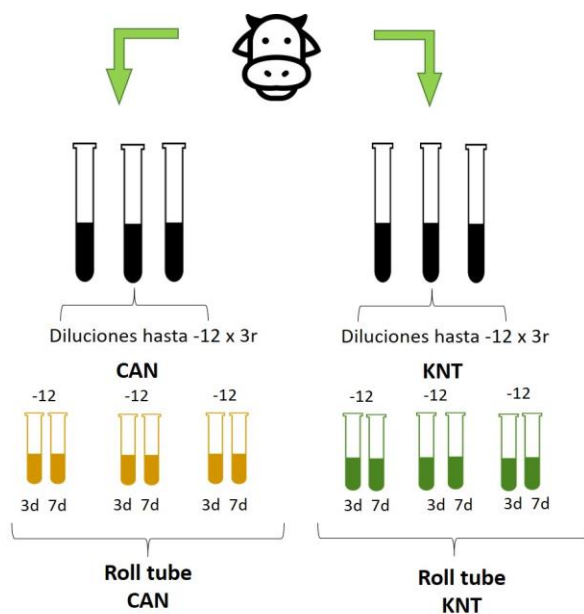
## 6. Metodología

### 6.1 Preparación del animal y toma de muestras

Para la obtención de fluido ruminal y preparación del animal se realizó nuevamente el procedimiento descrito en el capítulo I. Se colectaron tres muestras de fluido ruminal, como réplicas biológicas.

### 6.2 Implementación de estrategia de cultivo

De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se inocularon de forma anaerobia tubos de la dilución  $10^{-12}$  a partir de las muestras de fluido ruminal en los medios CAN y KNT, incubados a  $39^{\circ}\text{C}$  por un periodo de tiempo de 3 y 7 días. El montaje se realizó por en las tres réplicas tomadas (Figura 6.1).



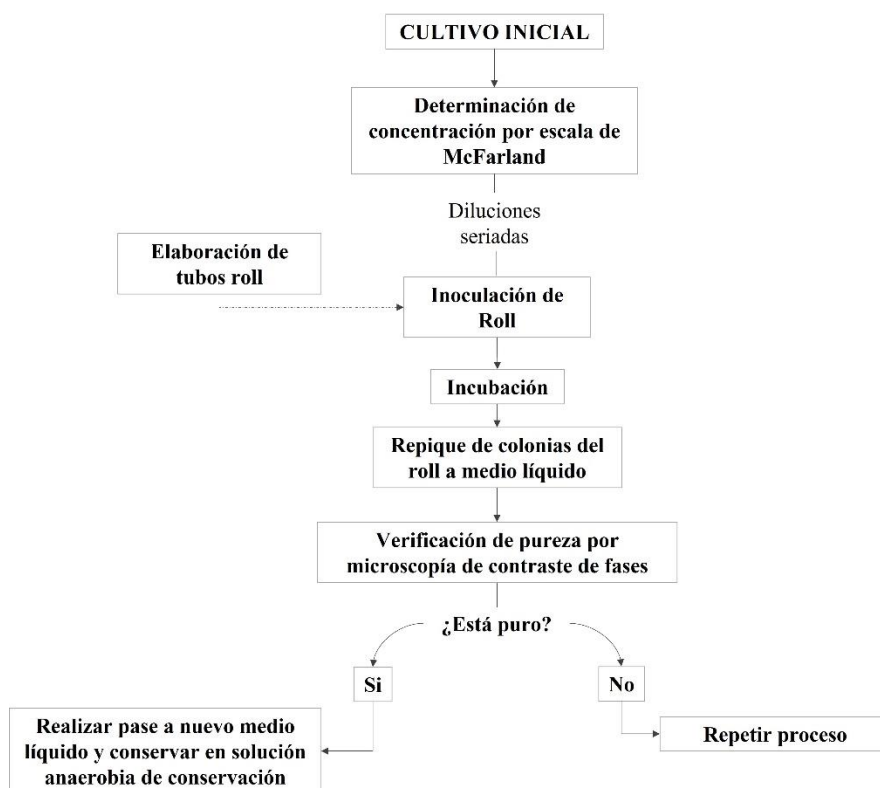
**Figura 6.2.** Diseño del montaje para el aislamiento de bacterias a partir de dos medios de cultivo. Partiendo de tres réplicas biológicas de fluido ruminal, diluidas hasta  $10^{-12}$  e inoculadas posteriormente en dos tubos por réplica para cada medio, obteniendo un total de doce tubos, incubados durante 3 y 7 días. Posterior al tiempo cada tubo fue procesado para aislamiento por el método de Roll-tube.

### 6.3 Aislamiento de microorganismos mediante Roll-tube

La Figura 6.2 muestra el proceso de aislamiento de colonias posterior al tiempo de incubación de 3 y 7 días. Los cultivos fueron diluidos de acuerdo con la concentración obtenida por

turbidez comparando con el patrón de McFarland, seleccionando las últimas dos diluciones. Los tubos de roll [1], fueron preparados con los medios CAN y KNT con agar al 1.5% (p/v) a un volumen final de 4.5 mL por tubo, utilizando tubos tipo “Balch” con tapón de caucho y agrafe. Previo a la inoculación, se mantuvieron los tubos a 60 °C en baño maría manteniendo la fase líquida del medio, en el momento de la inoculación se enfriaron los tubos a temperatura de 35 °C, inoculando 0.5 mL de cada dilución. Con los tubos inoculados se realizó manualmente la distribución homogénea del medio girando sobre una superficie con agua fría el tubo hasta lograr la gelificación de una capa delgada de agar en todo el tubo. Los tubos se incubaron de forma inclinada por 48h a 39 °C ± 2 °C.

Finalizado el tiempo de incubación se realizó la apertura de los tubos roll bajo condiciones de esterilidad con el fin de hacer un repique de las colonias aisladas utilizando asas desechables; cada colonia tomada se inoculó en caldos de los medios CAN y KNT, los tubos se incubaron por 48 h a 39 °C ± 2 °C. Todos los tubos con crecimiento fueron revisados por microscopía de contraste de fases, verificando la pureza y homogeneidad de la morfología obtenida. Aquellos cultivos con más de una morfología fueron reprocesados empleando la misma metodología mencionada anteriormente.



**Figura 6.3.** Diagrama de flujo para el aislamiento de bacterias mediante la técnica de Roll-tube, a partir de los cultivos iniciales de CAN y KNT en la dilución  $10^{-12}$  a 3 y 7 días de incubación.

Los aislados puros fueron repicados en un segundo tubo y conservados utilizando una solución de conservación anaerobia (Material Suplementario S1) más glicerol al 15 % (v/v) manteniendo las condiciones reductoras del medio. Por cada uno de los aislados obtenidos se conservaron 10 viales, crio-conservando a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , adicionalmente se tomaron muestras de 2 mL de cultivo puro, distribuidos en tubos eppendorf de 1.5 mL, estas muestras fueron usadas posteriormente en la caracterización de los aislados.

## **6.4. Caracterización de los aislados**

### *6.4.1 Tinción de Gram y descripción morfológica*

A partir de una muestra de cultivo puro y en condiciones estériles se tomaron muestras para la realización de la tinción de Gram modificada descrita para bacterias anaerobias [1] (Material suplementario S3), adicionalmente se tomaron muestras para describir su morfología por microscopía de contraste de fases.

### *6.4.2 Caracterización molecular de la diversidad recuperada*

Para la identificación molecular de los aislados se realizaron extracciones de ADN por el método de fenol:cloroformo descrito en el capítulo 1, numeral 5.1.4, para la identificación del gen 16s rRNA, se utilizaron los primers universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). La PCR fue realizada a un volumen de 25  $\mu\text{L}$ . La reacción consistió en 2.5 ml de buffer 10x, 1ml 50 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 ml of 10 mM DNTP mix (2,5 mM cada uno, Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5 ml de cada primer, 0.1 ml de Taq Polymerase Platinum High-Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 2 ml de DNA. El programa de PCR consistió en 2 min a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  seguido de 10 ciclos de 15 s a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 s a  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 1 min a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido por 20 ciclos de 15 s a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 s a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 min a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con una extensión final de 7 min a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis utilizando 2  $\mu\text{l}$  del producto de PCR amplificado en un gel al 1.5% (p/v). Los productos de PCR fueron secuenciados en Corpogen (Bogotá).

### *6.4.3 Determinación de la estructura microbiana por microscopía electrónica (SEM)*

Para la descripción morfológica se realizó microscopía electrónica (SEM) de los aislados seleccionados utilizando un microscopio de haz de iones LYRA3 TESCAN en el Centro de Microscopía de la Universidad de los Andes. Las muestras fueron realizadas a partir de un cultivo puro, tomando un mililitro y centrifugándolo a 13.000 rpm durante 10 min, transcurrido el tiempo de centrifugación se retiró el sobrenadante, resuspendiendo las células en solución salina estéril al 0,85 %. Posteriormente se fijaron con solución de glutaraldehído al 2,5 % por 12 horas, finalizado el tiempo se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, el

glutaraldehído fue retirado, las células se lavaron con agua grado molecular para retirar impurezas; posteriormente se inició la deshidratación con etanol en diferentes concentraciones. En primer lugar, se adicionó etanol al 70 % por 5 min, se retiró el etanol y se realizaron dos lavados adicionales con etanol al 95 % durante 10 min cada uno. Finalmente se realizaron tres lavados con etanol al 100 % por 20 min cada lavado. En cada paso de lavado y adición de etanol se utilizaron las condiciones de centrifugado a 10.000 rpm por 3 min. Terminada la fijación y deshidratación de las células, las muestras fueron procesadas y fotografiadas.

## **6.5. Análisis taxonómicos del enriquecimiento y los aislados obtenidos en cultivo puro**

### *6.5.1 Análisis del gen 16s rRNA*

Las secuencias recibidas fueron verificadas en su calidad mediante el programa Geneious Prime (V.2019.2.1) e identificadas utilizando la herramienta BLAST proporcionada por el NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), así como la comparación con la base de datos RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Se realizó una comparación filogenética de los aislados utilizando secuencias relacionadas con cada aislado, utilizando como outgroup una secuencia de *Methanobrevibacter ruminantium* (GenBank NR\_042784.1) Todas las secuencias fueron alineadas en MEGA 7.0.26 con la herramienta ClustalW, posteriormente se realizó un árbol filogenético mediante el método de distancia Neighbour-Joining, junto con el modelo de Kimura 2P, con un bootstrap de 1000 iteraciones.

### *6.5.2 Librerías de amplicones*

Posterior a los tiempos de incubación de cada uno de los medios cultivos enriquecidos, se prepararon las librerías de amplicones de 16s ARNr, siguiendo la metodología descrita en el capítulo I, numeral 5.4.2. Con el fin de establecer relaciones de reproducibilidad de los medios con los resultados obtenidos del capítulo I y con lo reportado en literatura. Asimismo, de establecer el porcentaje de recuperación de los microorganismos aislados vs lo enriquecido en el medio.

## 6.6 Resultados y discusión

Con base en los resultados obtenidos en el capítulo I, se determinó que los medios CAN y KNT cumplían con las características deseadas para el aislamiento de microorganismos, siendo medios con un índice de riqueza media, con la capacidad de enriquecer poblaciones como: *Butyrivibrio*, *Olsenella*, *Prevotella*, *Sharpea*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Shuttleworthia* en la dilución más alta. Parte de estos géneros han sido reportados en la literatura para el medio KNT [3]. En cuanto al tiempo de incubación no se establecieron diferencias, sin embargo, para este capítulo se utilizarán ambos tiempos de incubación.

### 6.6.1. Caracterización preliminar y microscópica de los medios de cultivo

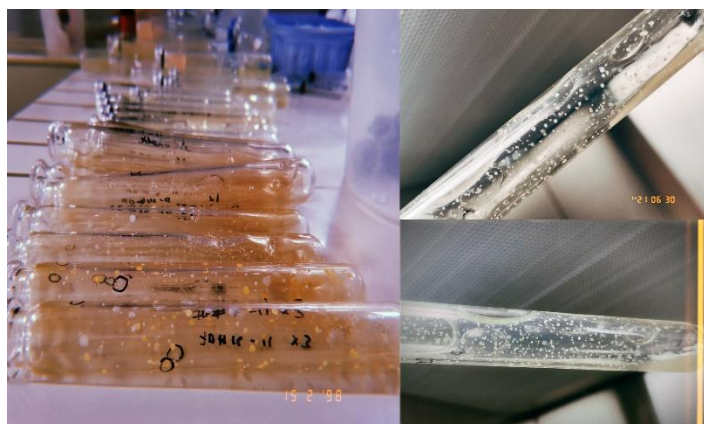
La evaluación preliminar de los dos medios de cultivo permite determinar algunas características de la comunidad seleccionada, como lo son la densidad de crecimiento de la comunidad (examinación de la turbidez y la producción de gas) y la morfología celular de las bacterias seleccionadas. Como resultado de esta evaluación se observaron diferencias entre los medios. Los cultivos realizados para el medio CAN presentaron turbidez alta, considerando como “alto” la opacidad del medio que no permite el paso de luz a través del tubo, esta característica se observó a 3 y 7 días de incubación, mientras que la producción de gas determinada mediante la inserción de una jeringa con aguja, en donde la presión generada por el gas genera que el émbolo de la jeringa se desplace en su totalidad hacia arriba, únicamente se registró en la tercera réplica para los 3 días de incubación. Por otra parte, los cultivos del medio KNT para ambos días de incubación presentaron turbidez alta y sin presencia de gas.

Las diferencias morfológicas de los cultivos fueron evaluadas por microscopía de contraste de fases, encontrando diferencias para los 3 y 7 días de incubación únicamente en el medio CAN. Posterior a 3 días se observaron: En la réplica 1: Bacilos en cadena y solos, algunos móviles, bacilos de tipo vibrios y bacilos refringentes. Replica 2: Bacilos pequeños y delgados, espiroquetas y vibrios. Replica 3: Bacilos cortos en su mayoría tipo vibrio. Posterior a 7 días, en las tres replicas se observan bacilos cortos, cadenas de bacilos, cocos solos, en pareja y en formación de cadenas. En el medio KNT las morfologías son homogéneas en las réplicas para ambos tiempos de incubación, observando bacilos individuales, bacilos agrupados en cadena de tamaño mediano y vibrios a 3 días y Bacilos pequeños que no forman cadenas, bacilos largos, bacilos tipo vibrio.

### 6.6.2. Aislamiento de los microorganismos.

Teniendo en cuenta la turbidez observada se realizaron diluciones hasta  $10^{-12}$  y  $10^{-8}$  para el medio CAN y KNT respectivamente, para los tubos de roll se seleccionaron las diluciones  $10^{-11}$  y  $10^{-12}$  para CAN,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  para el medio KNT. 48 horas después se seleccionaron la

mayor cantidad de colonias separadas (Figura 6.3) de cada uno de los tubos y se repicaron en los caldos correspondientes.



**Figura 6.3.** Crecimiento de colonias en tubos de roll posterior a 48h de incubación para los cultivos iniciales de CAN y KNT de 3 y 7 días

Posterior al tiempo de incubación de las colonias repicadas en medio de cultivo específico, se verificó la pureza de los aislados mediante microscopía de contraste de fases; los aislados finales fueron conservados en un banco de trabajo de cinco viales por aislamiento, adicionalmente se realizó tinción de Gram y toma de muestra para la extracción de ADN y la posterior amplificación del gen 16s rRNA para secuenciación e identificación. La Tabla 6.1 muestra los aislamientos finales obtenidos de cada uno de los medios y el resultado de la tinción de Gram.

**Tabla 6.1.** Listado de aislamientos recuperados en los medios CAN y KNT, coloración de Gram y morfología.

AISLADO	IDENTIFICADOR*	MEDIO	TIEMPO	GRAM**	MORFOLOGÍA
1	C 7D#16-11(1)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
2	C 7D#7-11(2)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
3	C 7D#7-11(1)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
4	C 7D#19-9(1)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas (pequeños)
5	C 7D#16-11(2)	CAN	7 días	G-Positivo	cocobacilos en pareja
6	K 7D #5	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos curvos delgados medianos
7	K 7D #6	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos curvos delgados largos
8	K 3D#8-3(2)	KNT	3 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
9	K 3D#6-5(3)	KNT	3 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
10	K 3D#3(1)	KNT	3 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
11	K 3D#11-4(2)	KNT	3 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
12	C 7D#16-10(1)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
13	C 7D#7-11(3)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
14	K 3D#6-5(2)	KNT	3 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
15	C 7D#15-12(1)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos solos y/o pareja
16	C 7D#16-11(3)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
17	C 7D#19-9(2)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
18	C 7D #15-12(3)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos solos y/o pareja

19	C 7D #15-17(2)	CAN	7 días	G-Positivo	cocos solos y/o pareja
20	K 3D#11-4(1)	KNT	3 días	G-Positivo	Bacilos curvos cortos
21	K 7D #11-5(3)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
22	K 3D#3-2(1)	KNT	3 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
23	K 7D#13-5(1)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
24	K 7D#7-4(2)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
25	K 7D#11-5(2)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
26	K 7D#6(2)-7(1)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
27	K 3D #16-4(3)	KNT	3 días	G-v o G-N	Bacilos enteros cortos
28	K 3D #15	KNT	3 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
29	C10#4	KNT	3 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
30	C3D-2#2	CAN	3 días	G-Positivo	Cocos en cadena
31	C10#4-2	CAN	3 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
32	K 7D #15-3(1)	KNT	7 días	G-Positivo	Coco bacilos
33	C10#1	CAN	3 días	G-Positivo	Bacilos medianos largos
34	C 10#5	CAN	3 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
35	C 3D#19-11	CAN	3 días	G-Positivo	Bacilos pequeños curvos
36	K 3D#16-4(3-1)	KNT	3 días	G-V	Bacilos delgados largos, tenuous
37	K 7D#13-5(2)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
38	K 7D#6-4(1)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos en pareja y/o cadena
39	C 10#1-2	CAN	3 días	G-Positivo	Bacilos medianos largos
40	K 7D#15-5(1)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
41	K 7D#(O)-10(1)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
42	K 3D#16-8(2)	KNT	3 días	G-v o G-N	Bacilos delgados medianos, tenuous
43	K 7D#"A1"-11(1)	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
44	K 7D#"U"-8(2)	KNT	7 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
45	C 3D#10-12 (4.1)	CAN	3 días	G-Positivo	cocos tétradas y/o parejas
46	K 3D#16-8(3)	KNT	3 días	G-Negativo	Bacilos medianos enteros
47	K 7D#"P"-10(11)	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
48	K K-17(3)	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
49	C 3D #13-12(1)	CAN	3 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
50	K 7D#K16-6	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
51	K 7D#K16-1	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
52	K 7D#K16-4	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
53	K 7D#"R"	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
54	K 7D#K16-5	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
55	K 7D#"P"	KNT	7 días	G-Negativo	Bacilos enteros cortos semicurvados
56	Xyl K#2	KNT	7 días	G-Positivo	Bacilos cortos ligeramente redondos en la punta
57	Xyl K1#3	KNT	3 días	GP o GV	Bacilos curvos muy delgados cortos
58	Xyl K #1	KNT	7 días	G-Positivo	Bacilos cortos ligeramente redondos en la punta
59	C3D#2-9	CAN	3 días	G-Positivo	Cocos en cadena
60	Xy K1#1	KNT	7 días	GP o GV	Bacilos curvos muy delgados cortos

\*La letra C corresponde a los aislados recuperados del medio CAN, la letra K corresponde a los aislados recuperados del medio KNT. En 3 días (3D) o 7 días (7D). \*\*GP o G-Positivo: Gram-positivo, G-Negativo: Gram-negativo, GV: Gram-variable.

Un total de 60 aislamientos fueron obtenidos, presentando morfologías relacionadas con cocos y bacilos, 41 son Gram-positivos, 14 Gram-negativos y 5 Gram-variables; la coloración Gram-variable puede deberse a los cambios en la pared celular según la fase de crecimiento [4].

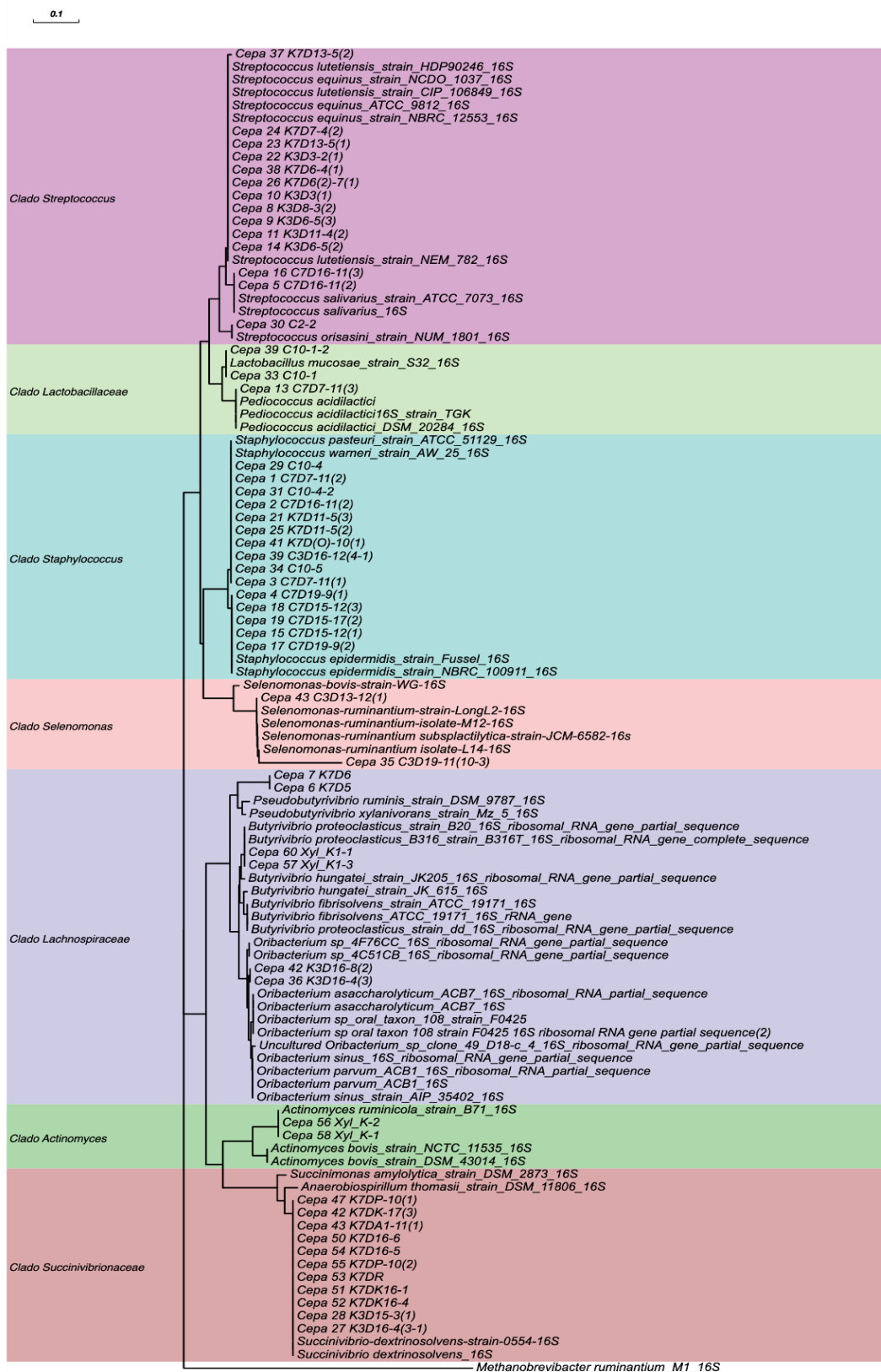
### 6.6.3. Identificación molecular de los aislamientos

Se amplificó exitosamente el gen 16S rRNA para todos los aislados (Figura S5.1-B Material Suplementario). Se extrajo ADN total de todos los aislados (Tabla S4.1 Material Suplementario), y se visualizaron en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) (Figura S5.1-A Material Suplementario), algunos de los aislados presentaron concentraciones superiores a 100 ng/uL de ADN, en aquellos casos en la reacción de PCR se tomó únicamente 1 uL de ADN para evitar la saturación de la reacción, aquellas muestras con una concentración menor de 100 ng/uL ADN, se utilizaron 2 uL. Los productos de amplificación por PCR fueron secuenciados por SANGER. La calidad de las secuencias obtenidas de cada aislado se verificó en el programa Geneious Prime (v.2019.1), retirando los segmentos de mala calidad al inicio y final de la secuencia. Las secuencias verificadas fueron utilizadas para la identificación de los aislados utilizando la herramienta seqmatch del RDP ([https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)) y por medio de la búsqueda de homología utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos de marcadores moleculares (16S ribosomal RNA sequences) del NCBI. La mayoría de las secuencias analizadas por ambas bases de datos coinciden con los mismos microorganismos y mantienen el porcentaje de identidad en rangos superiores al 90%; los aislados 6, 7, 30, 35, presentaron porcentajes inferiores al 90 % de identidad con la base de datos RDP, pero un porcentaje superior en la base de datos del NCBI. Asimismo, se presentaron coincidencias para dos especies de un mismo género que comparten un porcentaje de similitud como el caso de las especies *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus pasteurii* (Tabla S6.1, Material Suplementario).

Se identificaron diez géneros y doce especies asociadas a los géneros: *Actinomyces ruminicola*, *Butyrivibrio* sp, *Limosilactobacillus mucosae*, *Oribacterium* sp, *Pediococcus acidilactici*, *Pseudobutyrvibrio* sp, *Selenomonas ruminantium* *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus orisasini*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus salivarius* y *Succinivibrio dextrinosolvens*.



## 6.6.4 Análisis filogenético

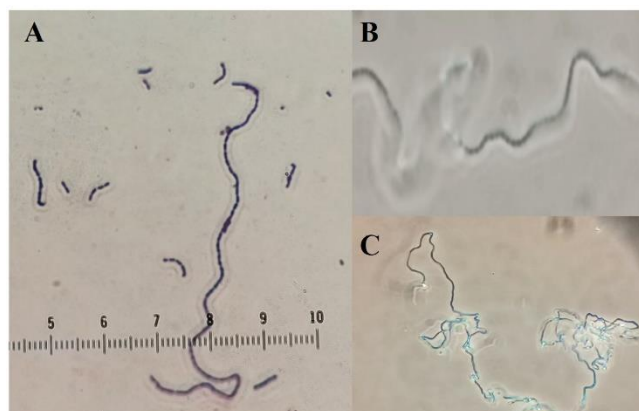


**Figura 6.4.** Dendograma filogenético por Neighbour-joining de los aislados, conformando 7 clados; *Methanobrevibacter ruminantium* fue utilizado como raíz del árbol. Los números en los nodos son los valores de Bootstrap (5) basados en el análisis de Neighbour-joining de 1000 réplicas. La barra explica el 5% de divergencia en las secuencias.

En la Figura 6.4, del árbol filogenético describe 7 clados que agrupan los aislamientos con las secuencias de referencia. El primer clado corresponde a todos los microorganismos del género *Streptococcus*, los aislamientos 37, 24, 23, 22, 38, 26, 10, 8, 9, 11 y 14, se encuentran en el cluster con las especies de *Streptococcus equinus* y *Streptococcus lutetiensis* además de compartir esta característica, se resalta que todos los aislamientos nombrados fueron aislados en el medio KNT tanto para los 3 y 7 días de incubación (Figura 6.5, Tabla S6.1, Material Suplementario). Estas especies de estreptococos hacen parte del complejo SBSEC (*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex) compuestos por diferentes especies de estreptococos que hacen parte de tracto gastrointestinal de animales y humanos, pero que a su vez pueden ser patógenos oportunistas con características de alta patogenicidad en humanos, además de representar uno de los grupos con mayor resistencia antimicrobiana [5], no obstante otros estudios se han centrado en establecer el rol que ejercen estas especies en el rumen. Según Aphale, Natu, Laldas, & Kulkarni, 2019 [7] la administración oral de *S.bovis*/*S.lutetiensis* tienen un efecto antimicrobiano, reduciendo la población de coliformes y el aumento de levaduras utilizando RUSITEC como modelo; de igual forma *Streptococcus* se ha reportado como parte de los microorganismos amilolíticos degradadores de almidón y utilizadores de productos intermediarios, su alta abundancia en el rumen puede tener un efecto negativo en el rumiante incrementando la producción y acumulación de ácido láctico y por ende favorecer la acidosis aguda y subaguda [8]. La similitud de las secuencias con ambas especies está explicada por la alta cantidad de genes conservados y la transferencia horizontal de genes entre el complejo SBSEC y otros estreptococos [9], ubicando a los aislados y las secuencias de referencia en el mismo cluster. Parte del cluster de los *Streptococcus* se encuentra las especies *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus orisasini*. Junto a *S. salivarius* se encuentran agrupados los aislamientos 16 y 5 aislados en el medio CAN a 7 días de incubación (Tabla 3), esta especie hace parte de la microbiota normal de cavidad oral e intestinal en humanos, su contribución ha sido descrita en la homeostasis inmunológica y la regulación de la respuesta inflamatoria, este microorganismo no ha sido asociado a procesos de patogenicidad [10], asimismo se ha reportado su rol ecológico con la reducción de la adhesión y colonización de patógenos manteniendo la salud oral e intestinal del humano [11]. Aun cuando no es un microorganismo propio de los rumiantes, se le han reportado características asociadas tanto a la resistencia de antibióticos, como a la producción de bacteriocinas con efecto probiótico. Tal y como lo muestra Nam et al., 2009 [12] con el aislamiento de especies de *S.salivarius* en leche proveniente de bovinos con mastitis, con un perfil de resistencia a cefalotina y oxacilina. Hyink et al., 2007 [13], reportan la producción del lantobiótico Salivaricin B por parte de *S.salivarius*. Los dos aislamientos de esta especie pueden no estar relacionados directamente con la comunidad ruminal y pueden tratarse de

microorganismos presentes en el animal, así como contaminación cruzada en la manipulación, sin embargo, su prospección como productores de bacteriocinas presenta un potencial. El aislamiento 30 se agrupa con *Streptococcus orisasini* el cual es un microorganismo descrito recientemente por Takada et al., 2013 [14], fue aislado de la cavidad oral de un burro y su secuencia se encuentra relacionada con la especie *S.ratti* esto se correlaciona con la identificación realizada por la base datos de RDP, al clasificar el aislamiento 30 con la especie *S.ratti* con un 70% de identidad. *S.orisasini* no ha sido descrito de manera amplia, tampoco se ha descrito como parte de la microbiota de rumiantes, este aislamiento puede ser el primer aislamiento hecho a partir de fluido ruminal de bovinos y aislado utilizando un medio de cultivo descrito en un handbook de microbiología, *S.orisasini* se describe morfológicamente como cocos en pareja o en cadenas cortas, sin embargo, esta morfología no corresponde a la observada para este aislamiento en la microscopía tanto de contraste como electrónica (Figura 6.5, Figura 6.7-H), ya que su crecimiento en el medio CAN bajo condiciones anaerobias estrictas a 7 días de incubación, es de cocos en cadenas largas, esta diferencia puede ser propia del microorganismo, puesto que el microorganismo reportado en literatura fue aislado utilizando medio BHI y suplementado con extracto de levadura al 1 %, para ambos casos el medio BHI y el medio CAN son medios con una alta concentración de nitrógeno y con una única fuente de carbono siendo la glucosa.

El segundo cluster agrupa a las bacterias ácido lácticas de la familia *Lactobacillaceae* con los géneros *Limosilactobacillus* y *Pediococcus*. Los aislados 39 y 33 recuperados del medio CAN a 3 días de incubación (Tabla 3) coinciden con *L.mucosae* (Figura 6.7-D) el cual es un microorganismo capaz de adherirse a la pared intestinal y de inhibir el crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal mediante exclusión competitiva, esta característica la hace además una bacteria con potencial probiótico, dado que puede colonizar rápidamente el intestino; actualmente se han descrito diversos genes relacionados a la capacidad de adhesión [15], además se ha reportado su aislamiento en el tracto gastrointestinal de terneros, así como del intestino y heces fecales de cerdos [16]–[18]. Su recuperación es importante dado que la CMINA posee una colección de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) que han sido estudiadas por su potencial probiótico y antagonico contra diversos patógenos, sugiriendo posibles estudios en co-cultivo con *Limosilactobacillus* como *L. reuteri* el cual presenta una homología de genes *mub* responsables en la producción de proteínas específicas descritas como “*mucus-binding*” las cuales podrían ser potencializadas en conjunto. Asimismo, el aislamiento 13 recuperados del medio CAN a 7 días de incubación, coincide con *Pediococcus acidilactici*, es de resaltar que no es común la recuperación de esta BAL en contenido ruminal bajo condiciones de dieta de solo forraje, puesto que su presencia está relacionada con acidosis ruminal y puede ser confundido con el grupo de *Streptococcus bovis* por presentar características de ese género[19].



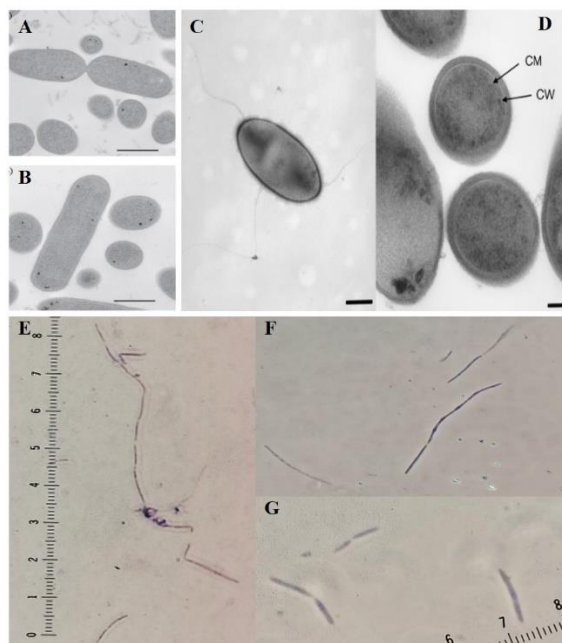
**Figura 6.5.** Fotografía del aislamiento 30 relacionado a la especie *Streptococcus orisasini*, A: coloración de gram, siendo gram positivo; B y C: Morfologías en microscopía de contraste de fases 40x. Crecimiento en el medio CAN

El tercer clado corresponde al género *Staphylococcus*, el cual se divide en dos subclados con las especies *S. warneri/pasteuri* y *S. epidermidis*. El primer subclado corresponde a los aislados 29,1,31,2,39,34 y 3 aislados en el medio CAN en ambos tiempos de incubación, y los aislamientos 41,25 y 21 aislados en medio KNT posterior a 7 días de incubación, estos aislamientos hacen parte del subclado de *S. warneri/pasteuri*. En el segundo subclado se encuentran los aislamientos 4,18,19,15 y 17 recuperados en el medio CAN a los 7 días de incubación, estos comparten la rama de *S. epidermidis*. En el primer subclado los aislamientos identificados como *S. warneri* y *S. pasteuri* (Figura 6.7-G), pertenecen al mismo cluster de estafilococos, denominado Cluster *S. warneri* [20], en cuanto a la relación que pueden tener con los rumiantes, han sido descritos como la primera causa de abortos en bovinos [21]. En el segundo subclado se encuentra *S. epidermidis*, un estafilococo coagulasa negativo (SCN) ubicuo de la microbiota de la piel [22], aunque su aislamiento en piel o mucosa de bovinos es baja, su impacto está relacionado con mastitis bovina a nivel clínico o subclínico [23], varios estudios han descrito la producción de bacteriocinas para esta especie, con capacidad de inhibir bacterias Gram-positivas [22]. Su capacidad de crecer en el medio CAN bajo condiciones anaerobias y mantener una viabilidad posterior a los días de incubación es notable, ya que se ha descrito que es un microorganismo anaerobio facultativo capaz de sobrevivir a diferentes concentraciones de oxígeno y de aumentar la formación de biofilms en condiciones estrictas de anaerobiosis[24], [25]. No es claro que la recuperación de estos aislamientos identificados como *S. epidermidis*, *S. warneri* y *S. pasteuri* puedan corresponder la población del fluido ruminal, con la posibilidad de ser parte de la microbiota de la piel o la cánula del bovino o una contaminación cruzada por manipulación durante el aislamiento.

En el cuarto clado se encuentra a *Selenomonas ruminantium* con los aislados 43 y 35, sin embargo; se observa una separación de ambos aislamientos entre sí y comparten similitud con las secuencias de referencia utilizadas. *Selenomonas ruminantium* ha sido descrito como

una bacteria no fibrolítica, que interviene en los procesos de degradación ruminales gracias a su sinergia con bacterias fibrolíticas como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* aumentando la capacidad de degradación y producción de propionato [26], la importancia de aislamientos como *Selenomonas ruminantium* está en el uso potencial con accesiones del banco del género *Ruminococcus* en procesos de degradación de forrajes, que puedan ser potencializados en bioproductos.

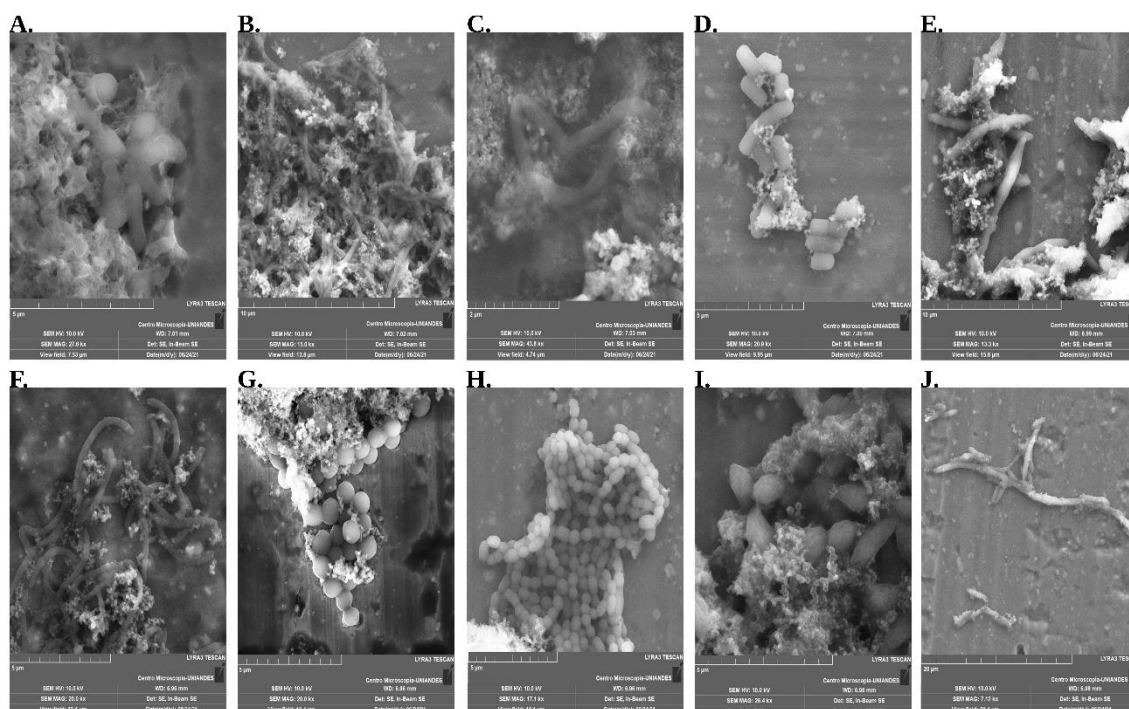
En el quinto clado se encuentran los aislamientos 7 y 6, 60 y 57 42 y 36, que pertenecen a la familia *Lachnospiraceae*, con los géneros *Pseudobutyrvibrio*, *Butyrvibrio* y *Oribacterium* respectivamente, los seis aislados fueron recuperados en el medio KNT a 3 y 7 días de incubación. Los resultados de identificación de los aislados 7 y 6 (Figura 6.7-F) no mostraron asignación de especie, lo cual se corrobora en el árbol filogenético al separarse de las especies *P. ruminis* y *P. xylanovorans* las cuales se encuentran más relacionadas entre sí que con los aislados. En el caso de los aislados 60 y 57 (Figura 6.7 B-C), presentaron porcentajes de identificación altos para las especies de *B. fibrisolvens* y *B. hungatei* con las bases de datos utilizadas (Tabla S6-Material suplementario), esto no se observa con las secuencias utilizadas como referencia, contrario a lo esperado se agrupan con *B. proteoclasticus*. Para la identificación de los aislados de *Oribacterium* (42 y 36) no se registró especie, la posibilidad de que se trate de otra especie podría indicarse por su separación en un subclado frente a las tres especies existentes para el género *O. assacharolitycum*, *O. sinus*, *O. parvum*, estos aislados fueron recuperados en KNT a los 3 días de incubación. Los aislados de *Oribacterium* sp difieren tanto de las secuencias usadas, así como de las morfologías descritas para las especies, la Figura 6.6 y Figura 6.8-E muestra las microscopías de contraste como electrónica por SEM, tratándose de bacilos alargados puntiagudos que forman cadenas o en solitario, con un tamaño de 10 µm. Los géneros *Pseudobutyrvibrio* y *Butyrvibrio* hacen parte de la microbiota ruminal representando una gran porción de los microorganismos ruminales cultivables, ambos contribuyen a la degradación de fibra y son de los pocos microorganismos capaces de degradar el xilano [27]. Hasta la fecha se conocen dos especies de *Pseudobutyrvibrio*, *P. ruminis* y *P. xylanivorans*, capaces de utilizar hemicelulosa, oligo y monosacáridos [28], y cuatro especies ruminales de *Butyrvibrio*, *B. fibrisolvens*, *B. crossotus*, *B. hungatei* y *B. proteoclasticus* [29], productoras de amilasas, celodextrinasas y 1-4-β-endoglucanasas, ambos géneros son productores de butirato [30]. Kopečný et al., Pidcock et al. [29], [30] reportaron la baja resolución del gen 16S rRNA para la determinación de especie en estos géneros, esto, debido a la alta variabilidad genética que existe entre cepas que han sido clasificadas dentro de la misma especie y la existencia de un bajo número de genes “core” y un alto número de genes “accesorios” y genomas abiertos, los autores sugieren una reclasificación mediante el uso del ANI a 32 géneros con 42 especies. Carrier, et al., 2004, describió el género *Oribacterium*, las especies descritas han sido aisladas de cavidad oral humana [31], [32], con un único reporte sobre *Oribacterium* aislado de rumen con capacidad de degradar pectina de plantas en el ambiente ruminal [33].



**Figura 6.6.** Micrografías y Fotografía del género *Oribacterium*. A y B: *O. parvum*, y *O. asaccharolyticum* [32]. C y D: *O. sinus* [31]. E: Coloración de gram del aislado 36 y 42. F: Fotografía de contraste de fases aislamiento 36, 40x. G: Fotografía de contraste de fases aislamiento 42, 40x.

Como sexto y séptimo clado, los aislados 56 y 58 identificados como *Actinomyces ruminicola*, y los aislados 47, 42, 43, 50, 54, 55, 53, 51, 52, 28 y 27 identificados como *Succinivibrio dextrinosolvans* se encuentran agrupados con las secuencias de referencia para cada especie, los trece aislados fueron aislados usando el medio KNT en ambos tiempos de incubación, la mayor parte de los aislados de *S. dextrinosolvans* fueron recuperados a siete días de incubación. El género *Actinomyces*, comprende diferentes especies que pueden afectar negativa o positivamente a los bovinos; un ejemplo es *A. bovis*, causante de actinomicosis caracterizado por abscesos y lesiones centradas en la mandíbula y cabeza [34]. Pero, especies como *A. ruminicola* y *A. nasicola* han sido descritas en el rumen [35], [36], *A. ruminicola* es una bacteria relativamente nueva, aislada de rumen de bovinos, capaz de hidrolizar xilano y almidón, además de producir ácido fórmico, acético y láctico, a partir de glucosa [36]; poco se conoce de su rol en procesos de fermentación ruminal, su morfología se describe como bacilos que se ramifican en ángulo agudo, los aislados se observan como bacilos cortos que se ramifican (Figura 6.7-A). *Succinivibrio dextrinosolvans* hace parte de la familia *Succinivibrionaceae* la cual ha sido poco descrita, esta bacteria es productora de ácido succínico [37], y además está involucrada en el metabolismo del nitrógeno el cual tiene un efecto en el desarrollo del rumiante [38], Bryant & Small (1956), reportaron este género del cual se desprenden dos grupos de acuerdo a su metabolismo fermentativo, así como diferencias en su morfología. Algunas cepas de *S. dextrinosolvans* son capaces de fermentar dextrina y maltosa indicando su papel en la hidrólisis de productos derivados de almidón,

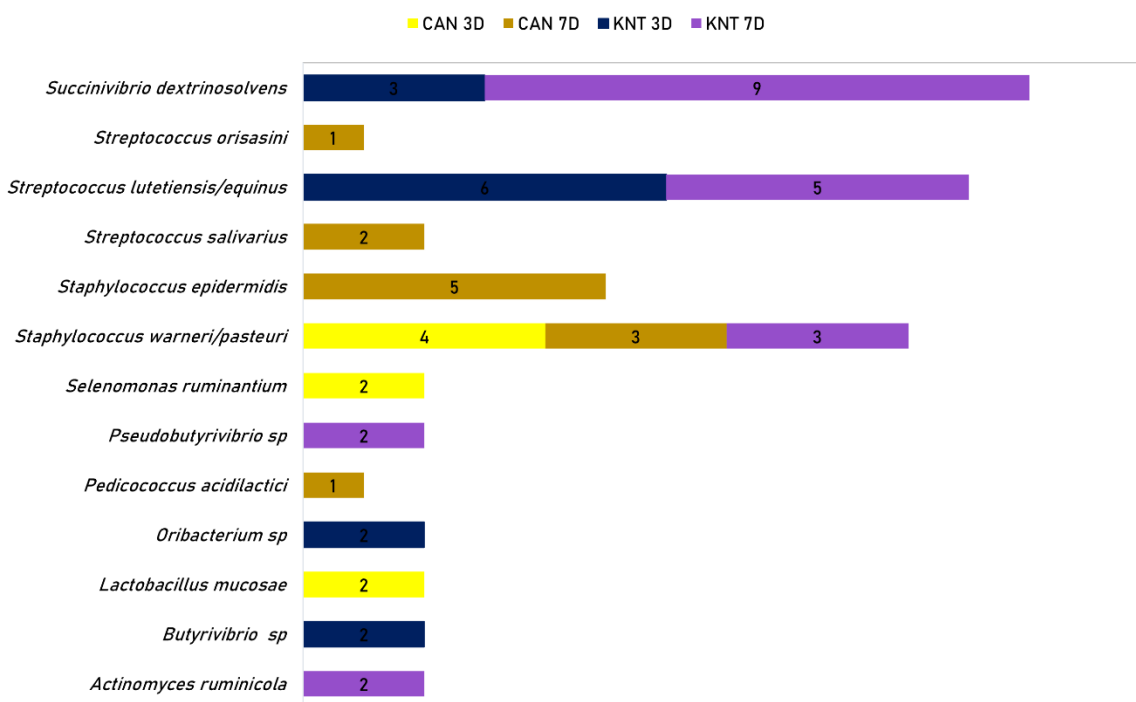
además de aumentar la concentración de propionato al producir ácido succínico como producto final de la fermentación de glucosa. Además, se describen dos tipos de bacilos, con un tamaño que oscila entre 1 a 5 µm de largo, de bordes puntiagudos de forma helicoidal o semihelicoidal, pueden ser cortos o largos y posterior a años de cultivo pueden perder su forma curvada [37], [38]. Dentro de los hallazgos en este estudio, dos tipos de morfologías fueron observadas para este microorganismo, la Figura 6.7 I-J, muestran los dos tipos de *Succinivibrio dextrinosolvens* recuperados, todas las cepas presentaron crecimiento en medio celobiosa con producción de gas, esta característica difiere por lo reportado por Bryant [37], al reportar que las mayoría de las cepas aisladas no fermentaban este disacárido.



**Figura 6.7.** Microscopia electrónica SEM, de 10 aislados recuperados en los medios CAN y KNT. A) *Actinomyces ruminicola*, B, C) *Butyrivibrio sp.*, D) *Limosilactobacillus mucosae*, E) *Oribacterium sp.*, F) *Pseudobutyrvibrio sp.*, G) *Staphylococcus pasteurii*, H) *Streptococcus orisasini*, I, J) *Succinivibrio dextrinosolvens*

La Figura 6.8 muestra la distribución de aislados según el medio y tiempo de incubación; en el medio KNT, 12 aislamientos *S. dextrinosolvens* fueron obtenidos en mayor proporción a los 7 días de incubación, seguido de 11 aislamientos del complejo *S. lutetiensis/equinus* con igual número de aislados por tiempo, 2 aislamientos de *Oribacterium sp.* y 2 *Butyrivibrio sp.* fueron obtenidos en 3 días de incubación, 2 *Pseudobutyrvibrio* y 2 *A. ruminicola* se obtuvieron en 7 días. El medio CAN, se obtuvieron 3 aislamientos del género *Streptococcus* con dos especies, ambos aislados en 7 días de incubación, 12 aislados del género *Staphylococcus* el complejo *S. warneri/pasteuri* recuperado en ambos tiempos de incubación, de igual manera tres aislamientos fueron recuperados en 7 días en KNT. Teniendo en cuenta

aquellos aislamientos que presentaron dos posibles especies para una sola secuencia se construyó un árbol filogenético utilizando el total de las secuencias obtenidas determinando la posición filogenética de los aislados.



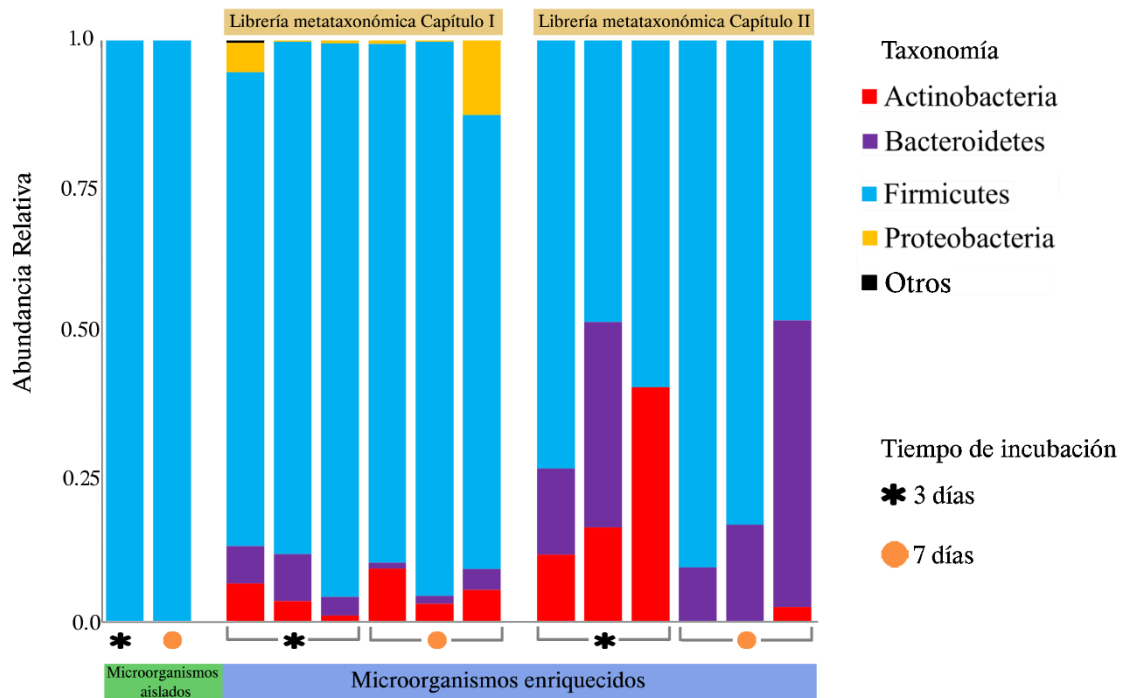
**Figura 6.8.** Distribución de géneros y especies aislados en cada uno de los tiempos en los medios CAN y KNT.

### 6.6.5 Comparación de la diversidad cultivable y no cultivable.

#### 6.6.5.1 Comparación de la composición de filos

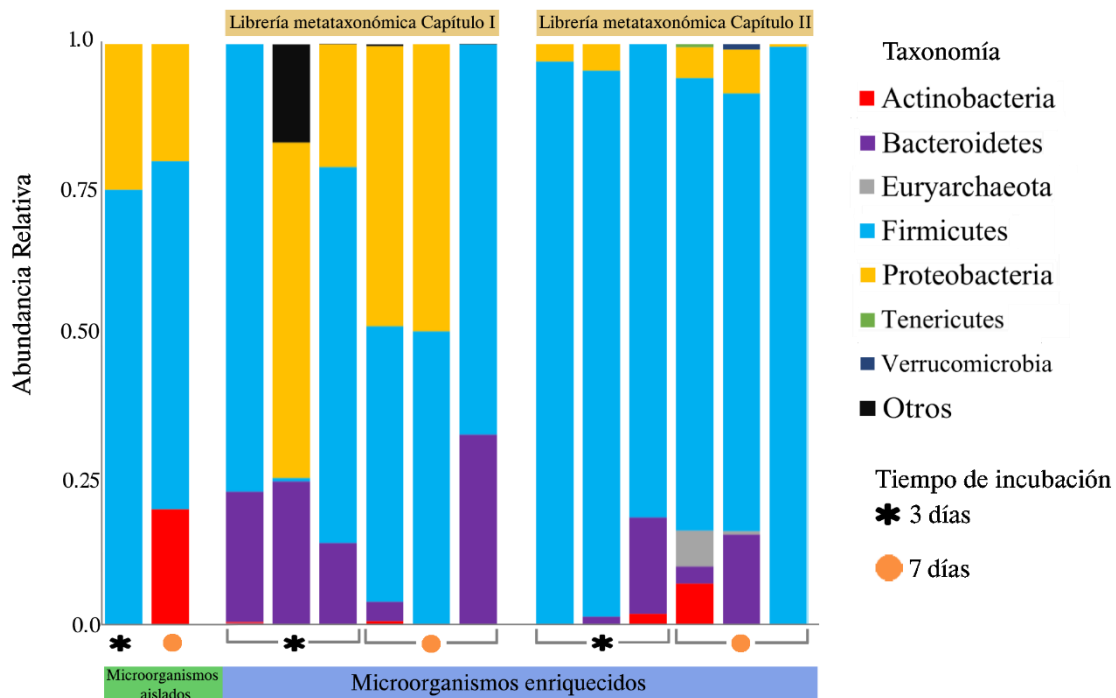
Un total de doce muestras (figura 6.1) de ambos medios utilizadas para el aislamiento de los microorganismos fueron secuenciadas y analizadas obteniendo un promedio de 12,370 lecturas con una longitud de 300 pb. Las lecturas fueron clasificadas en 166 OTUs asignados a 7 filos (Euryarchaeota, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia). Este capítulo no contempla el análisis del fluido ruminal colectado, por tanto, la determinación del porcentaje recuperado de la muestra inicial no fue calculado.





**Figura 6.9.** Gráfico de barras que describen la abundancia relativa de la composición de filos de los microorganismos aislados y su comparación con los microorganismos enriquecidos al utilizar el medio CAN en la dilución  $10^{-12}$  en ambos tiempos de incubación.

De acuerdo con la caracterización taxonómica y su comparación entre los resultados del capítulo I, se observa a nivel de filo (Figura 6.9) para el medio CAN y con abundancia superior al 1% la persistencia de los filos Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. Los porcentajes de aumento y disminución en comparación con el capítulo I se observaron de la siguiente manera: Las Actinobacterias presentaron un aumento en promedio de 3.71 % a 22.72 % en 3 días, a diferencia de la disminución de 5.89 % a 0.86 % cual se observa presente en una sola replica de los 7 días de incubación. En promedio los Bacteroidetes aumentaron para ambos tiempos con 5.94 % a 16.7% en 3 días y 2.03 % a 25.11 % en 7 días. Así mismo, los Firmicutes persisten siendo el filo dominante del medio por encima del 60%, para los 3 días se observa una disminución del 88.2 % al 60.58% y del 87.52 % al 74% para los 7 días. Las proteobacterias no se observaron en el enriquecimiento para este medio. De los 54 aislamientos recuperados, 20 fueron aislados en CAN y pertenecen únicamente al filo de los Firmicutes.



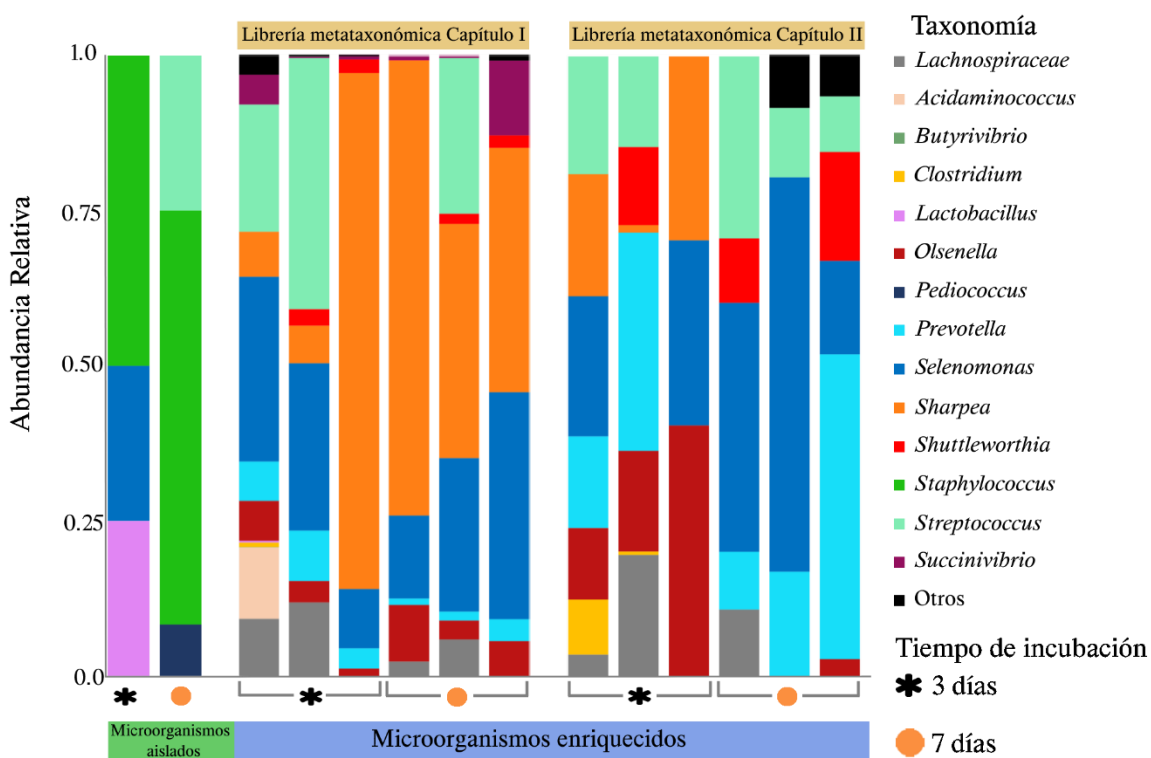
**Figura 6.10.** Gráfico de barras que describen la abundancia relativa de la composición de filos de los microorganismos aislados y su comparación con los microorganismos enriquecidos al utilizar el medio KNT en la dilución  $10^{-12}$  en ambos tiempos de incubación.

Por otra parte, el medio KNT (Figura 6.10) se observó persistencia de los filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. De forma puntual las Actinobacterias presentaron en promedio un aumento de 0.08 % a 0.50% en 3 días y 0.14 % a 2.26 % en 7 días, estos aumentos se observaron en una única replica para cada día. Los Bacteroidetes se observaron presentes en las tres réplicas del día 3 en los resultados del capítulo I, sin embargo, se observa un descenso en el enriquecimiento para ambos tiempos en promedio del 20.26 % a 5.88 % en 3 días y 11.94 % a 6.05 % en 7 días. Los Firmicutes por su parte se observaron enriquecidos pasando de 47.6 % a 91.13 % y de 55.14 % a 84.55 % en promedio para 3 y 7 días respectivamente. Las Proteobacterias que anteriormente se encontraban presentes en el día 3 con un promedio de 26.39 % disminuyeron a 2.49 %, en el día 7 se observó una disminución notable de su abundancia con porcentaje de 32 % a 4.43 %. Adicional se observaron los filos de Euryarchaeota, Tenericutes y Verrucomicrobia como componentes de la microbiota enriquecida del medio, los tres filos presentes a 7 días de incubación con porcentajes de 2.24 %, 0.17 % y 0.30 % respectivamente. Los 34 aislados recuperados en este medio, hacen parte de los filos Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacteria, destacando que tanto las Actinobacterias como las Proteobacterias hacen parte de la comunidad menos abundante del medio según los resultados meta taxonómicos.

Las diferencias en la abundancia pueden estar relacionadas con las características del fluido muestreado, aun cuando el muestreo se realizó bajo las mismas condiciones, variables asociadas a la ingesta de forraje y agua pueden alterar la composición microbiana [39], la cual se ve reflejada en la capacidad de recuperación en los medios de cultivo. Los resultados en cuanto a filo muestran que los medios tienen una alta reproducibilidad de los filos mencionados.

#### 6.6.5.2 Comparación de la composición de géneros.

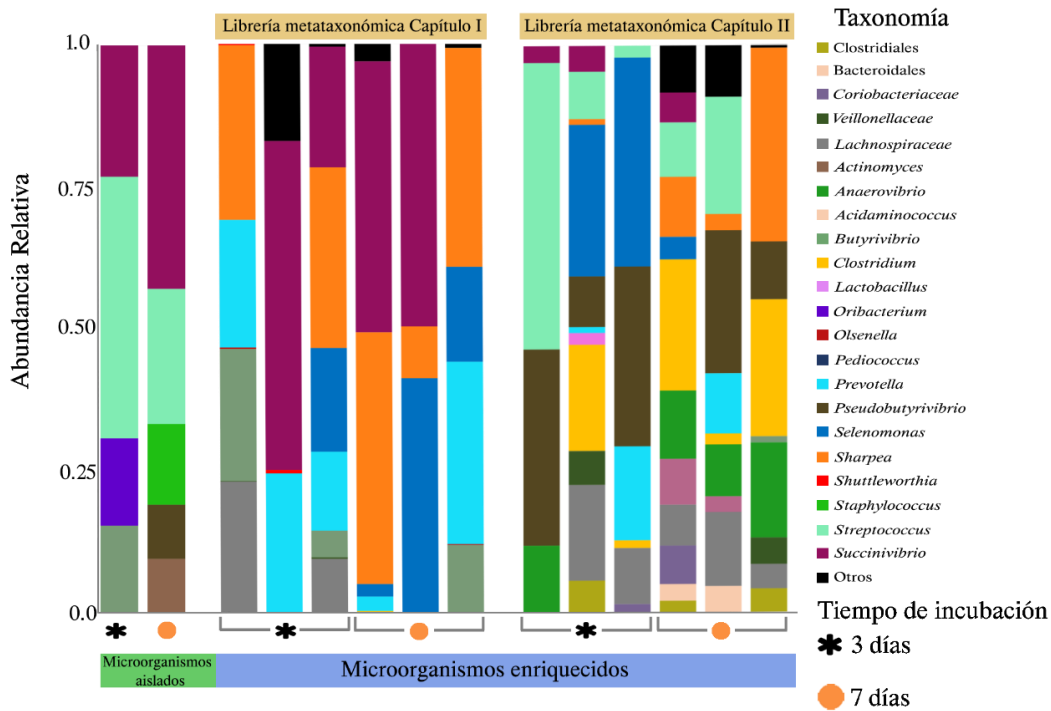
La determinación del enriquecimiento de microorganismos a nivel de géneros en cada uno de los medios de cultivo permite corroborar la reproducibilidad de los resultados en el tiempo y con la literatura para el caso del medio KNT.



**Figura 6.11.** Gráfico de barras que describen la abundancia relativa de la composición de géneros de los microorganismos aislados y su comparación con los microorganismos enriquecidos al utilizar el medio CAN en la dilución  $10^{-12}$  en ambos tiempos de incubación.

La figura 6.11 corresponde a la distribución de abundancia relativa para los géneros del medio CAN y su comparación entre librerías y los géneros aislados. Los microorganismos de los géneros *Olsenella*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Sharpea*, *Shuttleworthia* y *Streptococcus*, siguen siendo enriquecidos por el medio de cultivo. El género *Olsenella* se observa el enriquecimiento a 3 días aumentando de 3.66 % a 22.72 % y su disminución de 5.89 % a 0.86 % en 7 días, siendo inverso el comportamiento a lo observado en el capítulo I con el

aumento de la abundancia de este género en 7 días. *Prevotella* anteriormente se observó en una abundancia menor al 10 %, aumentando para ambos días de 5.91 % a 16.70 % y 2.03 % a 25.11 % en 3 y 7 días respectivamente. *Selenomonas* al igual que en los resultados anteriores se observó en ambos días de incubación, su enriquecimiento se mantuvo en porcentajes cercanos a lo observado previamente, siendo de 22.18 % a 17.52 % en 3 días y 24.95 % a 39.69% en 7 días. *Sharpea* uno de los géneros más abundantes para CAN a 7 días de incubación, presentó una disminución en su enriquecimiento de 32.25 % a 13.89% en 3 días y 50.30% a 0% a 7 días. *Streptococcus* se observó para ambos tiempos de incubación con 20.39 % a 11.23 % para 3 días y 8.39 % a 16.53 % para 7 días. *Olsenella*, *Prevotella*, *Selenomonas* y *Streptococcus*, son microorganismos no celulolíticos [40], su metabolismo está relacionado con la fermentación de carbohidratos simples y la producción de ácidos como lactato, butirato, acetato y succinato por parte de *Prevotella*, el cual no se ve inhibido por pH bajos [41], [42], la composición del medio podría jugar un papel determinante en el enriquecimiento de estos microorganismos, al poseer como única fuente de carbono glucosa, donde su utilización podría aumentar el pH del medio e inhibir otras poblaciones. El género *Succinivibrio* se observó en una abundancia baja en ambos días en los resultados anteriores, con 1.83 % y 4.35% para 3 y 7 días de incubación, mientras que para los resultados de este capítulo no se observó abundancia de este género en ninguna de las muestras. *Shuttleworthia* se observó en un primer momento con abundancias menores al 2% para ambos días de incubación, sin embargo, los resultados muestran un enriquecimiento para ambos días de 2.5 y 7.5 veces más en cada tiempo, puntualmente las abundancias incrementaron de 1.62 % a 4.21 % y 1.24 % a 9.35 % en 3 y 7 días, este es un microorganismo poco estudiado del cual se conoce únicamente una especie (*S.satelles*), descrita como sacarolítica productora de acetato, butirato y lactato como productos finales en la fermentación de glucosa [43]. Finalmente, la familia *Lachnospiraceae* nuevamente se observó en el medio manteniendo abundancias similares en el tiempo, con 6.94 % a 7.56 % en 3 días y 2.64% a 3.53% en 7 días. De forma general el medio tiene reproducibilidad en el tiempo, al enriquecer en su mayoría los mismos géneros, sin embargo, en la capacidad de recuperar se observa que de 13 géneros clasificados en librería solo 2 géneros (15 %) hacen parte de la fracción cultivable. De los aislados obtenidos (#20), el 75 % (15 aislados) no se observan en los resultados de las librerías metataxonómicas realizadas, correspondiendo a 12 aislados del género *Staphylococcus*, 2 aislados del género *Lactobacillus*, 1 aislado del género *Pediococcus*, este resultado puede sugerir que estos taxones se encuentran en una abundancia baja que no es capaz de ser capturada durante la preparación de la librería metataxonómica. El 15 % restante de aislados (*Selenomonas* y *Streptococcus*) hacen parte de los géneros enriquecidos y que han estado presentes en las dos librerías realizadas.



**Figura 6.12.** Gráfico de barras que describen la abundancia relativa de la composición de géneros de los microorganismos aislados y su comparación con los microorganismos enriquecidos al utilizar el medio KNT en la dilución  $10^{-12}$  en ambos tiempos de incubación.

Como resultado de la comparación de las librerías realizadas en el tiempo y su relación con lo aislado para el medio KNT, se observa que a diferencia de la similitud entre librerías a nivel de filo (Figura 6.12) los géneros enriquecidos aquí difieren de lo observado en la primera librería, anteriormente la abundancia relativa estaba dominada por los géneros *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Sharpea*, *Succinivibrio* y *Selenomonas* en la mayoría de las réplicas y en ambos tiempos de incubación. Para este capítulo, existe una mayor diversidad de poblaciones, un ejemplo de esto es la abundancia de otros géneros que no habían sido clasificados antes o que se encontraban por debajo del 1% de abundancia como: *Pseudobutyrvibrio*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Anaerovibrio*. Adicionalmente, se observan otros microorganismos en abundancias menores como, el género *Lactobacillus*, las familias *Veillonellaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, y los órdenes *Clostridiales*, *Bacteroidales*, que no hacían parte de lo observado anteriormente. Este medio fue reportado por Kenters et al., 2011[3], en el cual a partir de 1000 tubos se obtuvieron 54 aislamientos utilizando extinción de muestra por dilución trece veces ( $10^{-13}$ ), los aislamientos fueron relacionados con los géneros de *Anaerovibrio*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Lachnospira*, *Oribacterium*, *Pseudobutyrvibrio*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, y *Treponema*. Algunos de estos géneros se encuentran identificados en la librería, a excepción de *Coprococcus*, *Lachnospira* y *Oribacterium*, sin embargo, estos géneros hacen parte de la familia *Lachnospiraceae* la cual se encuentra presente en los OTUs de la librería. Lo anterior

sugiere que la posible variabilidad en enriquecimiento de unas poblaciones u otras en las dos librerías puede estar ligada al fluido ruminal utilizado para el medio, puesto que este componente contiene nutrientes intrínsecos que pueden no ser removidos durante la clarificación, generando condiciones cercanas a la natural proporcionando factores de crecimiento que permiten mayor variedad y riqueza de poblaciones [44]. Los géneros *Anaerovibrio*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Pseudobutyrvibrio* fueron enriquecidos, pasaron de tener un 0 % como abundancia en la librería anterior a tener abundancia de 4 % y 12.6 %, 6.7 % y 16.4 %, 1 % (3 días únicamente), 25 % y 11.8 %, 20.3 % y 10 % respectivamente para los dos días de incubación. En cuanto a los géneros que se observaron dominantes anteriormente pero que continúan presentes se tiene que *Butyrvibrio* ha disminuido notablemente de 9.3 % a 0 % en 3 días y de 3.9 % a 0.4 % en 7 días. por otra parte, *Prevotella* se observa en baja abundancia pasando de estar en 20.3 % en 3 días a 5.9% y de 11.5 % a 3.5% en 7 días. *Selenomonas* con una abundancia mayor en 3 días con 21.2 % a diferencia de 6.1 % observado anteriormente, de manera contraria se observa la disminución a 7 días pasando de 20 % a 1.3 %. Según los resultados de la librería del capítulo anterior, los géneros de *Sharpea* y *Succinivibrio* eran dominantes para ambos días de incubación, en esta segunda librería su abundancia disminuyó considerablemente pasando de 20.9 % a 0.3 % en 3 días y de 30.7 % a 15.9 % en 7 días, en el caso de *Succinivibrio* pasó de 26.4 % a 2.5% y 32.4 % a 1.8 % en ambos días de manera correspondiente. De acuerdo con la clasificación taxonómica de la librería del medio KNT se observa que de 10 géneros. 4 hacen parte de la fracción cultivable (*Butyrvibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Succinivibrio* y *Streptococcus*). Del total de aislamientos obtenidos (36 aislados), el 79 % (27 aislados) se observan en las librerías taxonómicas, mientras que el 21 % (7 aislados) restante que corresponden a *Actinomyces*, *Oribacterium* y *Staphylococcus* no se encuentran en la clasificación.

## 6.7 Conclusión.

Gracias a las condiciones de medio de cultivo y dilución seleccionadas del capítulo anterior, se logró el aislamiento 54 aislamientos identificados con los géneros y especies de: *Actinomyces ruminicola*, *Butyrvibrio* sp, *Limosilactobacillus mucosae*, *Oribacterium* sp, *Pediococcus acidilactici*, *Pseudobutyrvibrio* sp, *Selenomonas ruminantium* *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus orisasini*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus salivarius* y *Succinivibrio dextrinosolvans*. Varios de estos microorganismos no habían sido aislados antes en la colección CMINA bajo los medios tradicionales de cultivo. En adición, el uso de librerías metataxonómicas permitió establecer que el medio CAN cuenta con una alta reproducibilidad en el tiempo, al recuperar el 90 % de los taxones clasificados en el capítulo I, de manera contraria el medio KNT mostró un alto porcentaje de variación con respecto a lo visto en capítulo anterior. A pesar de ello, el mayor porcentaje de recuperación fue obtenido en el medio KNT. Los resultados obtenidos en la utilización del medio CAN constituyen hasta ahora el primer reporte científico de su uso y su capacidad de aislamiento.

## Referencias.

- [1] N. Kopeloff, "Modified Gram Stains," *J. Infect. Dis.*, Vol. 31, No. 5, Pp. 480–482, Nov. 1922.
- [2] H. Heberle, G. V. Meirelles, F. R. Da Silva, G. P. Telles, And R. Minghim, "Interactivenn: A Web-Based Tool For The Analysis Of Sets Through Venn Diagrams," *Bmc Bioinforma.* 2015 161, Vol. 16, No. 1, Pp. 1–7, May 2015.
- [3] N. Kenters, G. Henderson, J. Jeyanathan, S. Kittelmann, And P. H. Janssen, "Isolation Of Previously Uncultured Rumen Bacteria By Dilution To Extinction Using A New Liquid Culture Medium," *J. Microbiol. Methods*, Vol. 84, No. 1, Pp. 52–60, 2011.
- [4] T. J. Beveridge, "Mechanism Of Gram Variability In Select Bacteria," *J. Bacteriol.*, Vol. 172, No. 3, Pp. 1609–1620, 1990.
- [5] A. Pompilio, G. Di Bonaventura, And G. Gherardi, "An Overview On Streptococcus Bovis/Streptococcus Equinus Complex Isolates: Identification To The Species/Subspecies Level And Antibiotic Resistance," *International Journal Of Molecular Sciences*, Vol. 20, No. 3, 2019.
- [6] D. Aphale, A. Natu, S. Laldas, And A. Kulkarni, "Administration Of Streptococcus Bovis Isolated From Sheep Rumen Digesta On Rumen Function And Physiology As Evaluated In A Rumen Simulation Technique System," *Vet. World*, Vol. 12, No. 9, Pp. 1362–1371, 2019.
- [7] D. Aphale, A. Natu, S. Laldas, And A. Kulkarni, "Administration Of Streptococcus Bovis Isolated From Sheep Rumen Digesta On Rumen Function And Physiology As Evaluated In A Rumen Simulation Technique System," *Vet. World*, Vol. 12, No. 9, Pp. 1362–1371, 2019.
- [8] T. G. Nagaraja And E. C. Titgemeyer, "Ruminal Acidosis In Beef Cattle: The Current Microbiological And Nutritional Outlook," *J. Dairy Sci.*, Vol. 90, No. S, Pp. E17–E38, Jun. 2007.
- [9] C. Jans et al., "Phylogenetic, Epidemiological And Functional Analyses Of The Streptococcus Bovis/Streptococcus Equinus Complex Through An Overarching Mlst Scheme," *Bmc Microbiol.*, Vol. 16, No. 1, Pp. 1–16, Jun. 2016.
- [10] G. Kaci et al., "Anti-Inflammatory Properties Of Streptococcus Salivarius, A Commensal Bacterium Of The Oral Cavity And Digestive Tract," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 80, No. 3, Pp. 928–934, Feb. 2014.
- [11] F. Chaffanel et al., "Surface Proteins Involved In The Adhesion Of Streptococcus Salivarius To Human Intestinal Epithelial Cells," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 102, No. 6, Pp. 2851–2865, 2018.
- [12] H.-M. Nam et al., "Antimicrobial Resistance Of Streptococci Isolated From Mastitic Bovine Milk Samples In Korea," 2009.
- [13] O. Hyink, P. A. Wescombe, M. Upton, N. Ragland, J. P. Burton, And J. R. Tagg, "Salivaricin A2 And The Novel Lantibiotic Salivaricin B Are Encoded At Adjacent Loci On A 190-Kilobase Transmissible Megaplasmid In The Oral Probiotic Strain Streptococcus Salivarius K12," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 73, No. 4, Pp. 1107–1113, Feb. 2007.
- [14] K. Takada, M. Saito, O. Tsudukibashi, T. Hiroi, And M. Hirasawa, "Streptococcus Orisasini Sp. Nov. And Streptococcus Dentasini Sp. Nov., Isolated From The Oral Cavity Of Donkeys," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 63, No. Part8, Pp. 2782–2786, 2013.
- [15] V. D. V. Valeriano, J. K. Oh, B. B. Bagon, H. Kim, And D. K. Kang, "Comparative Genomic Analysis Of Lactobacillus Mucosae Lm1 Identifies Potential Niche-Specific Genes And Pathways For Gastrointestinal Adaptation," *Genomics*, Vol. 111, No. 1, Pp. 24–33, Jan. 2019.
- [16] S. Roos, F. Karner, L. Axelsson, And H. Jonsson, "Lactobacillus Mucosae Sp. Nov., A New Species With In Vitro Mucus-Binding Activity Isolated From Pig Intestine," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 50, No. 1, Pp. 251–258, Jan. 2000.
- [17] J. Hee Lee et al., "Genome Sequence Of Lactobacillus Mucosae Lm1, Isolated From Piglet Feces," 2012.
- [18] M. Busconi, S. Reggi, And C. Fogher, "Evaluation Of Biodiversity Of Lactic Acid Bacteria Microbiota In The Calf Intestinal Tracts," *Antonie Van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, Vol. 94, No. 2, Pp. 145–155, 2008.
- [19] M. A. Cobos, A. L. De Coss, N. D. Ramirez, S. S. Gonzalez, And R. Ferrera Cerrato, "Pediococcus Acidilactici Isolated From The Rumen Of Lambs With Rumen Acidosis, 16s Rna Identification And Sensibility To Monensin And Lasalocid," *Res. Vet. Sci.*, Vol. 90, No. 1, Pp. 26–30, Feb. 2011.
- [20] T. Takahashi, I. Satoh, And N. Kikuchi, "Phylogenetic Relationships Of 38 Taxa Of The Genus Staphylococcus Based On 16s Rna Gene Sequence Analysis," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 49, No. 2, Pp. 725–728, 1999.
- [21] R. Barigye, L. Schaan, P. S. Gibbs, E. Schamber, And N. W. Dyer, "Diagnostic Evidence Of Staphylococcus Warneri As A Possible Cause Of Bovine Abortion," 2007.
- [22] H. Pauer, T. Glatthardt, N. V. Ferreira, R. B. R. Ferreira, And L. C. M. Antunes, "Bioactive Molecules Of The Human Microbiome: Skin, Respiratory Tract, Intestine," In *Microbiome And Metabolome In Diagnosis, Therapy, And Other Strategic Applications*, Elsevier, 2019, Pp. 115–125.
- [23] B. M. Thorberg, I. Kühn, F. M. Aarestrup, B. Brändström, P. Jonsson, And M. L. Danielsson-Tham, "Pheno- And Genotyping Of Staphylococcus Epidermidis Isolated From Bovine Milk And Human Skin," *Vet. Microbiol.*, Vol. 115, No. 1–3, Pp. 163–172, Jun. 2006.
- [24] C. Uribe-Alvarez et al., "Staphylococcus Epidermidis: Metabolic Adaptation And Biofilm Formation In Response To Different Oxygen Concentrations," Vol. 74, No. 1, 2016.
- [25] M.-C. Rowlinson, P. Lebourgeois, K. Ward, Y. Song, S. M. Finegold, And D. A. Bruckner, "Isolation Of A Strictly Anaerobic Strain Of Staphylococcus Epidermidis," *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 44, No. 3, Pp. 857–860, 2006.
- [26] S. Sawanon, S. Koike, And Y. Kobayashi, "Evidence For The Possible Involvement Of Selenomonas Ruminantium In Rumen Fiber Digestion," *Fems Microbiol. Lett.*, Vol. 325, No. 2, Pp. 170–179, 2011.
- [27] S. Poonko, P. Boonsaen, And S. Sawano, "Fibrolitic Bacterium Isolated From Buffalo Rumen Phylogenetically Closely Related To Butyrivibrios And Pseudobutyrvibrios," *Kasetsart J. - Nat. Sci.*, Vol. 49, No. 4, Pp. 547–559, 2015.
- [28] N. Palevich et al., "Comparative Genomics Of Rumen Butyrivibrio Spp. Uncovers A Continuum Of Polysaccharide-Degrading Capabilities," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 86, No. 1, 2020.
- [29] S. E. Pidcock et al., "Phylogenetic Systematics Of Butyrivibrio And Pseudobutyrvibrio Genomes Illustrate Vast Taxonomic Diversity, Open Genomes And An Abundance Of Carbohydrate-Active Enzyme Family Isoforms," *Microb. Genomics*, Vol. 7, No. 10, 2021.
- [30] J. Kopečný, M. Zorec, J. Mrázek, Y. Kobayashi, And R. Marinšek-Logar, "Butyrivibrio Hungatei Sp. Nov. And Pseudobutyrvibrio Xylanivorans Sp. Nov., Butyrate-Producing Bacteria From The Rumen," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol.

- 53, No. 1, Pp. 201–209, Jan. 2003.
- [31] J. P. Carlier, G. K'ouas, I. Bonne, A. Lozniewski, And F. Mory, "Oribacterium Sinus Gen. Nov., Sp. Nov., Within The Family 'Lachnospiraceae' (Phylum Firmicutes)," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 54, No. 5, Pp. 1611–1615, 2004.
- [32] M. V Sizova et al., "Oribacterium Parvum Sp. Nov. And Oribacterium Asaccharolyticum Sp. Nov., Obligately Anaerobic Bacteria From The Human Oral Cavity, And Emended Description Of The Genus Oribacterium," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 64, No. Part 8, Pp. 2642–2649, 2014.
- [33] S. Kang, S. Denman, And C. Mcsweney, "Draft Genome Sequence And Annotation Of Oribacterium Sp. Strain C9, Isolated From A Cattle Rumen," 2019.
- [34] W. J. Underwood, R. Blauwiel, M. L. Delano, R. Gillesby, S. A. Mischler, And A. Schoell, "Chapter 15 - Biology And Diseases Of Ruminants (Sheep, Goats, And Cattle)," In *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*, Elsevier Inc., 2015, Pp. 623–694.
- [35] T. Nyonyo, T. Shinkai, And M. Mitsumori, "Improved Culturability Of Cellulolytic Rumen Bacteria And Phylogenetic Diversity Of Culturable Cellulolytic And Xylanolytic Bacteria Newly Isolated From The Bovine Rumen," *Fems Microbiol. Ecol.*, Vol. 88, No. 3, Pp. 528–537, 2014.
- [36] D. An, S. Cai, And X. Dong, "Actinomyces Ruminicola Sp. Nov., Isolated From Cattle Rumen," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 56, No. 9, Pp. 2043–2048, Sep. 2006.
- [37] M. P. Bryant And N. Small, "Characteristics Of Two New Genera Of Anaerobic Curved Rods Isolated From The Rumen Of Cattle.," *J. Bacteriol.*, Vol. 72, No. 1, Pp. 22–26, 1956.
- [38] S. Hailemariam, S. Zhao, And J. Wang, "Complete Genome Sequencing And Transcriptome Analysis Of Nitrogen Metabolism Of *Succinivibrio Dextrinosolvens* Strain Z6 Isolated From Dairy Cow Rumen," *Front. Microbiol.*, Vol. 11, 2020.
- [39] E. Jami And I. Mizrahi, "Composition And Similarity Of Bovine Rumen Microbiota Across Individual Animals," Vol. 7, No. 3, Pp. 1–8, 2012.
- [40] C. Atasoglu, C. Valdés, N. D. Walker, C. J. Newbold, And R. J. Wallace, "De Novo Synthesis Of Amino Acids By The Ruminal Bacteria *Prevotella Bryantii* B14, *Selenomonas Ruminantium* Hd4, And *Streptococcus Bovis* Es1," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, No. 8, Pp. 2836–2843, 1998.
- [41] J. Purushe et al., "Comparative Genome Analysis Of *Prevotella Ruminicola* And *Prevotella Bryantii*: Insights Into Their Environmental Niche," *Microb. Ecol.*, Vol. 60, No. 4, Pp. 721–729, 2010.
- [42] J. B. Russell And D. B. Wilson, "Why Are Ruminant Cellulolytic Bacteria Unable To Digest Cellulose At Low Ph?," *J. Dairy Sci.*, Vol. 79, No. 8, Pp. 1503–1509, 1996.
- [43] J. Downes, M. A. Munson, D. R. Radford, D. A. Spratt, And W. G. Wade, "Shuttleworthia Satelles Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated From The Human Oral Cavity.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 52, No. 5, Pp. 1469–1475, Sep. 2002.
- [44] T. Zehavi, M. Probst, And I. Mizrahi, "Insights Into The Culturomics Of The Rumen Microbiome," *Front. Microbiol.*, Vol. 9, No. August, Pp. 1–10, 2018.



### Capítulo III

## POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

Asociado al objetivo: Determinar el potencial antimicrobiano de los microorganismos recuperados contra patógenos de relevancia en ganadería.

### Resumen

Diferentes interacciones microbianas se han descrito de acuerdo con el tipo de asociación entre comunidades, tales como el mutualismo y sinergismo, comensalismo, parasitismo y predación, amensalismo y competencia. El rumen es un ambiente altamente complejo en el que múltiples especies compiten por el uso de las fuentes de carbono estructural y los subproductos de su degradación, debido a esta competencia, los grupos microbianos han desarrollado estrategias para inhibir el crecimiento de otros, una de estas estrategias es la producción de compuesto con capacidad antimicrobiana (AMP). Los compuestos antimicrobianos son de gran interés para la bioprospección debido al potencial que tienen en la inhibición de crecimiento de patógenos o microorganismos no deseados. Para explorar el potencial antimicrobiano de aislamientos ruminales, se seleccionaron 35 aislamientos obtenidos en el capítulo II. De este grupo 26 aislados fueron utilizados como antagonistas, mientras que los 9 aislados restantes pertenecientes a los géneros de *Streptococcus* y *Staphylococcus*, fueron utilizados con doble propósito, como microorganismos antagonistas y microorganismos patógenos. En adición, se utilizó la cepa *E.coli* O157:H7 en el grupo de patógenos. La caracterización del potencial antimicrobiano se realizó en dos etapas: En la primera etapa se realizó un screening de la capacidad antagonica mediante la técnica de difusión en agar, donde se enfrentó el cultivo de cada antagonista versus los 10 patógenos. Esta etapa permitió seleccionar aislados con resultados de inhibición. En la segunda etapa se evaluó el si la acción inhibitoria se debía a algún compuesto soluble liberado al medio o si era necesario la presencias de las células, para esto se determinó de forma cuantitativa el porcentaje de inhibición de los aislados sobre las células de los patógenos, utilizando cuatro fracciones a partir del cultivo de cada aislamiento: Sobrenadante filtrado (SF), sobrenadante filtrado concentrado (SFC), cultivo (C) y células resuspendidas en solución salina 0.85 % (v/v) (CSN). Para esto se utilizó la lectura de absorbancia de los cultivos en placas multipozo. Como resultados de los 35 aislados evaluados durante el screening, 21 cepas mostraron potencial de inhibición frente a *E. coli* O157:H7. En los resultados cuantitativos, de 84 fracciones totales evaluadas, 16 fracciones mostraron ser capaces de inhibir más del 50% al patógeno, 59 fracciones inhiben menos de un 50 %, mientras que 9 no mostraron ningun tipo de inhibición, por el contrario aumentaron el crecimiento del patógeno hasta un 20% más que el control utilizado de *E. coli* O157:H7. Las fracciones con mayor porcentaje de inhibición (superiores al 50%) pertenecieron a los cultivos de *Limosilactobacillus mucosae*, *Pediococcus acidilactici*, *Succinivibrio dextrinosolvans* y *Streptococcus orisasini*. Los resultados de este capítulo dan una aproximación al potencial antimicrobiano de bacterias que participan en la fermentación ruminal, expandiendo el conocimiento ecológico de este ecosistema.

## 7. Metodología

### 7.1 Cultivo de microorganismos

#### 7.1.1 Cultivo de BAR

Los microorganismos obtenidos en el capítulo II fueron reactivados desde criovial en los medios del que fueron aislados, utilizando CAN y medio Celobiosa para los descritos en medio KNT; todos fueron incubados por 48 h a  $39^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , posterior a este tiempo se realizó un pase a un nuevo medio, dejando un tiempo de incubación de 24 h.

#### 7.1.2 Cultivo de patógeno

Se seleccionó una cepa de *Escherichia coli* O157:H7 perteneciente a la colección CMINA, la cual se reactivó desde criovial en medio BHI, incubando por 24 h a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  posterior a este tiempo se realizó un pase a nuevo medio, las condiciones de incubación se mantuvieron.

### 7.2 Screening de actividad antimicrobiana

Para el screening, se utilizaron aislados entre los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* a modo de patógeno, los cuales han sido reportados como causantes de enfermedades en bovinos y humanos[1]–[4], aquellos aislados diferentes a estos dos géneros fueron utilizados como los microorganismos antagonistas a ser evaluados, en adición los aislados usados como patógenos fueron evaluados entre ellos.

#### 7.2.1 Método de difusión en agar

*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus warneri* (aislados: 1, 21, 29), *Staphylococcus pasteurii* (aislados: 3, 45), *Streptococcus salivarius* (aislado: 16), *Streptococcus lutetiensis* (aislado: 8), *Streptococcus equinus* (aislado: 23), *Streptococcus orisasini* (aislado: 30) fueron utilizados como patógenos. *Pediococcus acidilactici* (aislado: 13), *Pseudobutyrvibrio* sp (aislados: 6,7), *Selenomonas ruminantium* (aislados: 20, 35, 49), *Succinivibrio dextrinosolvans* (aislados: 27, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55), *Limosilactobacillus mucosae* (aislado: 33, 39), *Oribacterium* sp (aislados: 36, 42), *Actinomyces ruminicola* (aislados: 56, 58), *Butyrvibrio* spp (aislados: 57, 60) fueron utilizados como microorganismos antagonistas, incluyendo los aislados de *Staphylococcus* y *Streptococcus* mencionados inicialmente. La numeración de los aislados corresponde a la tabla 6.1 del capítulo 2.

Todos los patógenos fueron ajustados a una concentración de  $1 \times 10^8$ , posteriormente se depositó una alícuota de 100  $\mu$ L para siembra masiva utilizando escobillones estériles, sobre agar CAN, agar Celobiosa y agar BHI según el medio de crecimiento del patógeno. Posterior a la inoculación y secado de la caja, se depositaron gotas de 10  $\mu$ L de cultivo de cada uno de los aislados a ser evaluados sobre la capa inoculada. Las cajas fueron incubadas a  $39 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  para los aislados, mientras que para las evaluaciones con *E. coli* se utilizó una temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , en ambos casos se mantuvo la condición de anaerobiosis con sobres de anaerobiosis (Anerogen™, Thermo Scientific™, MA, USA), el ensayo se realizó por triplicado.

### 7.2.2 Evaluación de la fracción con actividad antimicrobiana en placa multipozo.

Para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana se utilizaron placas de 96 pozos (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, A-KR), con un volumen final por pozo de 200  $\mu$ L en relación 1:1 (patógeno: tratamiento). El patógeno fue utilizado en una concentración de  $1 \times 10^8$ , mientras que los tratamientos utilizados se obtuvieron mediante el fraccionamiento del cultivo de cada antagonista con resultados positivos de inhibición.

Tratamiento 1: Sobrenadante filtrado (SF). Para ello se tomó 1.5 mL de cultivo completo en tubos de 2 mL, posteriormente se centrifugó a 10000x g por 5 min, el sobrenadante recolectado se filtró por membranas estériles de 0.22  $\mu$ m (MF-Millipore®, Merck KGaA, DEU, DA).

Tratamiento 2: Sobrenadante filtrado concentrado (SFC): El proceso del tratamiento 1 fue repetido para la obtención del sobrenadante filtrado, el cual se concentró en un Vap® DNA Concentrator (LABCONCO, Kansas City, MO) a  $37^\circ\text{C}$  x 1 h, hasta obtener la mitad del volumen filtrado.

Tratamiento 3: Células en solución salina (CSN): Se tomó 1.5 mL de cultivo completo en tubos de 2 mL, posteriormente se centrifugó a 10000x g por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet de células fue lavado y resuspendido en 1 mL de solución salina 0.85 % (p/v), el cual se retiró centrifugado a 10000x g por 5 min, este proceso fue realizado dos veces. El pellet lavado fue resuspendido en 1 mL de solución salina 0.85 % (p/v).

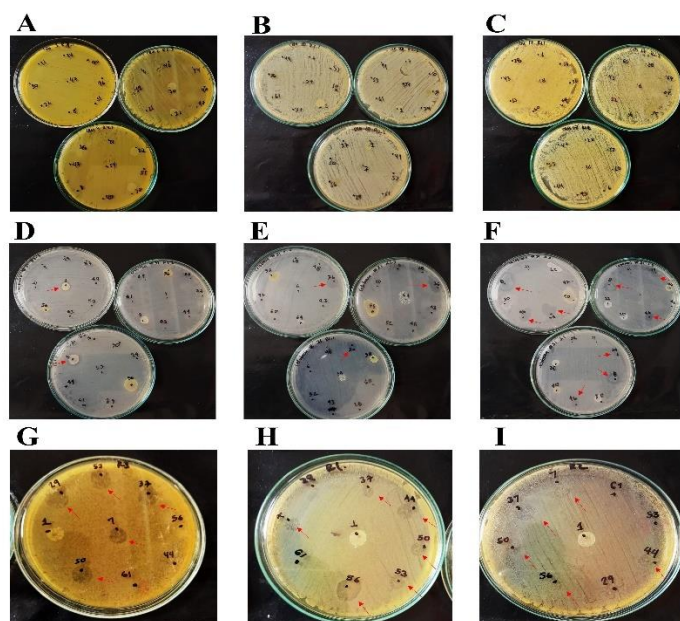
Tratamiento 4: Cultivo completo (C): Se tomó 1 mL del cultivo total.

Para el diseño de las placas se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento, los medios CAN, Celobiosa y MRS fueron utilizados como controles negativos. Las placas fueron leídas por espectrofotometría a una absorbancia a 600 nm (BioTek™ Cytation™ 3, VT, USA) en intervalos de 20 min por 20 h.

## 7.3 Resultados y discusión

### 7.3.1 Screening de actividad antimicrobiana mediante difusión en agar.

36 aislados fueron evaluados por su capacidad antagónica, *Actinomyces ruminicola* (2), *Butyrivibrio* spp (2), *Limosilactobacillus mucosae* (2), *Limosilactobacillus fermentum* (A1, CMINA), *Oribacterium* sp (2), *Pediococcus acidilactici* (1), *Pseudobutyrvibrio* sp (2), *Selenomonas ruminantium* (3), *Succinivibrio dextrinosolvens* (12), *Staphylococcus warneri* (3), *Staphylococcus pasteurii* (2), *Streptococcus salivarius* (1), *Streptococcus lutetiensis* (1), *Streptococcus equinus* (1) y *Streptococcus orisasini* (1).



**Figura 7.4.** Screening de actividad antagónica cualitativa para algunos de los patógenos evaluados, utilizando el método de difusión en placa. A. *Staph pasteurii* (aislado 3) B. *Staph warneri* (aislado 29). C: *Strep salivarius* (aislado 17). D, E y F: *Strep orisasini* (aislado 30). G, H y I: *E. coli O157:H7*. Las flechas rojas indican los halos de inhibición.

Los antagonistas mostraron tres tipos de interacciones. La primera, caracterizada por el crecimiento sobre el agar con el patógeno, observando dos resultados, crecimiento con inhibición (Figura 7.1 D-F) y crecimiento sin inhibición (Figura 7.1 A-C). Segundo, inhibición sin necesidad de crecimiento del antagonista (Figura 7.1 G-I) y tercero, antagonistas sin crecimiento sobre el agar y sin inhibición del patógeno. De los 9 patógenos utilizados, únicamente se observó inhibición para *E. coli O157:H7* y *S. orisasini* (30). En el primer caso, 22 microorganismos (*L. fermentum* (A1-CMINA), *Pseudobutyrvibrio* (6, 7), *P. acidilactici* (13), *S. ruminantium* (20, 35, 49), *S. dextrinosolvens* (27, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 54), *S. orisasini* (30), *L. mucosae* (33, 39), *Oribacterium* sp (36, 42), *S.pasteurii* (45) ) mostraron halos de inhibición en las tres réplicas realizadas (Tabla 7.1), las inhibiciones observadas se caracterizaron por la ausencia de crecimiento de los antagonistas, observando

únicamente los halos. 7 microorganismos presentaron crecimiento junto a *E. coli* O157:H7 sin inhibición, los 7 aislamientos restantes fueron negativos para crecimiento e inhibición.

Para el caso de *S. orisasini* (30), 9 microorganismos fueron positivos en la producción de halos (*L. fermentum* (A1-CMINA), *S. warneri* (1), *S. pasteurii* (45), *S. lutetiensis* (8), *S. salivarius* (16), *S. equinus* (23), *L. mucosae* (33), *S. ruminantium* (35), *S. dextrinosolvens* (53)). 7 microorganismos presentaron crecimiento junto a *S. orisasini* (30) sin inhibición, los 19 microorganismos restantes fueron negativos para crecimiento e inhibición.

El crecimiento conjunto de ambos grupos de microorganismos (patógeno o antagonista) bajo la misma condición, supone la existencia de un mecanismo de competencia en el cual ambas especies pueden coexistir, según Hibbing et al 2010 [5], la competencia puede existir cuando el ambiente en el que habitan las especies se encuentra bien estructurado, creando nichos individuales, a lo que denomina, red de competencia no transitiva. Dentro de los resultados se observa que una gran parte de los microorganismos no tiene capacidad de inhibir las especies seleccionadas como patógenas, en el caso de los *Staphylococcus* spp, se ha demostrado que cuentan con una variedad de mecanismos de resistencia y detección a péptidos antimicrobianos (AMP), permitiendo la repulsión de las moléculas mediante la alteración de la pared celular, la superficie de la membrana, la inactivación proteolítica, el secuestro y la secreción [6]. Los microorganismos del género *Streptococcus* hacen parte del grupo de las bacterias ácido-lácticas, las cuales producen durante la fermentación ácido láctico y ácido acético [7], se ha reportado que estos ácidos son un mecanismo de antagonismo frente a bacterias gram-negativas [8] permeando la pared celular hasta producir una lisis. *Butyrivibrio* sp y *A. ruminicola* son microorganismos productores de bacteriocinas (butyrivibriocina y actifensina), capaces de inhibir no solo microorganismos del mismo género sino también bacterias gram-positivas, lo cual difiere en lo observado con las cepas utilizadas como patógenas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*. En ambos casos no se ha demostrado su capacidad de inhibición contra bacterias gram-negativas como *E. coli* o *Salmonella enterica* [9]–[11].

**Tabla 7.2. Resultados de antagonismo entre patógenos y aislamientos, con el método de difusión en agar, utilizando tres réplicas\*.**

Patógeno	Réplica	A1- <i>Lactobacillus fermentum</i>	1- <i>Staph. warneri</i>	3- <i>Staph. pasteurii</i>	6- <i>Pseudobutyrvibrio sp</i>	7- <i>Pseudobutyrvibrio sp</i>	8- <i>Strep. lutetiensis</i>	13- <i>P. acidilactici</i>	16- <i>Strep. salivarius</i>	20- <i>S. ruminantium</i>	21- <i>Staph. warneri</i>	23- <i>Strep. equinus</i>	27- <i>S. dextrinosolvens</i>	28- <i>S. dextrinosolvens</i>	29- <i>Staph. warneri</i>	30- <i>Strep. orisasini</i>	33- <i>L. mucosae</i>	35- <i>S. ruminantium</i>	36- <i>Oribacterium sp</i>	39- <i>L. mucosae</i>	42- <i>Oribacterium sp</i>	43- <i>S. dextrinosolvens</i>	45- <i>Staph. pasteurii</i>	46- <i>S. dextrinosolvens</i>	47- <i>S. dextrinosolvens</i>	48- <i>S. dextrinosolvens</i>	49- <i>S. ruminantium</i>	50- <i>S. dextrinosolvens</i>	51- <i>S. dextrinosolvens</i>	52- <i>S. dextrinosolvens</i>	53- <i>S. dextrinosolvens</i>	54- <i>S. dextrinosolvens</i>	55- <i>S. dextrinosolvens</i>	56- <i>A. ruminicola</i>	57- <i>Butyrvibrio sp</i>	58- <i>A. ruminicola</i>	60- <i>Butyrvibrio sp</i>							
<i>E. coli</i> OH157 (BHI)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staph. warneri</i> (29 - CAN)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staph. warneri</i> (1- CAN)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staph. pasteurii</i> (45 - CAN)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staph. pasteurii</i> (3- CAN)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Strep. salivarius</i> (16 - CAN)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staph. warneri</i> (21- KNT)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Strep. lutetiensis</i> (8 - KNT)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Strep. equinus</i> (23 - KNT)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Strep. orisasini</i> (30 - CAN)	r1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	r3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

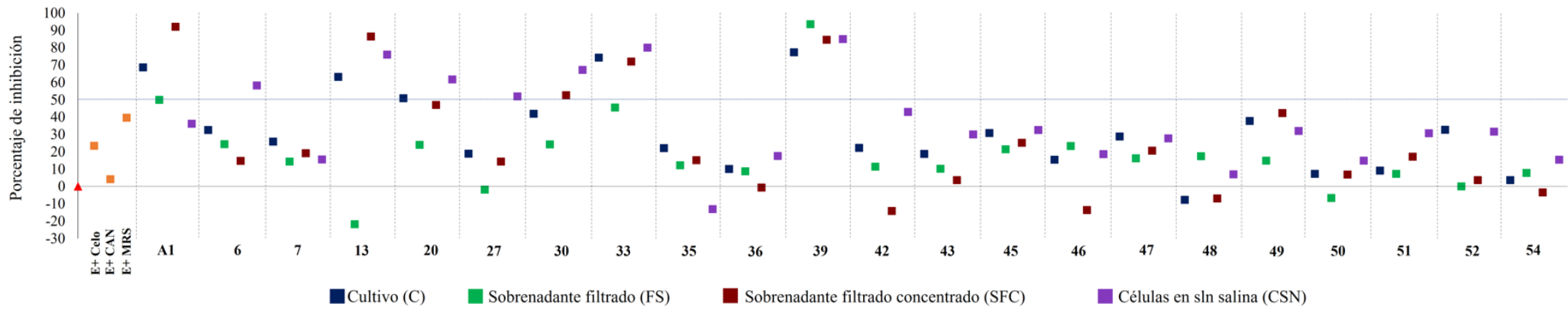
\*Tabla de relación de resultados de inhibición por difusión en placa. En vertical la lista de microorganismos usados como patógenos, en horizontal los microorganismos antagonistas. Los resultados en, Amarillo: Halo de inhibición, Azul: Sin inhibición, Negro: Prueba no realizada al tratarse del mismo aislamiento. Los símbolos de las casillas muestran el crecimiento del antagonista en el medio de cultivo con el patógeno. Cruz: Crecimiento del antagonista, Punto: Poco crecimiento del antagonista. Microorganismos utilizados. A1: Control externo *Limosilactobacillus fermentum* (accesión BAL CMINA), 1, 21, 29: *S. warneri*, 3, 45: *S. pasteurii*, 6,7: *Pseudobutyrvibrio sp*, 8: *S. lutetiensis*, 13: *P. acidilactici*, 16: *S. salivarius*, 20, 35, 49: *S. ruminantium*, 23: *S. equinus*, 27, 28, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55: *S. dextrinosolvens*, 30, *S. orisasini*, 33,39: *L. mucosae*, 36,42: *Oribacterium sp*, 56,58: *A. ruminicola*, 57, 60: *Butyrvibrio sp*.

### 7.2.2 Determinación de la fracción con actividad antimicrobiana

De acuerdo con los resultados del screening se decidió evaluar únicamente el potencial antimicrobiano contra el patógeno de *E. coli* O157:H7 teniendo en cuenta la disponibilidad de este patógeno en la colección CMINA, además de comparar los resultados con la literatura. Para esto, se seleccionaron los 22 aislados positivos de inhibir a *E. coli* O157:H7.

Como resultado, la Figura 7.2 agrupa los porcentajes de inhibición del patógeno con los diferentes tratamientos, el cual se ve afectado inicialmente por los medios CAN, Celobiosa y MRS, donde a excepción del medio CAN, se observa una inhibición del 20 y 40 % respectivamente, esta inhibición puede estar causada por la composición del medio y pH. El medio Celobiosa, se encuentra compuesto por una única fuente de carbono al 1 % (Material Suplementario S1), según la base de datos BacDive (<https://bacdiver.dsmz.de>) la celobiosa no es metabolizada por *E. coli* y en adición el crecimiento óptimo de este microorganismo se encuentra en un pH de 7.0, lo cual difiere del medio MRS con pH de 5.5 – 5.9 [12].

Las fracciones de los cultivos muestran que la BAL A1 utilizada como referencia externa, presenta una escala de inhibición de menor a mayor, iniciando con el tratamiento células en solución salina (CSN) con 35 %, seguido del tratamiento sobrenadante filtrado (SF) con 50 %, tratamiento cultivo (C) con 70 % y sobrenadante filtrado concentrado (SFC) con 90 % de inhibición, este tipo de actividad contra este patógeno ya se había reportado en trabajos internos de la Colección CMINA (datos no mostrados). *L. fermentum* es una BAL heterofermentativa obligada, capaz de fermentar múltiples carbohidratos además de ser probiótica, se ha reportado poseer actividad antimicrobiana contra múltiples patógenos entre ellos *E. coli* O157:H7 mediante la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno en el sobrenadante, siendo un mecanismo de inhibición ligado al pH, también se ha reportado la producción de bacteriocinas similar a la lactocina de *L. helveticus* [2][3], estos mecanismos pueden explicar no solo el efecto de A1 sino el efecto del aislado 13, identificado como *P. acidilactici* en el cual se observa una inhibición de 60 % con el tratamiento C, seguido de 90 % con el tratamiento SFC y de 100 % con el tratamiento CSN, sorprende que la fracción SF promueva el crecimiento del patógeno en un 25 % más que en condiciones normales, este resultado de promoción del crecimiento sugiere una nueva evaluación puesto que no existen reportes de este efecto en microorganismos patógenos, puesto que se conoce del potencial antimicrobiano contra bacterias y hongos mediante el mecanismo de pH al ser heterofermentativa y la producción de bacteriocinas [4][5].



**Figura 7.2.** Gráfica del % de inhibición de *E. coli* O157:H7 en presencia de las fracciones, de cultivo (C):Sobrenadante filtrado, (SF):Sobrenadante filtrado concentrado, (SFC): Células en solución salina (CSN). A1: Control externo *Limosilactobacillus fermentum* (accesión BAL CMINA). 6,7: *Pseudobutyrvibrio* sp, 13: *P. acidilactici*, 20, 35, 49: *S. ruminantium*, 27, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 54: *S. dextrinosolvens*, 30, *Strep orisasini*, 33,39: *L. mucosae*, 36,42: *Oribacterium* sp, 45: *Staph pasteuri*.



Por otro lado, los aislados 33 y 39 de la especie *L.mucosae* presentaron un promedio de inhibición del 77 %, la mayoría de las fracciones para esta especie registraron inhibiciones entre el 70 % y el 95 %, a excepción del tratamiento SF para el aislamiento 33, con inhibición del 45 %, esta especie se describió por primera vez como parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de cerdos [17] con características probióticas al ser capaz de adherirse a la mucosa del tejido intestinal y de inhibir patógenos en este ambiente [18], Busconi *et al.*, 2008 [19] reportaron por primera vez aislamientos de esta especie en intestino de terneros, siendo la BAL predominante, su mayor característica se asocia a la actividad “*mucus-binding*” ligada al gen *mub* siendo el responsable en el mecanismo de adherencia a la mucosa intestinal y modulando la exclusión competitiva contra patógenos, no obstante, la diversidad genética de esta especie también se ve reflejada en la producción de la bacteriocina enterolisina A [20]. Lo anterior puede relacionarse con efecto eficaz sobre *E. coli* O157:H7 puesto que en la mayoría de las fracciones se observa un porcentaje de inhibición superior al 70 %.

Los aislamientos 6 y 7 pertenecientes al género *Pseudobutyrvibrio* sp presentaron diferentes porcentajes de inhibición, los tratamientos SFC y SF presentaron la menor inhibición con 15 % y 14 %, mientras que los tratamientos CSN y C presentaron la mayor inhibición con 58 % y 26 % de manera correspondiente. Čepeljnik *et al.*, 2003 [21] reportaron el posible uso de *P.xylanivorans* Mz5 como probiótico, uno de los hallazgos se centró en la posible inhibición de los microorganismos *Prevotella bryantii* B14, *Prevotella brevis* GA33 and *Butyrvibrio fibrisolvens* ATCC 19171, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Selenomonas ruminantium* DSM 2150, *Salmonella* spp, y *E.coli*, como resultado se obtuvo inhibición de las dos especies de *Prevotella* y de *B.fibrisolvens* además de una inhibición débil de las cepas de *Salmonella* spp y *E.coli*, siendo similar a lo encontrado en este estudio.

Los tres aislamientos de *S. ruminantium* 20, 35 y 49 mostraron diferentes comportamientos de inhibición, la cepa 20 obtuvo los porcentajes más altos con 62 % en CSN, 51 % en C, 47 % en SFC y 24 % en la fracción SF. La cepa 35 inhibe hasta un 22 % siendo el tratamiento C el más alto, se destaca que el tratamiento CSN estimula el crecimiento de *E. coli* O157:H7, mientras que la cepa 49 inhibe en un promedio del 32 % en tres de las cuatro fracciones siendo, la fracción SF presentó el menor porcentaje con 15 %. Se ha reportado que dentro de la ecología ruminal algunos microorganismos producen Sustancias Inhibidoras Similares a Bacteriocinas (Bacteriocin-like inhibitory substances - BLIS) generando ventaja competitiva del microorganismo productor estas han sido detectadas en diversos géneros ruminales como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus*, *Butyrvibrio* y *Selenomonas* de este último se han purificado y caracterizado [22][23].

Uno de los microorganismos de mayor recuperación durante la fase de aislamiento fue *S. dextrinosolvens* con doce aislados, de este grupo solo tres no mostraron actividad antimicrobiana durante el screening (Tabla 7.1). Los resultados de las cepas correspondientes se pueden agrupar por el promedio de porcentaje de inhibición, con orden de menor a mayor.

Para la fracción de C, se observaron porcentajes de inhibición del 6 %, 20 % y 30 % en los siguientes tres grupos de cepas. i) 50-51-54, ii) 27-43-46, iii) 47-52. En la fracción SF, se observaron porcentajes de inhibición del 0 %, 8 % y 20 % en los grupos. i) 27-50-52, ii) 43-51-54, iii) 46-47-48. En la fracción SFC, se observaron porcentajes de inhibición del 0 %, 5 % y 20 % en los tres grupos de cepas: i) 46- 48-54, ii) 43-50-52, iii) 27-47-51. Finalmente, en la fracción SCN se observaron porcentajes de inhibición del 10 %, 24 % y 50 % en los grupos. i) 46-48-50-54, ii) 43-47-51-52, iii) 27. Las fracciones que involucran sobrenadante tienen menor efecto sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Hasta el momento no existen reportes de la actividad antimicrobiana de *Succinivibrio* que puedan soportar los resultados aquí descritos.

El aislamiento 30 correspondiente a *S. orisasini* mostró que su capacidad de inhibición se encuentra en mayor proporción en la fracción CNS con un 70 % de inhibición sobre el patógeno, seguido de SFC con 53%, C con 42% y SF con el menor porcentaje en 25%. Esta especie en particular ha sido recientemente descrita de la cavidad oral de burro[24] y secuenciado a partir de un aislamiento del tracto gastrointestinal de caballos de sangre pura [25]. Hasta el momento se desconocen reportes sobre el rol ecológico de *S. orisasini* específicamente en el rumen, sugiriendo que este puede tratarse del primer estudio preliminar que evalúa interacciones de competencia entre microorganismos aislados de rumen. No obstante, el género *Streptococcus* hace parte del grupo de las BAL, siendo importantes en el ambiente ruminal y dotadas de características que son consideradas probióticas además de presentar mecanismos de inhibición contra patógenos [26], a partir de este género se han caracterizado dos bacteriocinas importantes de *S. bovis* aisladas del rumen, la *Bovicin HC5* y *Bovicin 255* péptidos liberados extracelularmente capaces de inhibir un amplio rango de bacterias gram negativas tanto como gram positivas de otros hábitats [8], [22].

Los aislamientos 36 y 42, hacen parte del género *Oribacterium* sp, en este estudio se observa que no es un microorganismo con gran capacidad, puesto que los porcentajes de inhibición por fracción oscilan entre 0-43 %. La fracción CNS para ambos casos resulta ser la de mayor inhibición con porcentajes de 18 y 43 % respectivamente. Tal y como se menciona en el capítulo II, las características microscópicas de estas cepas son diferentes a las especies reportadas de este género, el cual ha sido encontrado en la cavidad oral de animales y humanos [27], actualmente no existen reportes sobre su actividad antimicrobiana. Finalmente, para la especie *S. pasteruri* con el aislado 45, muestra un porcentaje de inhibición promedio de 27%, siendo mayor al usar aquellas fracciones que contienen las células (C, CSN), en comparación con el 20 % logrado por las fracciones de sobrenadante (SF, SFC). A pesar de estar reportado que el género *Staphylococcus* posee la capacidad de producir bacteriocinas denominadas “staphylococcins” que abarcan diferentes compuestos antimicrobianos como, subclase Ia (lantibióticos), subclase IIb, IId, y clase III, además de compuestos tipo BLIS [28].

### 7.3 Conclusión

Los resultados descritos en este capítulo indican que la mayoría de los aislamientos presentan potencial antimicrobiano contra *E. coli* O157:H7, y solo un pequeño grupo de aislamientos presentan actividad contra un microorganismo diferente, siendo *S. orisasini*. Este estudio también sugiere que el uso de fracciones a partir de un cultivo permite generar las bases para dilucidar la vía o mecanismo de interacción antimicrobiana. También se destacan que apesar de la similitud de género y especie entre los aislados, la capacidad antagonica puede variar. Si bien, la metodología de screening y evaluación empleada no concluye que la inhibición está causada por moléculas de tipo bacteriocina, nos permite sugerir la producción de moléculas con capacidad de antagonismo, siendo necesario profundizar en metodologías que permitan determinar su naturaleza.

## Referencias

- [1] R. Barigye, L. Schaan, P. S. Gibbs, E. Schamber, And N. W. Dyer, "Diagnostic Evidence Of Staphylococcus Warneri As A Possible Cause Of Bovine Abortion," 2007.
- [2] V. Savini, C. Catavittello, A. Bianco, A. Balbinot, And D. D'antonio, "Epidemiology, Pathogenicity And Emerging Resistances In Staphylococcus Pasteuri: From Mammals And Lampreys, To Man," Recent Patents On Anti-Infective Drug Discovery, Vol. 4, No. 2, Pp. 123–129, Jun. 2009, Doi: 10.2174/157489109788490352.
- [3] P. Chen et Al., "Characterization of Streptococcus Lutetiensis Isolated From Clinical Mastitis Of Dairy Cows," Journal Of Dairy Science, Vol. 104, No. 1, Pp. 702–714, Jan. 2021, Doi: 10.3168/Jds.2020-18347.
- [4] W. J. Underwood, R. Blauwiel, M. L. Delano, R. Gillesby, S. A. Mischler, And A. Schoell, "Chapter 15 - Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, And Cattle)," In Laboratory Animal Medicine: Third Edition, Elsevier Inc., 2015, Pp. 623–694. Doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8.
- [5] M. E. Hibbing, C. Fuqua, M. R. Parsek, And S. B. Peterson, "Bacterial Competition: Surviving And Thriving In The Microbial Jungle," National Review Of Microbiology, Vol. 8, No. 1, Pp. 15–25, 2010, Doi: 10.1038/Nrmicro2259.Bacterial.
- [6] H. S. Joo and M. Otto, "Mechanisms of Resistance To Antimicrobial Peptides In Staphylococci," Biochim Biophys Acta, Vol. 1848, No. 11 0 0, P. 3055, Feb. 2015, Doi: 10.1016/J.Bbamem.2015.02.009.
- [7] J. M. Hardie and R. A. Whitley, "The Genus Streptococcus," In the Genera Of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria, Springer., B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel, Eds. Boston, Ma, 1995. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_4).
- [8] H. C. Mantovani, H. Hu, R. W. Warobo, And J. B. Russell, "Bovicin Hc5, A Bacteriocin from Streptococcus Bovis Hc5," Microbiology (N Y), Vol. 148, No. 11, Pp. 3347–3352, 2002, Doi: 10.1099/00221287-148-11-3347.
- [9] J. B. Russell and H. C. Mantovani, "The Bacteriocins Of Ruminant Bacteria And Their Potential As An Alternative To Antibiotics.," J Mol Microbiol Biotechnol, Vol. 4, No. 4, Pp. 347–355, 2002.
- [10] M. L. Kalmokoff and R. M. Teather, "Isolation And Characterization Of A Bacteriocin (Butyriovibriocin Ar10) From The Ruminant Anaerobe Butyriovibrio Fibrisolvens Ar10: Evidence In Support Of The Widespread Occurrence Of Bacteriocin-Like Activity Among Ruminant Isolates Of B. Fibrisolvens," Applied And Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 2, Pp. 394–402, 1997.
- [11] I. Sugrue, P. M. O'connor, C. Hill, C. Stanton, And R. Paul Ross, "Actinomyces Produces Defensin-Like Bacteriocins (Actifensins) With A Highly Degenerate Structure and Broad Antimicrobial Activity," J Bacteriol, Vol. 202, No. 4, Feb. 2020, Doi: 10.1128/Jb.00529-19.
- [12] Millipore, "Mrs Agar (De Man, Rogosa and Sharpe)-Technical Data Sheet," 2019. [https://www.merckmillipore.com/Co/Es/Product/Mrs-Agar-De-Man-Rogosa-And-Sharpe,Mda\\_Chem-110660](https://www.merckmillipore.com/Co/Es/Product/Mrs-Agar-De-Man-Rogosa-And-Sharpe,Mda_Chem-110660) (Accessed May 15, 2022).
- [13] S. A. Ibrahim, "Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus Spp.: Other Species," In Reference Module in Food Science, 2016, Pp. 1–7. Doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00857-X.
- [14] A. Davoodabadi, M. Mehdi, S. Dallal, E. Lashani, And M. T. Ebrahimi, "Antimicrobial Activity of Lactobacillus Spp. Isolated From Fecal Flora Of Healthy Breast-Fed Infants Against Diarrheagenic Escherichia Coli," Jundishapur J Microbiol, Vol. 8, No. 12, P. 27852, 2015, Doi: 10.5812/Jjm.27852.
- [15] S. Das, V. Mandal, And N. C. Mandal, "Broad-Spectrum Antimicrobial Efficacy of Pediococcus Acidilactici Lab001 Against Food Spoilage And Toxigenic Bacteria And Fungi," Journal Of Food Processing And Preservation, Vol. 45, No. 1, Jan. 2021, Doi: 10.1111/Jfpp.15066.
- [16] A. Ley De-Coss, C. Arce-Espino, M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, And R. Pinto-Ruiz, "Estudio Comparativo Entre La Cepa De Pediococcus Acidilactici Aislada Del Rumen De Borregos Y Un Consorcio De Bacteria Ruminales Comparative Estudio Between Strain Pediococcus Acidilactici Aisolated From Rumen Sheep And A Ruminant Bacteria Group".
- [17] S. Roos, F. Karner, L. Axelsson, And H. Jonsson, "Lactobacillus Mucosae Sp. Nov., A New Species With In Vitro Mucus-Binding Activity Isolated From Pig Intestine," International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, Vol. 50, No. 1, Pp. 251–258, Jan. 2000, Doi: 10.1099/00207713-50-1-251.
- [18] G. M. D. De Moraes et al., "Functional Properties of Lactobacillus Mucosae Strains Isolated From Brazilian Goat Milk," Probiotics And Antimicrobial Proteins, Vol. 9, No. 3, Pp. 235–245, Sep. 2017, Doi: 10.1007/S12602-016-9244-8.
- [19] M. Busconi, S. Reggi, And C. Fogher, "Evaluation of Biodiversity Of Lactic Acid Bacteria Microbiota In The Calf Intestinal Tracts," Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal Of General And Molecular Microbiology, Vol. 94, No. 2, Pp. 145–155, 2008, Doi: 10.1007/S10482-008-9220-8.
- [20] Y. Jia et al., "Comparative Genomics Analysis of Lactobacillus Mucosae From Different Niches," Genes (Basel), Vol. 11, No. 1, Jan. 2020, Doi: 10.3390/Genes11010095.
- [21] T. Čepeljnik, M. Zorec, R. Kostanjšek, F. V. Nekrep, And R. Marinšek-Logar, "Is Pseudobutyriovibrio Xylanivorans Strain Mz5t Suitable as A Probiotic? An In Vitro Study," Folia Microbiologica, Vol. 48, No. 3, Pp. 339–345, 2003, Doi: 10.1007/Bf02931363.
- [22] M. F. Whitford, M. A. Mcpherson, R. J. Forster, And R. M. Teather, "Identification of Bacteriocin-Like Inhibitors From Rumen Streptococcus Spp. And Isolation and Characterization Of Bovicin 255," Applied And Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 2, Pp. 569–574, 2001, Doi: 10.1128/Aem.67.2.569-574.2001.
- [23] R. M. Teather, M. L. Kalmokoff, And M. F. Whitford, "The Role of Bacteriocins In Rumen Microbial Ecology," Environmental Microbiology, No. 13, 1999.
- [24] K. Takada, M. Saito, O. Tsudukibashi, T. Hiroi, And M. Hirasawa, "Streptococcus Orisasini Sp. Nov. And Streptococcus Dentsasini Sp. Nov., Isolated From The Oral Cavity Of Donkeys," International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, Vol. 63, No. Part8, Pp. 2782–2786, 2013, Doi: 10.1099/Ijs.0.047142-0.
- [25] M. Takagi et al., "Draft Genome Sequence of Streptococcus Orisasini Sh06, Isolated From A Healthy Thoroughbred Gastrointestinal Tract," Genome Announcements, Vol. 4, No. 1, 2016, Doi: 10.1128/Genomea.01566-15.
- [26] N. Vieco-Saiz et al., "Benefits and Inputs from Lactic Acid Bacteria And Their Bacteriocins As Alternatives To Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production," Frontiers In Microbiology, Vol. 10. Frontiers Media S.A., 2019. Doi: 10.3389/Fmicb.2019.00057.
- [27] J. Carlier, "Oribacterium," Bergey's Manual of Systematics Of Archaea And Bacteria, Vol. 2, Pp. 1–5, 2015, Doi: 10.1002/9781118960608.Gbm00649.
- [28] P. Mak, "Staphylococcal Bacteriocins," In Pet-To-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress, 2018, Pp. 161–171. Doi: 10.1016/B978-0-12-813547-1.00013-3.

## **Capítulo IV**

### **Descripción del metabolismo ruminal de cepas de interés mediante reconstrucción metagenómica (Shotgun).**

Asociado al objetivo: Describir el metabolismo ruminal de poblaciones de interés mediante una reconstrucción metagenómica (Shotgun)

#### **Resumen**

A lo largo de este estudio la idea de aislar una mayor diversidad microbiana ha venido acompañada de la dificultad de recuperar aquellos microorganismos que, aunque sean abundantes no logran ser cultivados o separados. Este sin duda se suma a las numerosas opiniones y reportes en torno a la incapacidad de cultivar microorganismos anaerobios ruminales. No obstante, avances en las omicas han permitido ir más allá y proveernos de información clave para la obtención de dichos microorganismos. Este capítulo abarca dicho problema desde el uso de la metagenómica (shotgun), con el fin de reconstruir parcialmente genomas bacterianos generando información funcional que permita establecer las capacidades de degradación de diferentes sustratos, las enzimas que los integran y definir parte de su rol en la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs), siendo los productos finales de degradación que impactan de manera directa el desarrollo del rumiante. Permitiendo refinar la estrategia de aislamiento que ha sido plasmada en los capítulos anteriores. Para la reconstrucción, se seleccionaron 4 muestras de los medios CAN y KNT en la dilución  $10^{-12}$  en los dos días de incubación (CAN 12-3D, CAN 12-7D, KNT 12-3D, KNT 12-7D). El proceso downstream con las secuencias obtenidas, fue realizado mediante el servidor KBASE, si bien existen muchas herramientas computacionales por entrada de comandos, este servidor público integra todos los softwares necesarios para el correcto ensamblaje de secuencias, así como la clasificación filogenética y la anotación funcional. Como resultado, se obtuvieron un total de 33 genomas ensamblados por metagenomas (MAGs) posterior a los procesos de verificación de calidad y contaminación de cada posible MAG reconstruido. 20 MAGs fueron asignados con porcentaje de ANI indicando la similitud con la especie identificada, los 13 restantes fueron identificados hasta la clasificación más cercana. Como anotación funcional se estableció el perfil CAZy de las seis familias (GH, GT, PL, CE, AA, CBM), además del perfil de sustratos y enzimas CAZy asociadas, por otra parte, se determinó la ausencia y presencia de los módulos funcionales alrededor del metabolismo del nitrógeno y la producción de AGVs y alcohol. Los resultados obtenidos en este capítulo concluyen la estrategia de cultivo permitiendo mejorar el aislamiento a través de la microbiología y la metagenómica, bajo las condiciones locales establecidas, se espera que a futuro el aislamiento de aquellos microorganismos abundantes en el rumen pueda ser logrado mediante lo observado en este trabajo.

## **8. Metodología**

### **8.1 Preparación de librería metagenómica**

Las muestras elegidas fueron procesadas desde el ADN extraído en el capítulo I, su calidad, integridad y concentración fue verificada por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % (p/v) y por NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Para la preparación de la librería metagenómica se utilizó el kit de Nextera™ DNA Flex Library Prep (Illumina, San Diego, CA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, posteriormente se cuantificó mediante Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Las librerías metagenómicas fueron enviadas a Macrogen, Inc (Seúl, Corea del Norte), todas las muestras fueron secuenciadas por la plataforma de Illumina-Shotgun utilizando una cobertura de 20x por muestra, generando lecturas con longitudes de 150pbPairedEnd.

### **8.2 Análisis de secuenciaciones Shotgun para reconstrucción metagenómica**

El análisis y reconstrucción de metagenomas se llevó a cabo mediante el uso del servidor KBASE (<https://www.kbase.us/>), el proceso abarcó cuatro partes divididas en 1) Calidad de datos y clasificación taxonómica de lecturas, 2) ensamblaje de secuencias y binning, 3) anotación de MAGs y clasificación filogenética y 4) anotación funcional.

#### *8.2.1 Calidad de datos y clasificación taxonómica de lecturas.*

La calidad de los datos tanto crudos como curados fue establecida y visualizada mediante la herramienta FastQC, permitiendo determinar estadísticas básicas de las lecturas y el score de calidad para cada una de las pares de bases secuenciadas. La limpieza de las lecturas con baja calidad y retiro de adaptadores se realizó mediante la herramienta Trimmomatic, las secuencias resultantes fueron nuevamente visualizadas y aprobadas por FastQC. Las lecturas con buena calidad fueron utilizadas en un clasificador taxonómico de alta sensibilidad que utiliza las lecturas obtenidas y las asocia a un taxón comparando secuencias de referencia del NCBI denominado KAIJU [1].

#### *8.2.2 Ensamblaje de secuencias y binning*

Las lecturas fueron ensambladas mediante tres tipos de ensambladores para metagenomas, MegaHit [2], MetaSPAdes [3] y IDBA-UD [4], realizando diversas iteraciones de k-meros siendo secuencias de nucleótidos de k-longitud; la elección de los tres programas está basada en las diversas capacidades de cada uno de ensamblar lecturas cortas, largas o complejas. De la comparación de los mejores contigs ensamblados y su distribución, se seleccionó el mejor sistema de ensamblaje, los contigs resultantes fueron sometidos a tres programas de clusterización de dichos contigs a bins, los cuales constituyen grupos de secuencias únicas que al agruparse pueden representar un organismo, los programas MaxBin2 [5], MetaBAT2

[6] y CONCOT [7], fueron seleccionados para este fin. Los bins resultantes de los tres programas fueron filtrados mediante DAS Tool[8] y verificados en calidad mediante CheckM[9], por último, la extracción de los grupos de bins que corresponden a un posible organismo utilizando BinUtil.

### *8.2.3 Anotación de MAGs y clasificación filogenética.*

A partir de los bins ensamblados y resultantes se realizó la anotación mediante RASTtk [10] de proteínas codificantes, genes rRNA, tRNA, y la asignación de funciones de los genes anotados en los MAGs (Metagenomic Assembled Genomes), con los genomas ensamblados y anotados se realizó la clasificación taxonómica utilizando GTDB-Tk[11] y MiGA [12].

### *8.2.4 Clasificación funcional.*

La anotación funcional de los MAGs resultantes, fue realizado mediante DRAM [13] para la generación del perfil metabólico de cada MAG y la búsqueda de proteínas codificantes para genes de tipo CAZymes (Carbohydrate-active enzymes) relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, esta clasificación fue realizada utilizando el programa dbCAN [14], además de utilizar GhostKoala como herramienta adicional de caracterización [15].

## 8.3 Resultados y discusión

### 8.3.1 Análisis de secuenciaciones Shotgun para reconstrucción metagenómica

#### 8.3.1.1 Número de lecturas y clasificación taxonómica

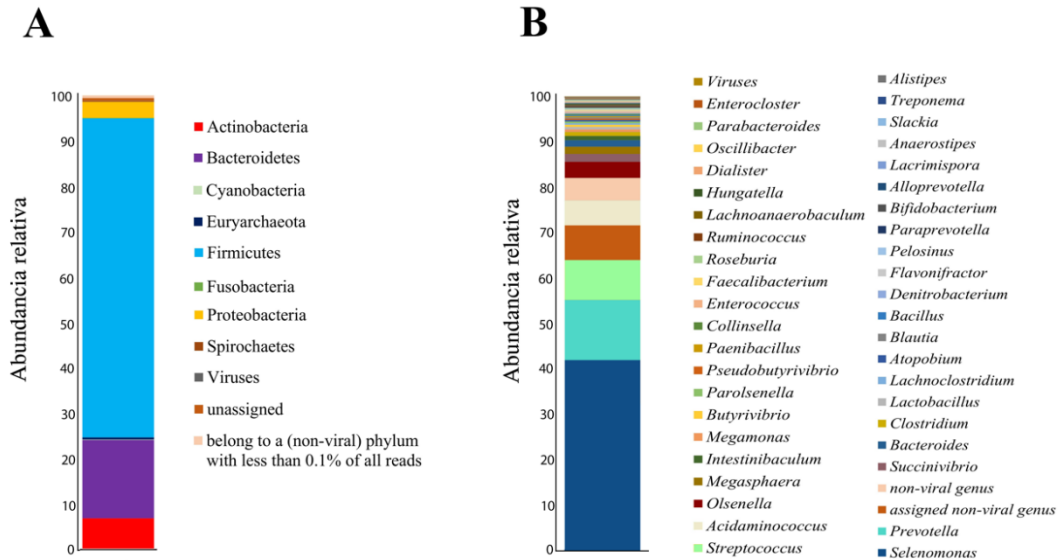
Como producto de secuenciación de las cuatro muestras seleccionadas, se obtuvieron un total de ocho archivos de datos crudos con un tamaño de 80 GB, representados en secuencias pareadas, indicando que cada una de las muestras enviadas fue secuenciada en sentido forward y reverse. La Tabla 8.1, muestra el número de lecturas obtenidas crudas y el número de lecturas posterior a la limpieza por Trimmomatic, aproximadamente el 8 % de las lecturas iniciales fueron retiradas en la limpieza.

**Tabla 8.1: Número de lecturas crudas y número de lecturas post limpieza.**

Muestra	# de Lecturas Raw	# de Lecturas post Trimm
CAN 12 3R1_rev & fwd	98'439.167	91'772.247
CAN 12 7R1_rev & fwd	125'505.443	117'083.379
KNT 12 3R1_rev & fwd	110'472.264	102'646.024
KNT 12 7R2_rev & fwd	103'296.119	95'151.981

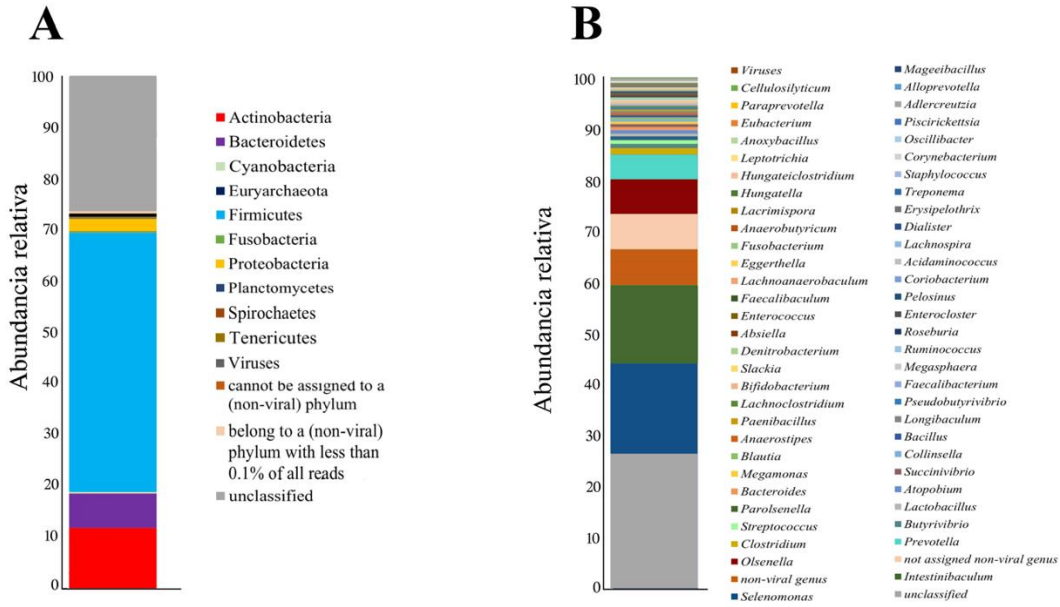
Para la clasificación taxonómica, se utilizó el programa KAIJU el cual permitió inferir la composición de la comunidad presente en cada muestra, las Figuras 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4 describen la diversidad obtenida en su abundancia relativa, a nivel de filo como a nivel de género, KAIJU compara las secuencias proteicas contra una base de datos de referencia para la clasificación [1], a diferencia de la comparación nucleotídica realizada con la base de datos de Greengenes.





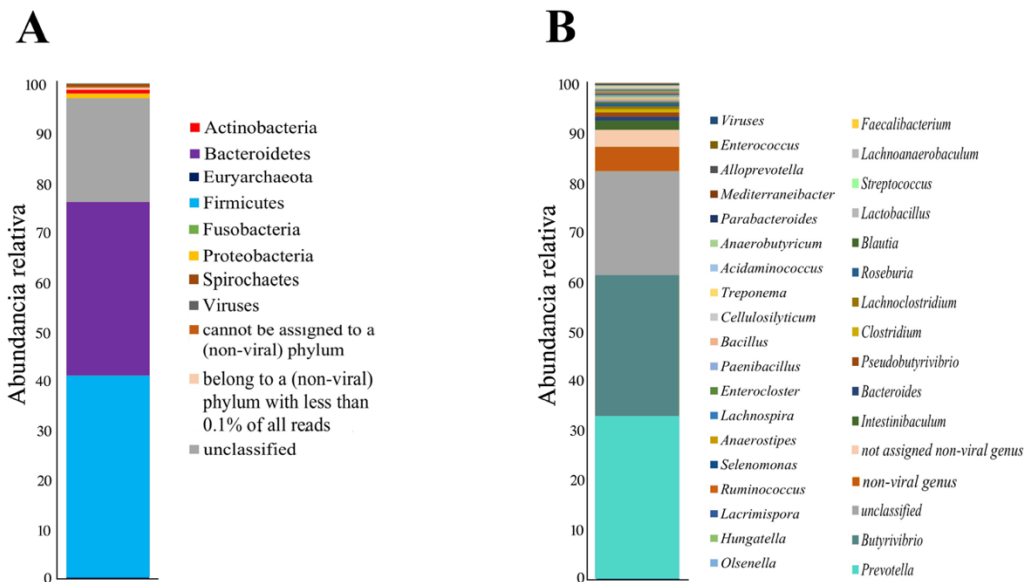
**Figura 8.1.** Asignación taxonómica para la muestra CAN 12-3R1, utilizando el clasificador KAIJU para datos metagenómicos, en filo (A) y géneros (B).

La Figura 8.1 correspondiente a CAN 12-3R1 muestra que a nivel de filo (Figura 8.1 A), hay dominancia del filo Firmicutes, seguido de Bacteroidetes, Actinobacteria y en cuarto lugar el filo Proteobacteria, además se destacan otras clasificaciones de filo como Cyanobacteria, Euryarchaeota (Archaea), Fusobacteria, Spirochaetes, y Virus menores al 1%. En los géneros bacterianos clasificados se destacan (Figura 8.1 B) *Selenomonas*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Acidaminococcus*, *Olsenella* y *Succinivibrio* siendo parte de las abundancias más altas; a diferencia de la librería de amplicones (Capítulo 1-Figura 5.4) en este caso *Sharpea* no se encuentra en la clasificación de los géneros más abundantes, en adición se observa que aproximadamente un 10% de la clasificación corresponde a un grupo de géneros no descritos en la librería de amplicones.



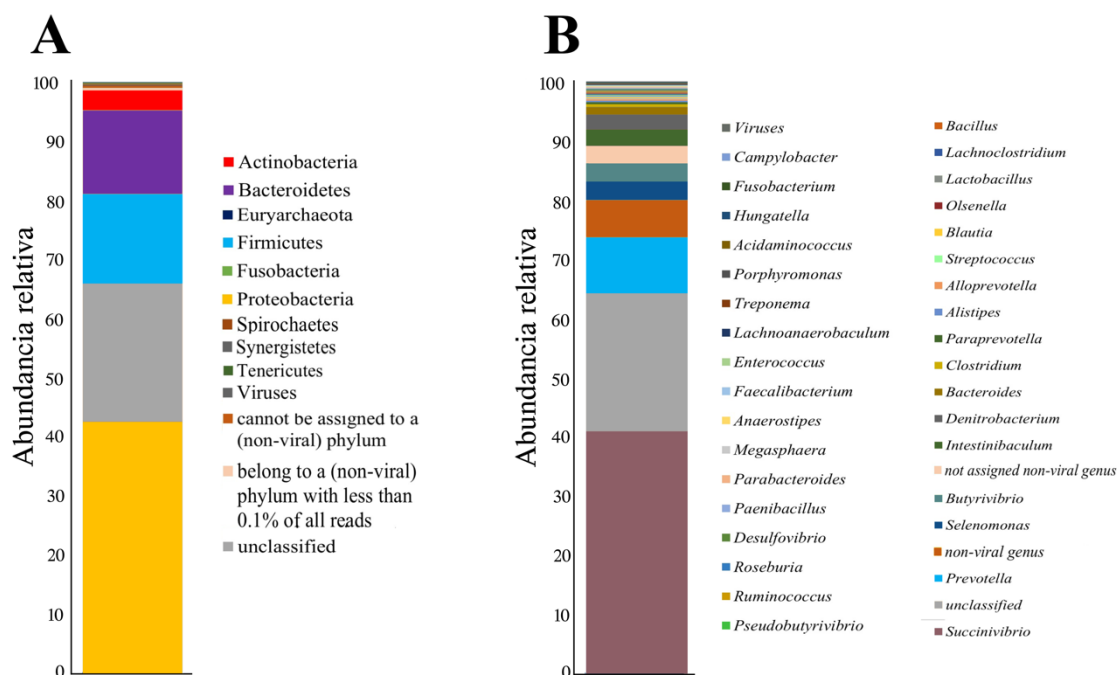
**Figura 8.2.** Asignación taxonómica para la muestra CAN 12-7R2, utilizando el clasificador KAIJU para datos metagenómicos, en filo (A) y géneros (B).

Para CAN 12-7R1, la Figura 8.2-A muestra a los filos Firmicutes y Actinobacteria siendo dominantes, seguidos de Bacteroidetes y Proteobacteria. *Selenomonas* e *Intestinibaculum* lideran la abundancia de esta muestra, un porcentaje del 25 % corresponde a secuencias sin clasificación taxonómica, un 40% de la librería (Figura 8.2-B) corresponden a clasificaciones de géneros no observados en la librería de amplicones (Capítulo 1-Figura 5.4).



**Figura 8.3.** Asignación taxonómica para la muestra KNT 12-3R1. Utilizando el clasificador KAIJU para datos metagenómicos, en filo (A) y géneros (B).

Para las muestras de KNT, las Figuras 8.3 y 8.4 presentan composiciones similares. En KNT 12-3R1 (Figura 8.3 A-B) Firmicutes y Bacteroidetes componen el 75% la librería metagenómica. A nivel de género (Figura 8.3-B), el 60 % de la composición está dada por *Prevotella* y *Butyrivibrio*, el porcentaje restante pertenece se divide en 20 % sin clasificación y el 20 % restante a géneros de baja abundancia.



**Figura 8.4.** Asignación taxonómica para la muestra KNT 12-7R1. Utilizando el clasificador KAIJU para datos metagenómicos, en filo (A) y géneros (B).

Finalmente, la muestra KNT 12-7R2 (Figura 8.4) se compone en un 80 % con los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, un 20 % se observa sin clasificación. Su composición por género muestra a *Succinivibrio*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio* corresponden al 60 % de la muestra, el 40% restante corresponde tanto a géneros con una abundancia menos al 1% y géneros sin clasificación.

### 8.3.1.2 Ensamblaje de secuencias y binning

Las cuatro muestras fueron ensambladas utilizando MetaSPades como programa, las figuras 8.5, 8.6 son el resultado estadístico de los ensamblajes para cada muestra. Las muestras correspondientes al medio CAN presentaron diferencias en el número de contigs ensamblados a partir de las lecturas, 20.521 contigs fueron ensamblados en CAN 12-3R1, y solo 3573 en CAN 12-7R1, compuestos en un rango entre 1000 y 10000 pares de bases (pb). Por otra parte, el medio KNT también mostró diferencias en el número de contigs siendo

mayor en KNT12-7R2 con 6484 y 2133 para KNT 12-3R1 en un rango de 1000 y 10000 pb (Figura 8.6).

Statistics without reference		CAN-12-3R1_MetaSPAdes.contigs	Statistics without reference		CAN-12-7R1_MetaSPAdes.contigs
# contigs		20 521	# contigs		3573
# contigs (>= 0 bp)		20 521	# contigs (>= 0 bp)		3573
# contigs (>= 1000 bp)		20 521	# contigs (>= 1000 bp)		3573
# contigs (>= 10000 bp)		3422	# contigs (>= 10000 bp)		1046
# contigs (>= 100000 bp)		69	# contigs (>= 100000 bp)		79
# contigs (>= 1000000 bp)		0	# contigs (>= 1000000 bp)		0
Largest contig		853 184	Largest contig		531 927
Total length		152 904 861	Total length		52 200 064
Total length (>= 0 bp)		152 904 861	Total length (>= 0 bp)		52 200 064
Total length (>= 1000 bp)		152 904 861	Total length (>= 1000 bp)		52 200 064
Total length (>= 10000 bp)		83 579 666	Total length (>= 10000 bp)		41 559 081
Total length (>= 100000 bp)		12 359 966	Total length (>= 100000 bp)		13 770 094
Total length (>= 1000000 bp)		0	Total length (>= 1000000 bp)		0
N50		11 826	N50		41 888
N75		4952	N75		13 027
L50		2765	L50		276
L75		7947	L75		836
GC (%)		45.8	GC (%)		45.36
<b>Mismatches</b>			<b>Mismatches</b>		
# N's		160 497	# N's		42 304
# N's per 100 kbp		104.97	# N's per 100 kbp		81.04

**Figura 8.5.** Datos estadísticos del ensamblaje por MetaSPades para CAN 12-3R1 y CAN 12-7R1.

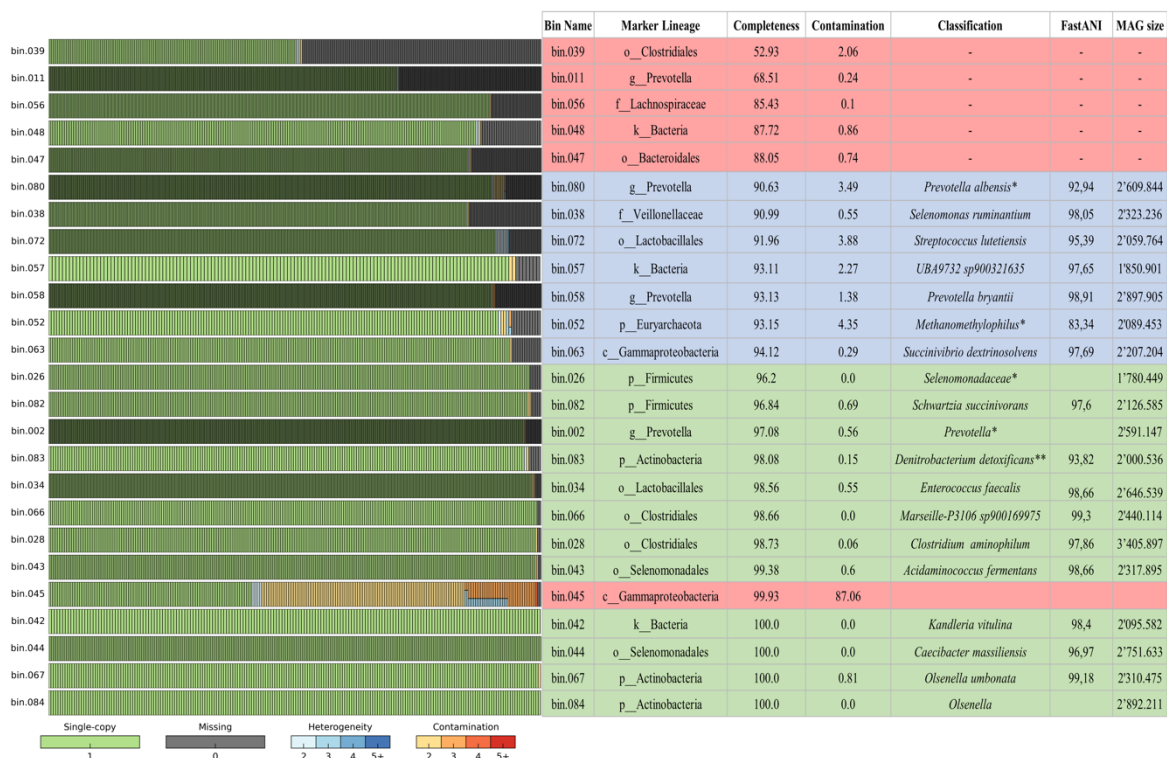
Teniendo en cuenta las diferencias taxonómicas entre muestras de cada medio y el número de contigs ensamblados, se realizó una unificación de las librerías, obteniendo resultados más robustos que permitiera reconstruir un mayor número de metagenomas.

Statistics without reference		KNT12-3R1_MetaSPAdes.contigs	Statistics without reference		KNT12-7R2_MetaSPAdes.contigs
# contigs		2133	# contigs		6484
# contigs (>= 0 bp)		2133	# contigs (>= 0 bp)		6484
# contigs (>= 1000 bp)		2133	# contigs (>= 1000 bp)		6484
# contigs (>= 10000 bp)		769	# contigs (>= 10000 bp)		1933
# contigs (>= 100000 bp)		73	# contigs (>= 100000 bp)		196
# contigs (>= 1000000 bp)		0	# contigs (>= 1000000 bp)		0
Largest contig		686 849	Largest contig		697 087
Total length		40 413 260	Total length		106 350 240
Total length (>= 0 bp)		40 413 260	Total length (>= 0 bp)		106 350 240
Total length (>= 1000 bp)		40 413 260	Total length (>= 1000 bp)		106 350 240
Total length (>= 10000 bp)		34 176 486	Total length (>= 10000 bp)		86 870 658
Total length (>= 100000 bp)		14 304 006	Total length (>= 100000 bp)		37 047 258
Total length (>= 1000000 bp)		0	Total length (>= 1000000 bp)		0
N50		56 980	N50		53 877
N75		17 541	N75		15 830
L50		152	L50		419
L75		476	L75		1366
GC (%)		42.95	GC (%)		49.89
<b>Mismatches</b>			<b>Mismatches</b>		
# N's		46 421	# N's		69 389
# N's per 100 kbp		114.87	# N's per 100 kbp		65.25

**Figura 8.6.** Datos estadísticos del ensamblaje por MetaSPades para KNT 12-3R1 y KNT 12-7R1.

MetaSPades y MEGAHIT-metasensitive fueron los ensambladores con mejores resultados para CAN 12-3-7R1 y KNT 12-3-7R1-2 respectivamente (Material Suplementario S8). Posterior a la clusterización de los contigs en bins, se generaron un total de 25 y 24 bins correspondientes a cada muestra. Teniendo en cuenta los parámetros de calidad definidos por

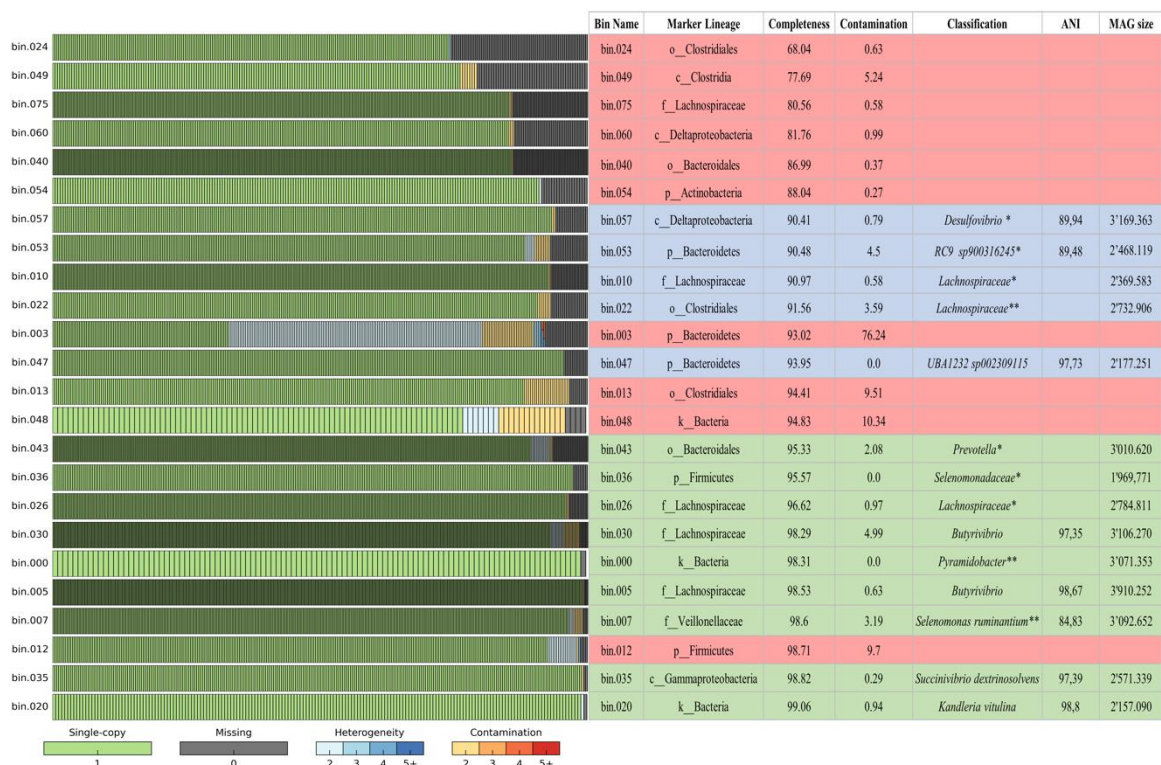
la integridad (completeness) y contaminación, se seleccionaron aquellos con porcentajes superiores a 90% de integridad y con porcentajes de contaminación menores a 5%.



**Figura 8.7.** Calidad de los Bins clusterizados posterior al proceso de ensamblaje de CAN 12-3-7R1. Se muestra de forma cualitativa y cuantitativa la integridad y contaminación de cada metagenoma reconstruido mediante el uso de un conjunto de genes ubicuos y de una sola copia dentro de un linaje filogenético, el conjunto de estos genes está determinado según la casilla “Marker Lineage”. El porcentaje de integridad o “completeness” refleja el porcentaje de genes que faltan con respecto al número de genes utilizado en cada bin. En color rojo se observan los bins que no superan el umbral establecido de integridad (90 %) y contaminación (5 %), en azul se encuentran los bins que están por encima del umbral de integridad (>90 %) y menores al 5% de contaminación. En verde se encuentran aquellos bin con integridad superior al 95 % y baja contaminación. Se integra la identificación, el criterio de asignación (ANI) y el tamaño del MAG. \*clasificación taxonómica totalmente definida por la topología. \*\*novedad taxonómica determinada mediante RED (divergencia evolutiva relativa).

Las figuras 8.7 y 8.8 muestran que los bins resaltados en azul y verde cumplen con los criterios de calidad, los resaltados en rojo fueron descartados. Los bins seleccionados fueron identificados taxonómicamente utilizando la base de datos GTDB-tk, utilizando la métrica de similitud de identidad nucleotídica media (ANI), los bins con valor asignado superior al 95 % pueden considerarse que son de la especie identificada, algunos bins con porcentajes de ANI inferiores, fueron identificados por la posición en la que se encuentran en el árbol

filogenético del genoma de referencia o por su divergencia evolutiva relativa (RED). Los bins de cada muestra fueron ubicados en árboles filogenéticos con el método de *Maximum likelihood phylogeny* estableciendo las especies cercanas filogenéticamente para cada uno de los bins (Figura S8.1, S8.2 Material Suplementario). Adicionalmente las figuras muestran que el tamaño de cada uno de los MAGs, oscilan entre 1.7 -3.9 mpb.



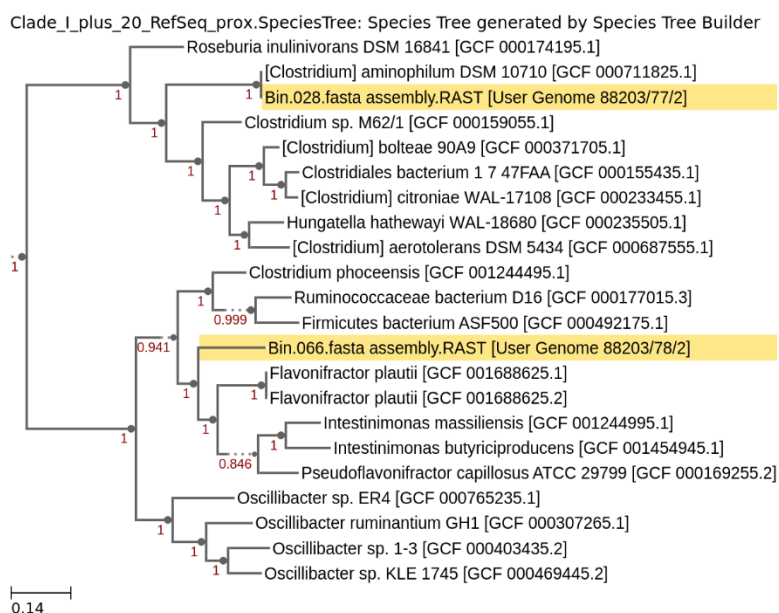
**Figura 8.8.** Calidad de los Bins clusterizados posterior al proceso de ensamblaje de KNT 12-3-7R1. Se muestra de forma cualitativa y cuantitativa la integridad y contaminación de cada metagenoma reconstruido mediante el uso de un conjunto de genes ubicuos y de una sola copia dentro de un linaje filogenético, el conjunto de estos genes está determinado según la casilla “Marker Lineage”. El porcentaje de integridad o “completeness” refleja el porcentaje de genes que faltan con respecto al número de genes utilizado en cada bin. En color rojo se observan los bins que no superan el umbral establecido de integridad (90 %) y contaminación (5 %), en azul se encuentran los bins que están por encima del umbral de integridad (>90 %) y menores al 5 % de contaminación. En verde se encuentran aquellos bin con integridad superior al 95 % y baja contaminación. \*clasificación taxonómica totalmente definida por la topología. \*\*novedad taxonómica determinada mediante RED (divergencia evolutiva relativa).

### 8.3.1.3 Clasificación de MAGs.

Como resultado de la muestra CAN 12-3-7R1 se obtuvieron 19 MAGs, 15 con clasificación de género y especie, 3 clasificaciones únicamente de género y 1 clasificación a nivel de familia, algunos de estos microorganismos fueron descritos en los capítulos I y II, al ser observados tanto en la librería de amplicones como en los aislamientos. Dentro de los resultados se encuentra el MAG del bin 052 correspondiente a una Archaea del género *Methanomethylophilus*; el cual se reporta como un género nuevo dentro del orden de los *Methanomassiliicoccales* el cual ha sido descrito como una de las archaeas productoras de metano en rumiantes y del cual no se tiene representantes cultivados [16]; *Denitrobacterium detoxificans* (bin 083) una bacteria ruminal capaz de metabolizar compuestos nitrogenados catalogados como nitrotoxinas, los cuales pueden estar presentes en forrajes de plantas leguminosas [17], los bin 084 y 067 correspondientes al género *Olsenella* hacen parte del filo Actinobacteria, descritos en humanos pero también en el tracto gastrointestinal de rumiantes, su presencia y rol dentro de los procesos ruminales no se encuentra descrito [18]. *Selenomonas ruminantium* (bin 038) y *Schwartzia succinovorans* (bin 082) hacen parte de la familia *Selenomonadaceae* (bin 026), se caracterizan por ser bacterias no-celulolíticas que participan en la degradación de fibra mediante interacciones sintróficas, realizando la conversión de succinato a propionato en ambos casos [19], [20]. *S. succinovorans* se cataloga como un microorganismo fastidioso a pesar de encontrarse prevalente en el rumen bajo algunas dietas, su recuperación es difícil debido a su metabolismo dependiente de succinato. Los bin 044 y 043 correspondientes a los MAGs identificados como *Caecibacter massiliensis* y *Acidaminococcus fermentans* pertenecen a la familia *Veillonellaceae*; de *C. massiliensis* se conoce poco sobre su posible rol en el rumen ya que ha sido descrito recientemente y aislado del colon humano [21].

*A. fermentans* es un coco gram negativo que se encuentra en el rumen, su importancia radica en la utilización de aminoácidos como única fuente de energía y en la utilización de transaconitato, este compuesto puede encontrarse en algunos forrajes y su alta concentración e ingesta en rumiantes puede derivar en un déficit de magnesio ocasionando una tetania en el animal [22], [23]. *Kandleria vitulina* (bin 042) se asocia a la comunidad bacteriana “Tipo-S”, encargada en la reducción de metano, además de ser productora de ácido láctico [24]. *Enterococcus faecalis* (bin 034), hace parte de la microbiota intestinal normal que usualmente no causa ninguna afectación en animales sanos, posee una gran versatilidad de crecimiento bajo diversas condiciones ambientales [25], dentro de los procesos ruminales se le ha atribuido la degradación del ácido tánico mediante enzimas tanasas, este compuesto se encuentra como parte de los metabolitos secundarios en las plantas que pueden tener efectos benéficos o perjudiciales para los rumiantes por su naturaleza recalcitrante [26]. *Streptococcus lutetiensis* (bin 072) hace parte del biotipo 2 del complejo SBSEC (*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex) compuestos por diferentes especies de

estreptococos que hacen parte de tracto gastro intestinal de animales y humanos, pero que a su vez pueden ser patógenos oportunistas con características de alta patogenicidad en humanos, además de representar uno de los grupos con mayor resistencia antimicrobiana [27] no obstante otros estudios se han centrado en establecer el rol que ejercen estas especies en el rumen. Según Aphale et al., (2019) la administración oral de *S.bovis/S.lutetiensis* tienen un efecto antimicrobiano, reduciendo la población de coliformes y el aumento de levaduras utilizando RUSITEC como modelo. El bin 066 identificado taxonómicamente como *Marseille-P3106 900169975* hace parte de la familia *Oscillospiraceae*, la clasificación otorgada al bin no posee un representante cultivable, y su nombre es una determinación biológica dada por el lugar de identificación siendo Marsella (Marseille) al sur de Francia [29], según el árbol filogenético (Figura 8.9), este bin se encuentra relacionado con especies del género *Flavonifractor*, el cual se ha descrito efecto benéfico por su capacidad de metabolizar flavonoides en el hospedero [30].

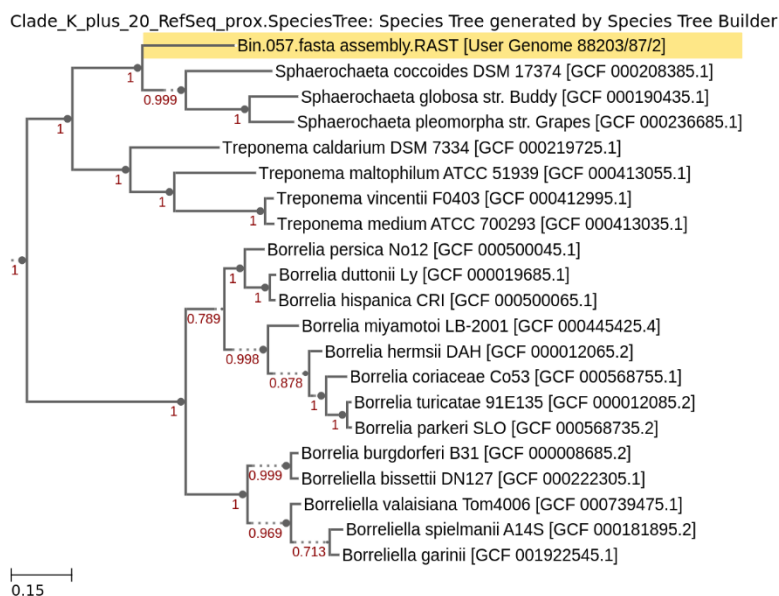


**Figura 8.9.** Árbol filogenético correspondiente al MAG *Marseille-P3106 900169975* (bin 066), de la muestra CAN 12-3-7R1, y su relación con especies cercanas. El árbol fue construido con FastTree2 por el método de máxima verosimilitud con el análisis de un conjunto de 49 genes universales definidos por familias de genes COG, con alineación de secuencias múltiples en cada uno de los genes. Los números de las ramas indican el porcentaje de bootstrap (1000 réplicas).

Dentro del rumen se encuentran grupos especializados de microorganismos, tales como *Clostridium aminophilum* (bin 028) el cual, fermenta aminoácidos realizando la desaminación de estos; este proceso es importante para la producción de amonio y su metabolización a lo largo del proceso ruminal [31], [32]. *Succinivibrio dextrinosolvens* (bin 063) hace parte de la familia *Succinivibrionaceae*, abundante en vacas multíparas con una



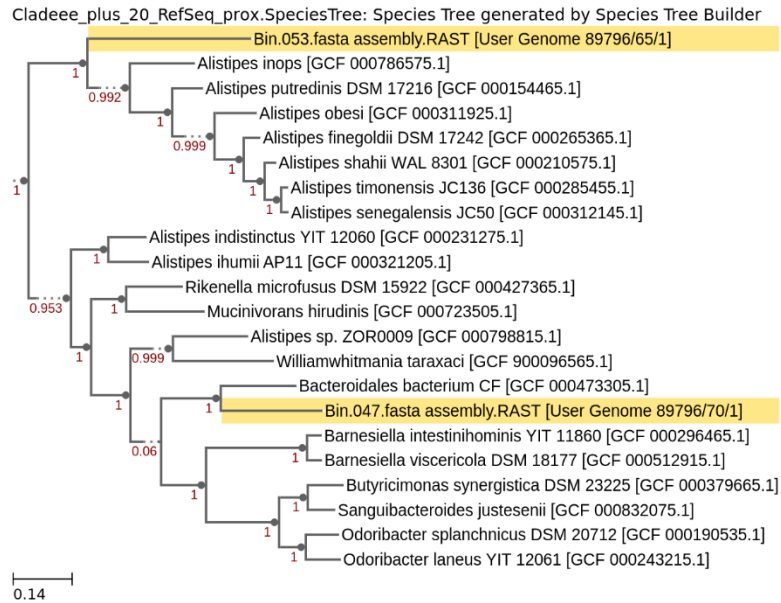
correlación positiva sobre el aumento en el rendimiento en producción de leche, su porcentaje de grasa y la reducción de emisiones de metano. *Succinivibrio* es productor de acetato, succinato, formato y lactato succínico y además está involucrado en el metabolismo del nitrógeno el cual tiene un efecto en el desarrollo del rumiante [33]–[35]. De acuerdo con el árbol filogenético (Figura 8.10), el MAG correspondiente al bin 057 y clasificado como *UBA9732 900321635*, se encuentra emparentado con orden Spirochaetales, en el clado correspondiente al género *Sphaerochaeta*, su posición dentro del clado sugiere una diferenciación de las especies ya descritas para este género [36], pero con cercanía a *S. coccoides*. Según Caro-Quintero et al., 2012 [37] en su genoma y a diferencia de los demás Spirochaetes, el género *Sphaerochaeta* carece de los genes asociados a motilidad, así como los genes transpeptidasa y transglicosilasa, esta carencia se encuentra relacionada con la estructura de pared celular, lo que genera una morfología esférica diferenciándose de las demás espiroquetas caracterizadas por su forma en espiral. Además de la adquisición de genes correspondientes a bacterias del orden *Clostridiales* del filo Firmicutes, adquiridos por transferencia horizontal y el enriquecimiento de funciones como el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, se han descrito genes codificantes de pectinesterasa, enzima que facilita el rompimiento de la pared celular de las plantas, alterando su pH y por tanto la integridad de la pared [38].



**Figura 8.10.** Árbol filogenético correspondiente al MAG *UBA9732 900321635* (bin 057), de la muestra CAN 12-3-7R1, y su relación con especies cercanas. El árbol fue construido con FastTree2 por el método de máxima verosimilitud con el análisis de un conjunto de 49 genes universales definidos por familias de genes COG, con alineación de secuencias múltiples en cada uno de los genes. Los números de las ramas indican el porcentaje de bootstrap (1000 réplicas).

Uno de los microorganismos más representativos y abundantes en el rumen es *Prevotella* (bin 002, bin 058, bin 080), su actividad está centrada en la degradación de péptidos, proteínas y la utilización de polisacáridos como xilano, pectina y almidón [39], esta capacidad metabólica deriva en la alta producción de succinato y su conversión a propionato, compuesto que regula los niveles de glucosa en el animal utilizando la vía de gluconeogénesis, se ha reportado que *P.ruminicola* (bin 043 KNT 12-3-7R1-2) posee un mayor número de enzimas de tipo GH (glicosil-hidrolasa) que *P.bryantii* (bin 058) y *P.albensis* (bin 080) [40].

Por otra parte, para la muestra KNT 12-3-7R1-2 14 MAGs, 5 con clasificación de género y especie, 5 clasificaciones únicamente de género y 4 clasificaciones a nivel de familia. Dentro de los bins con clasificación en género se encuentra el MAG *Desulfovibrio* sp (bin 057), un microorganismo denominado “fastidioso” que requiere de condiciones especiales para su cultivo, en el rumen es capaz de utilizar sulfato como aceptor terminal de electrones mediante oxidación anaerobia, está involucrado en el metabolismo del azufre y su regulación, así como su implicación en la regulación de acidosis láctica por su capacidad de usar lactato [41]–[43]. Algunos microorganismos tienen la capacidad de metabolizar productos tóxicos como *Pyramidobacter* (bin 000), capaz de degradar fluoroacetato el cual se acumula en forrajes y convertirlo en fluoruro y acetato [44]; finalmente *Butyrivibrio* (bin 005, 030) ha sido descrito como parte de las bacterias degradadoras de fibra que son capaces de metabolizar polisacáridos insolubles como el xilano y pectinas, actualmente se tiene el registro de tres especies ruminales de *Butyrivibrio* (*B.fibrisolvens*, *B.hungatei* y *B.proteoclasticus*), se ha reportado que este género posee el mayor número de enzimas tipo CAZy que el resto de Firmicutes ruminales [45]–[47]. Las clasificaciones de los MAGs RC9 900316245 (bin 053) y UBA1232 002309115 (bin 047) hacen parte del filo Bacteroidetes, según la clasificación de la base de datos GTB-tk, el bin 053 corresponde al género RC9, denominado “*Rikenellaceae* RC9 gut group”, este ha sido asociado al metabolismo de lípidos en dietas altas en grasas en ratones [48], a diferencia de lo reportado en rumiantes donde su abundancia está relacionada con dietas a base de forraje [49], [50]. El género UBA 1232 del MAG UBA1232 002309115, quien también hace parte de los Bacteroidales, ha sido reportado como parte de la microbiota en gallinas y renombrado como *Candidatus Egerieousia* [51]. Por otra parte, el árbol filogenético (Figura 8.11) muestra la posición de estos dos MAGs y sus parientes cercanos, con géneros de la familia *Rikenellaceae* y con cercanía a la clasificación *Bacteroidales bacterium CF*, un grupo no definido dentro del orden Bacteroidales [52].



**Figura 8.10.** Árbol filogenético correspondiente al MAG *RC9 900316245* (bin 053) y *UBA1232 002309115* (bin 047), de la muestra KNT 12-3-7R1-2 y su relación con especies cercanas. El árbol fue construido con FastTree2 por el método de máxima verosimilitud con el análisis de un conjunto de 49 genes universales definidos por familias de genes COG, con alineación de secuencias múltiples en cada uno de los genes. Los números de las ramas indican el porcentaje de bootstrap (1000 réplicas).

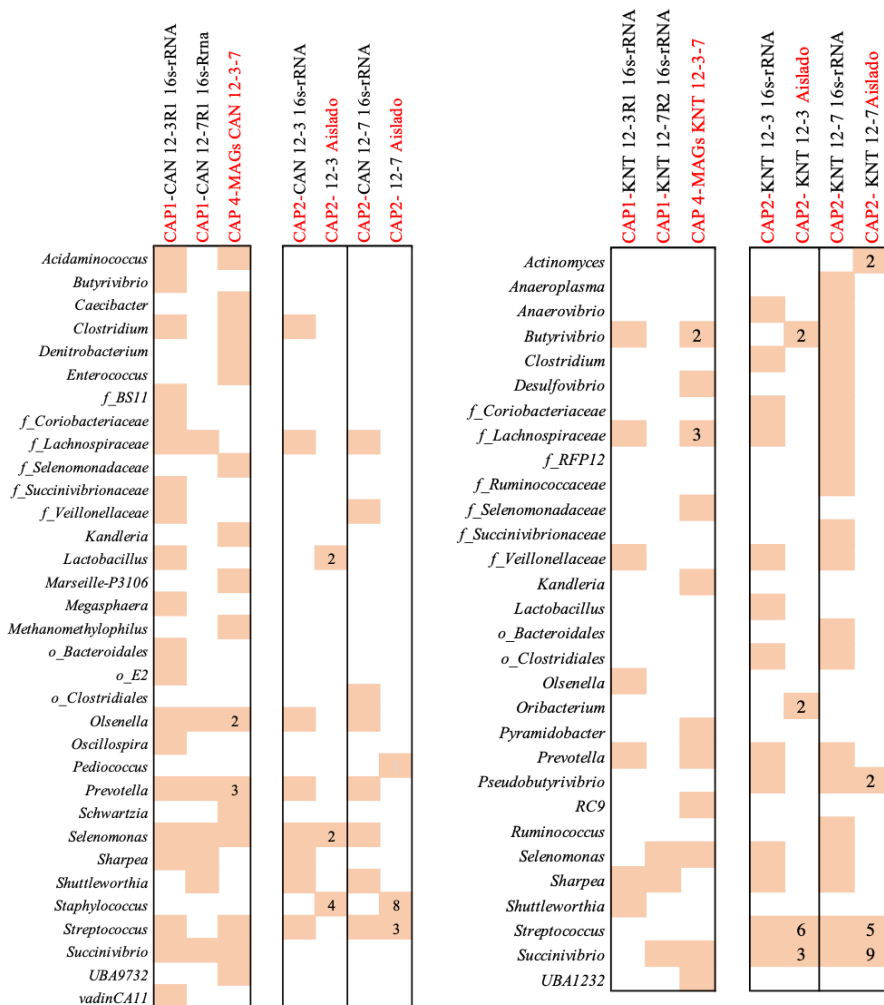
Aquellos MAGs clasificados hasta familia para ambas muestras, pueden sugerir un posible nuevo microorganismo dentro de esta clasificación.

### 8.3.1.3.1 Relación de los taxones enriquecidos, aislados y reconstruidos

Los resultados de los taxones clasificados durante los capítulos uno, dos y cuatro, permiten establecer si los taxones abundantes se mantienen a pesar de realizar diferentes análisis taxonómicos (metataxonomía, identificación por el gen 16s rRNA y reconstrucción metagenómica) y de tener replicas en el tiempo que pueden aportar a la variabilidad de los datos. La figura 8.11 muestra la comparación de cada muestra según los capítulos y muestreo, la metataxonomía realizada en el capítulo I, guarda relación con el análisis de reconstrucción metagenómica realizado en el capítulo cuatro al tratarse de la misma muestra, mientras que la muestra usada para la meta taxonomía realizada en el capítulo II guarda relación con la identificación por 16s rRNA, estas muestras son diferentes en el tiempo como ya se ha expuesto anteriormente en los capítulos uno y dos.

21 taxones fueron clasificados como abundantes para la muestra CAN 12-3 y 7 R1 (capítulo I), donde 7 taxones están relacionados con MAGs reconstruidos, lo que corresponde al 33 % de lo enriquecido e identificado inicialmente. Por otra parte para el segundo muestreo (capítulo II) de los 8 taxones enriquecidos en ambos tiempos de la muestra CAN 12-, de 3

días de incubación se lograron aislar 2 géneros, mientras que en 7 días de incubación solo 1 género aislado se encuentra en lo enriquecido, lo anterior corresponde al 25 y 13 % de aislamiento de cada muestra, se destaca que dos de los aislamientos *Pediococcus* y *Staphylococcus* no se observaron en el enriquecimiento de ningún tiempo de incubación, el *Lactobacillus* fue observado en el enriquecimiento de la muestra del capítulo I, en 3 días de incubación. Para KNT 12-3 y 7R1-2, 9 taxones se observaron abundantes de los cuales 6 coinciden en los MAGs reconstruidos, siendo el 67 % de lo enriquecido. En el segundo muestreo solo 2 y 3 taxones fueron aislados de lo enriquecido en 3 y 7 días en ambos casos esto solo corresponde al 15 % de lo enriquecido en cada muestra. los aislados de *Oribacterium* y *Actinomyces* no se encontraban en el enriquecimiento. En cuanto a los MAGs reconstruidos y los aislamientos obtenidos, de la muestra CAN únicamente hay una relación con el género de *Selenomonas*, en el caso de KNT, los géneros *Butyrivibrio* y *Succinivibrio* que fueron aislado se podrían relacionar con los MAGs reconstruidos para estos géneros.



**Figura 8.11.** Comparación de los taxones mas abundantes clasificados para las muestras CAN 12 3-R1, CAN 12 7-R1, KNT 12-3R1 y KNT 12-7R2 en ausencia y presencia, con la utilización de metataxonomía (capitulo 1, 2), identificación del gen 16s rRNA (capitulo 2) y

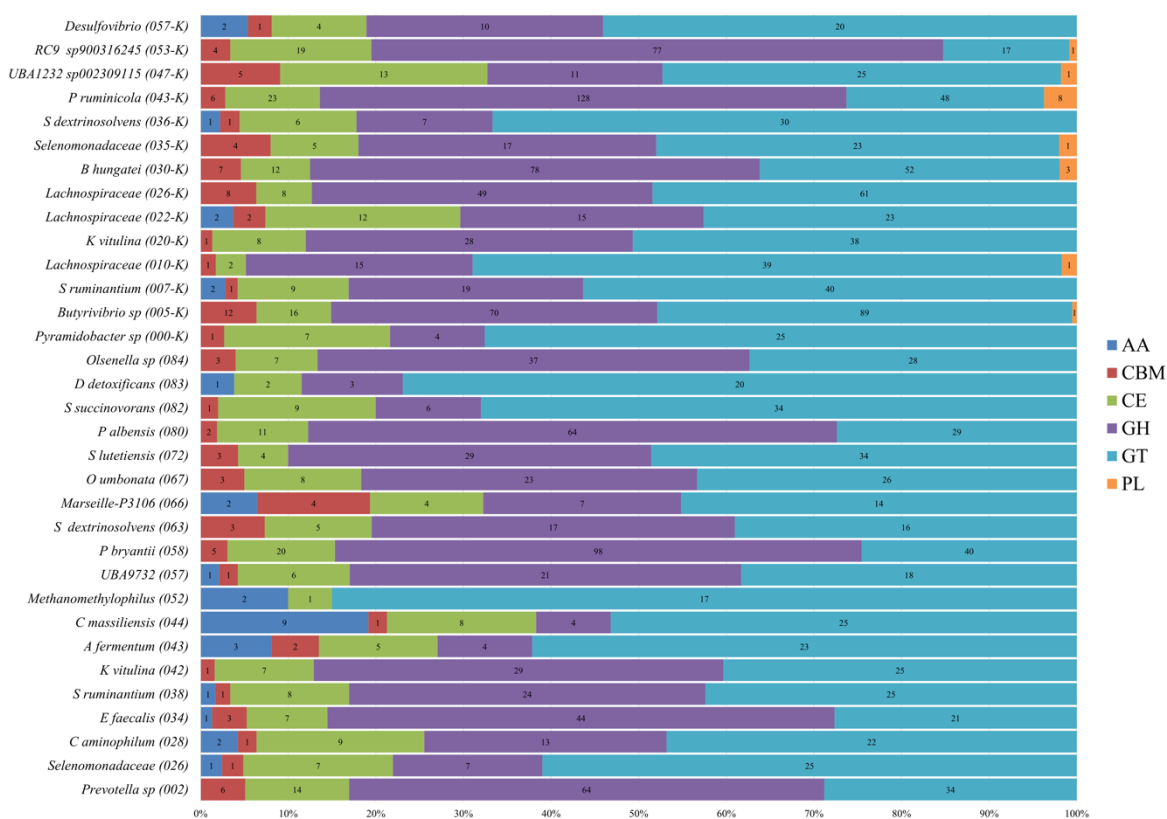
reconstrucción metagenómica de MAGS (capítulo 4). Los números en las casillas de aislamiento corresponden al número de aislados obtenidos en dicho taxón y puede representar más de una especie, en la casilla de los MAGs resultantes el número también indica, cuántos MAGs reconstruidos pertenecen al taxón y pueden indicar diferentes especies.

#### 8.3.1.4 Funcionalidad de enzimas degradadoras de carbohidratos

En el metabolismo de los carbohidratos se encuentran seis grupos de enzimas denominadas CAZymes, las Glicosil-Hidrolasa (GH), hidrolizan los enlaces glicosídicos de polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, almidón), las Glicosil-Transferasas (GT) catalizan la formación de enlaces glicosídicos, transfiriendo grupos glicosil a un aceptor, las enzimas Polisacárido-Liasas (PL) catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos en polisacáridos, las Carbohidrato-Esterasas (CE) catalizan la liberación de grupos acil o alquil unidos por un enlace éster a polisacáridos, las Actividades Auxiliares (AA) abarcan las enzimas redox que actúan conjuntamente con las GH, GT, PL y CE. Finalmente, las enzimas de Módulo de Unión a Carbohidratos (CBM), módulos de proteínas capaces de unir carbohidratos. Un total de 79,413 genes codificantes de proteínas fueron determinados en los 33 MAGs mediante RAST-tk, estas proteínas a su vez fueron mapeadas con la base de datos de CAZy utilizando DRAM. Como resultado, la Figura 8.12 muestra la abundancia relativa de los seis grupos de enzimas en los 33 MAGs, las familias GH y GT son las más abundantes, oscilando en cada MAG entre 8.5-652 % y 14.4-85 % de abundancia respectivamente, de manera global ambas enzimas representan el 41 % de la abundancia total. Este resultado difiere de lo reportado por Stewart et al., 2018 [53], con el ensamblaje de 913 RUGs (Genomas No cultivados del Rumen) resultantes de 42 microbiomas de bovinos Scottish, 69,678 secuencias contaron con al menos una actividad relacionada con carbohidratos, la distribución de los grupos CAZy mostró que hay un mayor número de enzimas GH (50 %), seguido de GT (27 %). Li et al., 2020 [54] reportaron un total de 545,334 CAZymes de los cuales el 50% se catalogaron con actividad de degradación, el 97 % a la familia GH y un 3% en la familia PL, a partir de muestras de contenido ruminal de 10 bovinos Holstein y Charolais. Los MAGs que se identificaron con el mismo género y/o especie en ambas muestras, se observan con abundancias similares para todas las familias entre sí de enzimas, a excepción de *S. dextrinosolvens* (036-K, 063) en los cuales se presenta una diferencia de abundancia en las enzimas GT y GH con un 65, 15% para 036-K y 40% para 063, adicionalmente el grupo AA y CMB componen el 5% de la abundancia en 036-K. El perfil CAZy para el género *Prevotella* se correlaciona con lo reportado por Purushe et al., 2010 [55], reportando la presencia de los 5 módulos, con una dominancia de la familia GH y abundancia del PL en *P. ruminicola*. Por otra parte, las familias CE y CBM se encuentran en la mayoría de los MAGs pero con baja abundancia en un 5 y 15% respectivamente, las familias AA y PL se encuentran en menor abundancia y son exclusivas de algunos MAGs como *Desulfovibrio* sp, *S. dextrinosolvens* (0.36-K), *Lachnospiraceae* (022-k), *S.ruminantium* (007 y 038), *D. detoxificans*, *Marseille-P3106*, *UBA9732*, *Methanomethylophilus* sp, *C. massiliensis*, *A. fermentum*, *E. faecalis*, *C. aminophilum*, *Selenomonadaceae* (026) para AA y RC9, *UBA1232*, *P. ruminicola*,

*Selenomonadaceae* (035-K), *B. hungatei*, *Lachnospiraceae* (010-k) y *Butyrivibrio* sp para PL.

De acuerdo con el sustrato cada microorganismo tendrá enzimas especializadas para su degradación, esto es posible observar en las figuras 8.13 y 8.14, en ambas figuras se observa de manera abundante enzimas para los siguientes sustratos: Celulosa (GH1, GH2, GH3, GH5, GH8, GH9, GH10, GH16, GH94), quitina (GH18, GH19, GH23, GH73, CE4(quitin deacetilasa), GH20, GH84) siendo dominante para los MAGs *D. detoxificans* (083) y *S. succinovorans* (082) (fig 8.13) siendo una característica relevante para esta especie al tener como único reporte su capacidad de fermentar únicamente succinato [20].



**Figura 8.13** Distribución de la abundancia relativa de las familias de enzimas CAZy en los 33 MAGs. GH: Glicosil-Hidrolasas, GT: Glycosil-Transferasas, PL: Polisacarido-Liasas, CE: Carbohidrato-Esterasas, AA: Actividades-Auxiliares, CBM: Modulo de Unión a Carbohidratos. Los nombres de MAGs con la letra -K en el número de bin, corresponden a los MAGs de la muestra KNT 12-3-7R1-2, los demás corresponden a CAN 12-3-7R1, los números dentro de cada barra corresponden al número de enzimas por familia.

Esto sugiere que existe una influencia en la producción de estas enzimas y el control de población de hongos anaerobios dentro del rumen, inhibiendo la solubilización de celulosa, así como la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta y la liberación de

endoglucanasas [56]. Almidón (GH126, GH13, GH57, GH133, GH97) ausente en (fig 8.13) *D. detoxificans* (083), *S. succinovorans* (082), *Methanomethylophilus* (052), *A. fermentum* (043), y (fig 8.14) *UBA1232* (047). La mayor parte de microorganismos que habitan en el rumen tienen la capacidad de degradar celulosa debido a la ingesta constante de material vegetal como forraje por parte del rumiante, sin embargo, esta capacidad no está sujeta a un solo grupo de microorganismos, para esto existe la intervención y actividad sinérgica de diferentes microorganismos dotados con enzimas específicas para su degradación [57], la celulosa es un polisacárido difícil de degradar debido a su estructura, su degradación puede ocurrir mediante enzimas como las mencionadas anteriormente por los MAGs o por complejos organizados en *Celulosomas* [58], de acuerdo con la anotación de enzimas por dbCAN no se encontraron coincidencias para este complejo. La celulosa posee una estructura cristalina y amorfa, la mayoría de los microorganismos son capaces de degradar la forma amorfa, mediada principalmente por endoglucanasas, mientras que para la forma cristalina es necesario de exoglucanasas que actúen sobre el extremo no reductor y reductor[58]. De los 33 MAGs únicamente *E. faecalis* (034), es capaz de degradar ambos tipos de celulosa, esto muestra parte de la sinergia que existe dentro del fluido ruminal tomado bajo la dieta de forraje para su degradación.

Los MAGs (Figura 8.13) *D. detoxificans* (083), *Methanomethylophilus* (052), *Marseille-P3106* (066), *C massiliensis* (044), *A. fermentum* (043) en mayor abundancia, *C. aminophilum* (028) y (Figura 8.13) *Desulfovibrio* (057) y *Lachnospiraceae* (022) en menor abundancia poseen capacidad de degradar polifenoles, a través de una enzima de actividad-auxiliar (AA4) encargada de degradar anillos aromáticos de polifenoles, estos compuestos se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos [59] y pueden estar presentes en variedad de forrajes [60].

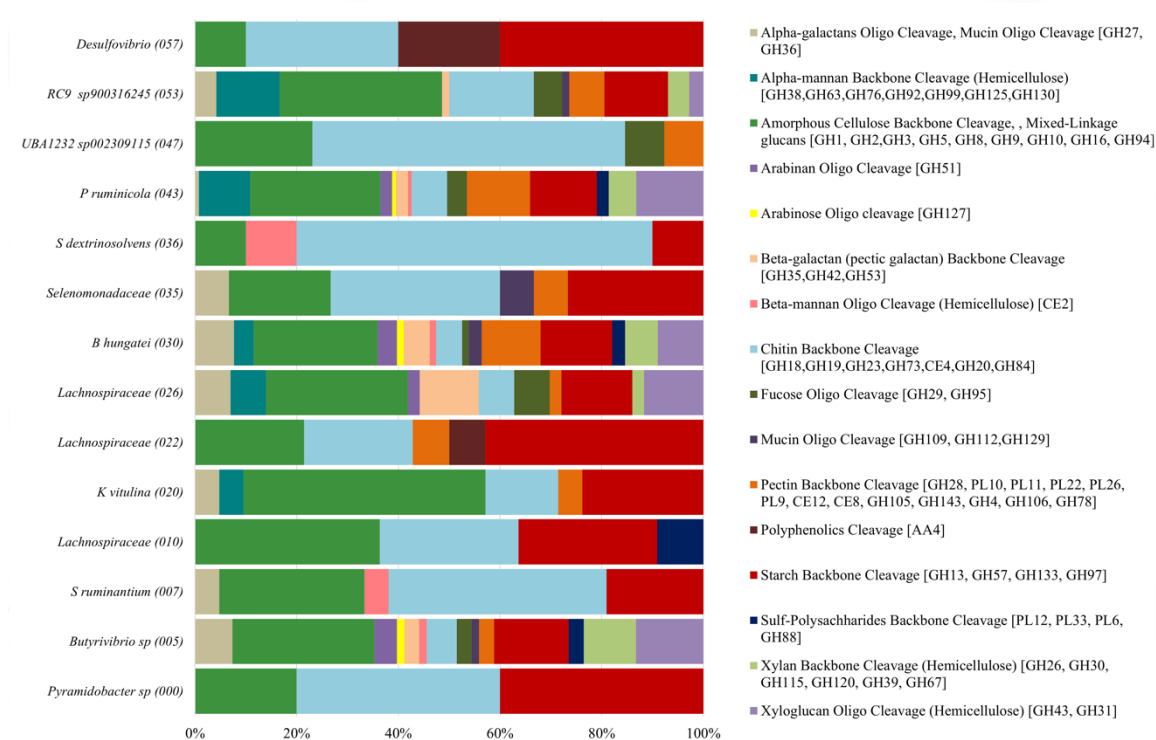


**Figura 8.13:** Distribución de la abundancia relativa de degradación y/o afinidad a sustratos de carbono para cada uno de los MAGs de la muestra CAN 12-3-7R1-2. Sustratos:  $\alpha$ -Galactano,  $\alpha$ -Manano, Celulosa amorfa, Arabinosa,  $\beta$ -galactano,  $\beta$ -manano, Quitina, Celulosa cristalina, Fucosa, Mucina, Pectina, Polifenoles, Almidón, Polisacaridos sulfatados, Xilan, Xiloglucano.

Pocos MAGs presentan la capacidad de degradar xilan, esta función se encuentra presente en todas las especies del género *Prevotella* (080, 058, 002, (CAN 12-3-7R1) 043, (KNT 12-3-7R1-2)) siendo bacterias no-celulolíticas con capacidad de degradar xilan y con más de 100 enzimas de tipo GH reportadas para *P.bryantii* y *P.ruminicola* [55], en *Streptococcus lutetiensis* (072) (Figura 8.14) esta función no es propia de esta especie, sin embargo, se ha reportado que es capaz de degradar xilan en presencia de ácido tánico, un compuesto presente en algunas plantas de tipo polifenol que forma complejos con proteínas [61], este comportamiento puede estar inducido como efecto de la degradación de estos polifenoles por parte de los microorganismos mencionados anteriormente con dicha capacidad, permitiendo que *S.lutetiensis* tenga capacidad de degradar xilan, al igual que el género *Butyrivibrio* (030, 005) *Lachnospiraceae* (026) y *RC9* (053) (KNT12-3-7R1-2) (Figura 8.14). Palevich et al., 2020 [62] describieron que el género *Butyrivibrio* pertenece a un grupo reducido de microorganismos capaces de degradar xilan y pectina, codificando un amplio número de enzimas a comparación de otros microorganismos habitantes del rumen, dándole la capacidad de crecer en un amplio número de sustratos desde carbohidratos complejos hasta simples.



Esta característica se observa en la figura 8.14 al presentar todas las enzimas de degradación para los sustratos enlistados, a excepción de AA4 para polifenoles, este comportamiento es similar en el MAG *P. ruminicola* (043); los MAGs mencionados anteriormente también tienen capacidad de degradación de Xiloglucan.



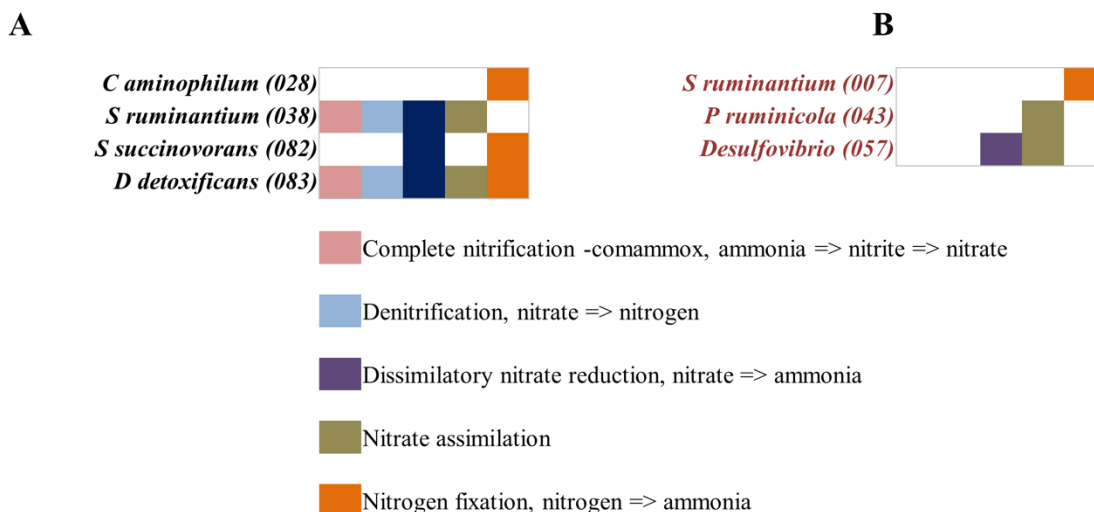
**Figura 8.14.** Distribución de la abundancia relativa de degradación y/o afinidad a sustratos de carbono para cada uno de los MAGs de la muestra KNT 12-3-7R1-2. Sustratos:  $\alpha$ -Galactano,  $\alpha$ -Manano, Celulosa amorfa, Arabinosa,  $\beta$ -galactano,  $\beta$ -manano, Quitina, Celulosa cristalina, Fucosa, Mucina, Pectina, Polifenoles, Almidón, Polisacaridos sulfatados, Xilan, Xiloglucano.

### 8.3.1.5 Funcionalidad de módulos asociados a metabolismo del nitrógeno.

En el metabolismo del nitrógeno la Figura 8.15 muestra a los MAGs de *C. aminophilum* (028), *S. ruminantium* (038 (Figura 8.15-A), 007 (Figura 8.15-B)), *S. succinivorans* (082), *D. detoxificans* (083), *P. ruminicola* (043) y *Desulfovibrio sp* (057), con funciones asociadas a la nitrificación con la oxidación del amonio a nitrito y a nitrato, funciones de desnitrificación, usando como aceptor de electrones al nitrato para liberar nitrógeno, la reducción des-asimilatoria del nitrato hasta la formación de amonio, reducción asimilatoria del nitrato donde se utiliza el amonio para la síntesis de aminoácidos, y finalmente el proceso de fijación de nitrógeno para la obtención de amonio. En el rumen los microorganismos no

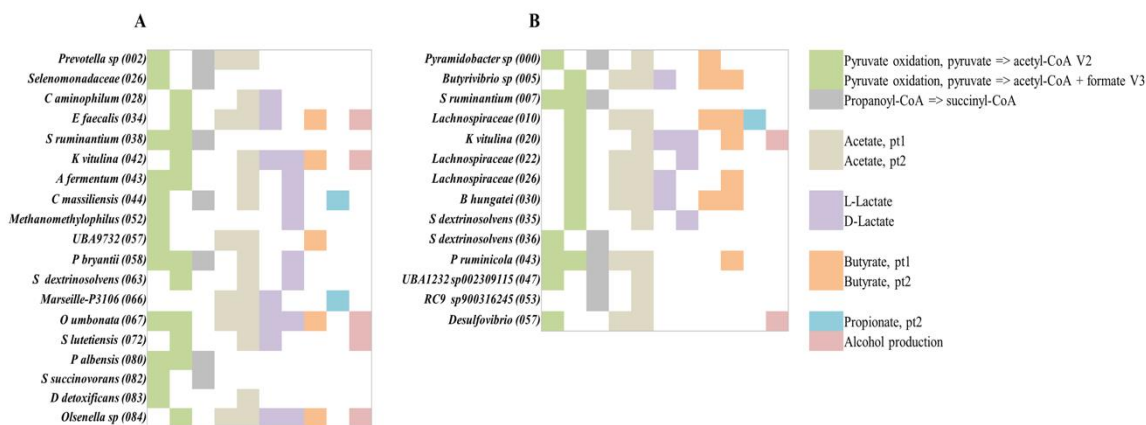
solo desempeñan un papel importante en la degradación de carbohidratos, también se encuentran implicados en la obtención de nitrógeno ( $N_2$ ) a partir de la dieta ingerida, en especial en aquellas con deficiencia de proteína, la mayoría de los microorganismos ruminales tienen capacidad proteolítica siendo este el paso inicial para el metabolismo del nitrógeno [63]. *C. aminophilum* (028), mencionado en los capítulos I y IV, como bacteria hiper-productora de amonio a partir de fuentes como aminoácidos o péptidos [31], característica relacionada con la Figura 8.15, a la fecha no existen reportes genómicos o metabolómicos que describan el metabolismo del nitrógeno para esta especie. *S. ruminantium* (038 (Figura 8.15-A), 007 (Figura 8.15-B)), es una bacteria predominante en el ecosistema ruminal, capaz de degradar diferentes carbohidratos tanto complejos como simples pero con predominancia sobre los simples producto de la hidrólisis de otros microorganismos, además metaboliza un amplio rango de compuestos nitrogenados como amoniaco para producción de aminoácidos, proteínas, síntesis de aminoácidos, urea y reducción de nitratos [64], estas características son heterogéneas en los MAGs clasificados como *Selenomonas*, puesto que únicamente se ven reflejadas en su mayoría en el MAG *S. ruminantium* (038), diferenciándose de *S. ruminantium* (007) quien únicamente muestra el módulo de fijación de nitrógeno, lo anterior puede estar ligado a la alta variabilidad genética de la especie la cual ya ha sido reportada [65]. La detección de dos módulos asociados al metabolismo del nitrógeno (reducción des-asimilatoria del nitrato y fijación del nitrógeno) para *S. succinivorans* (082) proporciona más información a su caracterización al ser un microorganismo poco estudiado, puesto que lo reportado por Van Gylswyk et al., 1997 [20] describen la carencia de fermentar aminoácidos, péptidos, hidrolizar caseína, o reducir nitrato. El género *Denitrobacterium* comprende una sola especie reportada *D. detoxificans* [52] productora acetato, con capacidad de utilizar nitrato 3-nitropropanol, 2-nitropropanol, 3-nitropropionato, nitroetanol, nitro-etano, 1-nitropropano, 2-nitrobutano, DMSO y óxido de trimetilamina como aceptores de electrones [17], el MAG *D. detoxificans* (083) presenta los cinco módulos asociados al metabolismo del nitrógeno. *Prevotella* es un género que en el rumen tiene un rol proteolítico, utiliza péptidos y amoniaco como fuente de nitrógeno, en especial *P. ruminicola* [55], [66], de los MAGs identificados para este género, únicamente *P. ruminicola* (043) presenta uno de los módulos siendo la asimilación de nitrato, este proceso involucra la utilización de nitrato como fuente de nitrógeno y su síntesis hacia formas orgánicas [67], finalmente *Desulfovibrio* sp (057) hace parte del grupo de las bacterias reductoras de sulfatos (SRB), las cuales utilizan el sulfato y compuestos oxigenados de azufre como aceptores finales de electrones en el proceso de respiración, como resultado se da la reducción de a sulfuro de hidrogeno, han sido aislados de suelo y agua bajo diferentes condiciones incluidas extremófilas, han sido estudiadas por su capacidad de degradar compuestos como petróleo y derivados, siendo el género *Desulfovibrio* sp de los más recuperados en suelos contaminados con petróleo, con capacidad de usar hidrogeno, lactato y piruvato como aceptor de electrones [68]. A pesar de que se conoce que estas bacterias SRB están presentes en el intestino humano con efectos sobre la enfermedad del colon, y demostrando su capacidad de fijar nitrógeno [69], se conoce únicamente de los aislamientos

realizados por Huisingh J et al., 1974, Howard B. H & Hungate R.E 1976 [41], [70] a partir de muestras de rumen en ovejas, hasta el momento no se conoce sobre su rol en el metabolismo del nitrógeno ruminal.



**Figura 8.15.** Ausencia-presencia de los módulos relacionados al metabolismo del nitrógeno en los MAGs, mediante la anotación realizada con RAST-tk. A: MAGs de CAN 12-3-7R1-2. B: MAGs de KNT 12-3-7R1-2.

### 8.3.1.6 Funcionalidad de módulos asociados a producción de ácidos grasos de cadena corta (AGVs) y producción de alcohol.



**Figura 8.16.** Ausencia-presencia de los módulos relacionados a la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs) mediante la anotación realizada con RAST-tk. A: MAGs de CAN 12-3-7R1-2. B: MAGs de KNT 12-3-7R1-2.

La Figura 8.16, muestra que la mayoría de los MAGs cuentan con el módulo de la oxidación de piruvato a excepción de *Marseille-P3106 (066)* y *RC9 (053)*, 11 MAGs utilizan únicamente la oxidación de piruvato a acetil-CoA V2, el cual hace referencia a la descarboxilación del piruvato con la liberación de CO<sub>2</sub>, la reducción oxidativa del NAD<sup>+</sup> a NADH + H<sup>+</sup>, y la unión de la coenzima A a la molécula oxidada, generando acetil-CoA [72], y 13 MAGs utilizan la oxidación de piruvato a acetil-CoA + formato V3 únicamente, este proceso ocurre en la ruta Wood-Ljungdahl, que se desarrolla a partir de la fermentación de CO en formato y posteriormente en acetil-CoA, esta ruta es predominante en microorganismos anaerobios acetogénicos [72], [74]. De 33 MAGs, el 42% de los MAGs son capaces de producir únicamente acetato, mientras que el 36% produce acetato y butirato, el 9% produce propionato, el 21% produce alcohol y el 54% es capaz de producir lactato, dentro de este grupo de productores de lactato compuesto por 18 MAGs, 7 producen solo la forma isomérica L-lactato, 7 la forma isomérica D-lactato y 4 producen ambas formas. Estos resultados pueden sugerir el perfil de AVGs capaz de producir cada MAG, se destaca que los MAGs del género *Selenomonas (038,007)* y *Selenomonadaceae (026)* carezcan de la presencia de los módulos de acetato, butirato o propionato, puesto que se ha reportado que es un microorganismo productor de acetato y propionato [75], sin embargo, se observa el módulo de succinil-CoA en estos MAGs, relacionado con su metabolismo fermentativo de succinato [76], esta característica se comparte con *S. succinovorans (083)*, *S. dextrinosolvans (036)* y *P. albensis (080)* este último se diferencia de los otras especies de *Prevotella*, quienes muestran la presencia de los módulos relacionados a los ácidos, siendo una de las especies menos caracterizadas y descritas en su rol ecológico en el rumen [77]. El perfil del género *Butyrivibrio* y *Lachnospiraceae* muestra la producción de acetato, L-lactato, butirato y propionato, siendo estos a excepción del propionato los productos finales de fermentación de *Butyrivibrio* [47]. La diversidad de perfiles obtenidos va ligado a la capacidad de degradación de carbohidratos tanto complejos como simples observados anteriormente en las figuras 8.12-8.14.

Uno de los procesos que se dan dentro del rumen mediado por los microorganismos es la producción de AGVs (principalmente ácido acético, propiónico y butírico), siendo de beneficio energético en los rumiantes [71]. Las rutas Embden-Meterhof-Parnas y Pentosas-fosfato, son las más utilizadas para la conversión de carbohidratos a monómeros y a fosfoenolpiruvato, posteriormente son fermentados en ácidos orgánicos y/o alcohol mediante el metabolismo del piruvato principalmente o rutas alternas. Los AGVs producidos son absorbidos en las paredes de los compartimientos de pre-abomaso mediante difusión, posteriormente son transportados hacia la sangre hasta el hígado para ser utilizados como sustrato y energía para diversas funciones como el metabolismo de los lípidos y colesterol en diferentes tejidos, así como el mantenimiento de las funciones corporales [72].

## **8.4 Conclusión**

El uso de la reconstrucción metagenómica en los dos medios de cultivo utilizados como estrategia de aislamiento, permitió: Primero, comparar contra la composición bacteriana determinada por metataxonomía en cada medio de cultivo. Donde el 33 y 67 % son representados por los MAGs aun cuando varias de las reconstrucciones no se encontraron en el enriquecimiento; no obstante, la información metagenómica permite caracterizar parte de las poblaciones no cultivadas de las muestras. Y segundo, determinar los aspectos metabólicos de los MAGs reconstruidos, determinando que varios de estos microorganismos poseen preferencia sobre sustratos específicos y capacidades especializadas.

Varios de los MAGs analizados pertenecen potencialmente a nuevas especies, ya que su clasificación taxonómica solo se puede determinar a nivel de familias, que además tienen pocos representantes cultivados o que han sido descritos únicamente por métodos independientes de cultivo.

## Referencias

- [1] P. Menzel, K. L. Ng, And A. Krogh, "Fast And Sensitive Taxonomic Classification For Metagenomics With Kaiju," *Nature Communications*, Vol. 7, Apr. 2016, Doi: 10.1038/Ncomms11257.
- [2] D. Li, C. M. Liu, R. Luo, K. Sadakane, And T. W. Lam, "Megahit: An Ultra-Fast Single-Node Solution For Large And Complex Metagenomics Assembly Via Succinct De Bruijn Graph," *Bioinformatics*, Vol. 31, No. 10, Pp. 1674–1676, 2015, Doi: 10.1093/Bioinformatics/Btv033.
- [3] S. Nurk, D. Meleshko, A. Korobeynikov, And P. A. Pevzner, "Metaspades: A New Versatile Metagenomic Assembler," *Genome Research*, Vol. 27, No. 5, Pp. 824–834, 2017, Doi: 10.1101/Gr.213959.116.
- [4] Y. Peng, H. C. M. Leung, S. M. Yiu, And F. Y. L. Chin, "Idba-Ud: A De Novo Assembler For Single-Cell And Metagenomic Sequencing Data With Highly Uneven Depth," *Bioinformatics*, Vol. 28, No. 11, Pp. 1420–1428, 2012, Doi: 10.1093/Bioinformatics/Bts174.
- [5] Y. W. Wu, B. A. Simmons, And S. W. Singer, "Maxbin 2.0: An Automated Binning Algorithm To Recover Genomes From Multiple Metagenomic Datasets," *Bioinformatics*, Vol. 32, No. 4, Pp. 605–607, Feb. 2016, Doi: 10.1093/Bioinformatics/Btv638.
- [6] D. D. Kang et al., "Metabat 2: An Adaptive Binning Algorithm For Robust And Efficient Genome Reconstruction From Metagenome Assemblies," *Peerj*, Vol. 2019, No. 7, 2019, Doi: 10.7717/Peerj.7359.
- [7] J. Alneberg et al., "Binning Metagenomic Contigs By Coverage And Composition," *Nature Methods*, Vol. 11, No. 11, Pp. 1144–1146, Nov. 2014, Doi: 10.1038/Nmeth.3103.
- [8] C. M. K. Sieber et al., "Recovery Of Genomes From Metagenomes Via A Dereplication, Aggregation And Scoring Strategy," *Nature Microbiology*, Vol. 3, No. 7, Pp. 836–843, 2018, Doi: 10.1038/S41564-018-0171-1.
- [9] D. H. Parks, M. Imelfort, C. T. Skennerton, P. Hugenholtz, And G. W. Tyson, "Checkm: Assessing The Quality Of Microbial Genomes Recovered From Isolates, Single Cells, And Metagenomes," *Genome Research*, Vol. 25, No. 7, Pp. 1043–1055, 2015, Doi: 10.1101/Gr.186072.114.
- [10] T. Brettn et al., "Rasttk: A Modular And Extensible Implementation Of The Rast Algorithm For Building Custom Annotation Pipelines And Annotating Batches Of Genomes," 2015, Doi: 10.1038/Srep08365.
- [11] P. A. Chaumeil, A. J. Mussig, P. Hugenholtz, And D. H. Parks, "Gtdb-Tk: A Toolkit To Classify Genomes With The Genome Taxonomy Database," *Bioinformatics*, Vol. 36, No. 6, Pp. 1925–1927, 2020, Doi: 10.1093/Bioinformatics/Btz848.
- [12] L. M. Rodriguez-R et al., "The Microbial Genomes Atlas (Miga) Webserver: Taxonomic And Gene Diversity Analysis Of Archaea And Bacteria At The Whole Genome Level," *Web Server Issue Published Online*, Vol. 46, 2018, Doi: 10.1093/Nar/Gky467.
- [13] M. Shaffer et al., "Dram For Distilling Microbial Metabolism To Automate The Curation Of Microbiome Function," *Nucleic Acids Research*, Vol. 48, No. 16, Pp. 8883–8900, 2020, Doi: 10.1093/Nar/Gkaa621.
- [14] L. Huang et al., "Dbcan-Seq: A Database Of Carbohydrate-Active Enzyme (Cazyme) Sequence And Annotation," *Nucleic Acids Research*, Vol. 46, 2018, Doi: 10.1093/Nar/Gkx894.
- [15] M. Kanehisa, Y. Sato, And K. Morishima, "Blastkoala And Ghostkoala: Kegg Tools For Functional Characterization Of Genome And Metagenome Sequences," *Journal Of Molecular Biology*, Vol. 428, No. 4, Pp. 726–731, Feb. 2016, Doi: 10.1016/J.jmb.2015.11.006.
- [16] S. J. Noel, O. Højberg, T. Urich, And M. Poulsen, "Draft Genome Sequence Of 'Candidatus Methanomethylphilus' Sp. Ir26, Enriched From Bovine Rumen, A Methanogenic Archaeon Belonging To The Methanomassiliicoccales Order," *Genome Announcements*, Vol. 4, No. 1, 2016, Doi: 10.1128/Genomea.01734-15.
- [17] R. C. Anderson, M. A. Rasmussen, N. S. Jensen, And M. J. Allison, "Denitrobacterium Detoxicifans Gen. Nov., Sp. Nov., A Ruminant Bacterium That Respirates On Nitrocompounds," 2000.
- [18] M. Kraatz, R. J. Wallace, And L. Svensson, "Olsenella Umbonata Sp. Nov., A Microaerotolerant Anaerobic Lactic Acid Bacterium From The Sheep Rumen And Pig Jejunum, And Emended Descriptions Of Olsenella, Olsenella Uli And Olsenella Profusa," *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, Vol. 61, No. 4, Pp. 795–803, 2011, Doi: 10.1099/Ijs.0.022954-0.
- [19] S. Sawanon, S. Koike, And Y. Kobayashi, "Evidence For The Possible Involvement Of Selenomonas Ruminantium In Rumen Fiber Digestion," Doi: 10.1111/J.1574-6968.2011.02427.X.
- [20] N. O. Van Gylswyk, H. Hippe, And F. A. Rainey, "Schwartzia Succinivorans Gen. Nov., Sp. Nov., Another Ruminant Bacterium Utilizing Succinate As The Sole Energy Source," *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, No. 1, Pp. 155–159, 1997, Doi: 10.1099/00207713-47-1-155.
- [21] D. Ricaboni, M. Mailhe, A. Benezech, F. Cadoret, P. E. Fournier, And D. Raoult, "'Caecibacter Massiliensis' Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated From Human Right Colon," *New Microbes And New Infections*, Vol. 17, Pp. 30–32, May 2017, Doi: 10.1016/J.nmni.2016.11.021.
- [22] Y. J. Chang et al., "Complete Genome Sequence Of Acidaminococcus Fermentans Type Strain (Vr4 T)," *Standards In Genomic Sciences*, Vol. 3, No. 1, Pp. 1–14, 2010, Doi: 10.4056/Sigs.1002553.
- [23] G. M. Cook, J. E. Wells, And J. B. Russell, "Ability Of Acidaminococcus Fermentans To Oxidize Trans-Aconitate And Decrease The Accumulation Of Tricarballic Acid, A Toxic End Product Of Ruminant Fermentation," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 7, Pp. 2533–2537, 1994, Doi: 10.1128/Aem.60.7.2533-2537.1994.
- [24] S. Kumar et al., "Sharpea And Kandleria Are Lactic Acid Producing Rumen Bacteria That Do Not Change Their Fermentation Products When Co-Cultured With A Methanogen," *Anaerobe*, Vol. 54, Pp. 31–38, Dec. 2018, Doi: 10.1016/J.anaerobe.2018.07.008.
- [25] L. B. Oyama et al., "Buwchitin: A Ruminant Peptide With Antimicrobial Potential Against Enterococcus Faecalis," *Frontiers In Chemistry*, Vol. 5, No. July, Pp. 1–12, 2017, Doi: 10.3389/Fchem.2017.00051.
- [26] G. Goel, A. Kumar, V. Beniwal, M. Raghav, A. K. Puniya, And K. Singh, "Degradation Of Tannic Acid And Purification And Characterization Of Tannase From Enterococcus Faecalis," 2011, Doi: 10.1016/J.lbi.2011.08.006.
- [27] A. Pompilio, G. Di Bonaventura, And G. Gherardi, "An Overview On Streptococcus Bovis/Streptococcus Equinus Complex Isolates: Identification To The Species/Subspecies Level And Antibiotic Resistance," *International Journal Of Molecular Sciences*, Vol. 20, No. 3, 2019, Doi: 10.3390/Ijms20030480.
- [28] D. Aphale, A. Natu, S. Laldas, And A. Kulkarni, "Administration Of Streptococcus Bovis Isolated From Sheep Rumen Digesta On Rumen Function And Physiology As Evaluated In A Rumen Simulation Technique System," *Veterinary World*, Vol. 12, No.

- 9, Pp. 1362–1371, 2019, Doi: 10.14202/Vetworld.2019.1362-1371.
- [29] J. C. Lagier et al., “Naming Microorganisms: The Contribution Of The Ihu Méditerranée Infection, Marseille, France,” *New Microbes And New Infections*, Vol. 26, Pp. S89–S95, Nov. 2018, Doi: 10.1016/J.Nmni.2018.08.006.
- [30] L. Schoefer, R. Mohan, A. Schwirtz, A. Braune, And M. Blaut, “Anaerobic Degradation Of Flavonoids By Clostridium Orbiscindens Downloaded From,” *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 10, Pp. 5849–5854, 2003, Doi: 10.1128/Aem.69.10.5849-5854.2003.
- [31] B. J. Paster, J. B. Russell, C. M. J. Yang, J. M. Chow, C. R. Woese, And R. Tanner, “Phylogeny Of The Ammonia-Producing Ruminant Bacteria *Peptostreptococcus Anaerobius*, *Clostridium Sticklandii*, And *Clostridium Aminophilum* Sp. Nov.,” *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol. 43, No. 1, Pp. 107–110, 1993, Doi: 10.1099/00207713-43-1-107.
- [32] J. L. Rychlik And J. B. Russell, “The Adaptation And Resistance Of *Clostridium Aminophilum* F To The Butyrylvibriocin-Like Substance Of *Butyrylvibrio Fibrisolvens* J15 And Monensin,” *Fems Microbiology Letters*, Vol. 209, No. 1, Pp. 93–98, Mar. 2002, Doi: 10.1111/J.1574-6968.2002.Tb11115.X.
- [33] S. M. O’herrin And W. R. Kenealy, “Glucose And Carbon Dioxide Metabolism By *Succinivibrio Dextrinosolvens*,” *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 3, Pp. 748–755, 1993, Doi: 10.1128/Aem.59.3.748-755.1993.
- [34] G. Tsiamis, S. Schmitz-Esser, S. Mahmoud Nasrollahi, S. Zhao, J. Wang, And S. Hailemariam, “Complete Genome Sequencing And Transcriptome Analysis Of Nitrogen Metabolism Of *Succinivibrio Dextrinosolvens* Strain Z6 Isolated From Dairy Cow Rumen,” 2020, Doi: 10.3389/Fmicb.2020.01826.
- [35] M. P. Bryant And N. Small, “Characteristics Of Two New Genera Of Anaerobic Curved Rods Isolated From The Rumen Of Cattle.,” *J Bacteriol*, Vol. 72, No. 1, Pp. 22–26, 1956, Doi: 10.1128/Jb.72.1.22-26.1956.
- [36] B. Abt Et al., “*Sphaerochaeta Coccoides* Comb. Nov.,” *Standards In Genomic Sciences*, Vol. 6, Pp. 194–209, 2012, Doi: 10.4056/Sigs.2796069.
- [37] A. Caro-Quintero, K. M. Ritalahti, K. D. Cusick, F. E. Löffler, And K. T. Konstantinidis, “The Chimeric Genome Of *Sphaerochaeta*: Nonspiral Spirochetes That Break With The Prevalent Dogma In Spirochete Biology,” *Mbio*, Vol. 3, No. 3, Pp. 1–9, 2012, Doi: 10.1128/Mbio.00025-12.
- [38] W. J. Kelly et al., “Occurrence And Expression Of Genes Encoding Methyl-Compound Production In Rumen Bacteria,” *Animal Microbiome*, Vol. 1, No. 1, Pp. 1–13, Dec. 2019, Doi: 10.1186/S42523-019-0016-0.
- [39] G. Avgustin, J. R. Wallace, And H. J. Flint, “Phenotypic Diversity Among Ruminant Isolates Of *Prevotella Ruminicola*: Proposal Of *Prevotella Brevis* Sp. Nov., *Prevotella Byantii* Sp. Nov., And *Prevotella Albensis* Sp. Nov. And Redefinition Of *Prevotella Ruminicola* Selected Phenotypic Characteristics Of I,” *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, No. 2, Pp. 284–288, 1997.
- [40] J. Purushe et al., “Comparative Genome Analysis Of *Prevotella Ruminicola* And *Prevotella Bryantii*: Insights Into Their Environmental Niche,” *Microbial Ecology*, Vol. 60, No. 4, Pp. 721–729, 2010, Doi: 10.1007/S00248-010-9692-8.
- [41] J. Huisingh, J. J. McNeill, And G. Matrone, “Sulfate Reduction By A *Desulfovibrio* Species Isolated From Sheep Rumen,” *Applied Microbiology*, Vol. 28, No. 3, Pp. 489–497, 1974, Doi: 10.1128/Am.28.3.489-497.1974.
- [42] N. Pfennig, F. Widdel, And H. G. Trüper, “The Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria,” In *The Prokaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, 1981, Pp. 926–940. Doi: 10.1007/978-3-662-13187-9\_74.
- [43] F. N. Owens, D. S. Secrist, W. J. Hill, And D. R. Gill, “Acidosis In Cattle: A Review,” *Journal Of Animal Science*, Vol. 76, No. 1. American Society Of Animal Science, Pp. 275–286, 1998. Doi: 10.2527/1998.761275x.
- [44] Z. H. Loh, D. Ouwerkerk, A. V. Klieve, N. L. Hungerford, And M. T. Fletcher, “Toxin Degradation By Rumen Microorganisms: A Review,” *Toxins*, Vol. 12, No. 10. Mdpi Ag, Oct. 20, 2020. Doi: 10.3390/Toxins12100664.
- [45] W. J. Kelly et al., “The Glycobiome Of The Rumen Bacterium *Butyrylvibrio Proteoclasticus* B316t Highlights Adaptation To A Polysaccharide-Rich Environment,” *Plos One*, Vol. 5, No. 8, P. E11942, Aug. 2010, Doi: 10.1371/Journal.Pone.0011942.
- [46] N. Palevich, W. J. Kelly, S. Ganesh, J. Rakonjac, And G. T. Attwood, “*Butyrylvibrio Hungatei* Mb2003 Competes Effectively For Soluble Sugars Released By *Butyrylvibrio Proteoclasticus* B316 T During Growth On Xylan Or Pectin,” *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 85, No. 3, 2019, Doi: 10.1128/Aem.02056-18.
- [47] N. Palevich et al., “Comparative Genomics Of Rumen *Butyrylvibrio* Spp. Uncovers A Continuum Of Polysaccharide-Degrading Capabilities,” *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 86, No. 1, 2020, Doi: 10.1128/Aem.01993-19.
- [48] L. Sun et al., “Cecal Gut Microbiota And Metabolites Might Contribute To The Severity Of Acute Myocardial Ischemia By Impacting The Intestinal Permeability, Oxidative Stress, And Energy Metabolism,” *Frontiers In Microbiology*, Vol. 0, P. 1745, Aug. 2019, Doi: 10.3389/Fmicb.2019.01745.
- [49] H. J. Van Lingen Et al., “Diurnal Dynamics Of Gaseous And Dissolved Metabolites And Microbiota Composition In The Bovine Rumen,” *Frontiers In Microbiology*, Vol. 8, No. Mar, P. 425, 2017, Doi: 10.3389/Fmicb.2017.00425.
- [50] M. Rey, F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez, And V. Monteils, “Establishment Of Ruminant Bacterial Community In Dairy Calves From Birth To Weaning Is Sequential,” *Journal Of Applied Microbiology*, Vol. 116, No. 2, Pp. 245–257, 2014, Doi: 10.1111/Jam.12405.
- [51] R. Gilroy et al., “Extensive Microbial Diversity Within The Chicken Gut Microbiome Revealed By Metagenomics And Culture,” *Peerj*, Vol. 9, Apr. 2021, Doi: 10.7717/Peerj.10941.
- [52] C. L. Schoch et al., “Ncbi Taxonomy: A Comprehensive Update On Curation, Resources And Tools,” *Database*, Vol. 2020, 2020, Doi: 10.1093/Database/Baaa062.
- [53] R. D. Stewart et al., “Assembly Of 913 Microbial Genomes From Metagenomic Sequencing Of The Cow Rumen,” *Nature Communications*, Vol. 9, No. 1, Pp. 1–11, 2018, Doi: 10.1038/S41467-018-03317-6.
- [54] J. Li et al., “A Catalog Of Microbial Genes From The Bovine Rumen Unveils A Specialized And Diverse Biomass-Degrading Environment,” *Gigascience*, Vol. 9, No. 6, Pp. 1–15, 2020, Doi: 10.1093/Gigascience/Giaa057.
- [55] J. Purushe et al., “Comparative Genome Analysis Of *Prevotella Ruminicola* And *Prevotella Bryantii*: Insights Into Their Environmental Niche,” *Microbial Ecology*, Vol. 60, No. 4, Pp. 721–729, 2010, Doi: 10.1007/S00248-010-9692-8.
- [56] K. J. H. B. And S. Cs., “The Effect Of Rumen Chitinolytic Bacteria On Cellulolytic Anaerobic Fungi,” *Lett Appl Microbiol*, Vol. 23, No. 3, Pp. 199–202, 1996, Doi: 10.1111/J.1472-765x.1996.Tb00064.X.
- [57] Lu Zhang et al., “Characteristics Of Rumen Microorganisms Involved In Anaerobic Degradation Of Cellulose At Various Ph Values,” *Rsc Advances*, Vol. 7, No. 64, Pp. 40303–40310, Aug. 2017, Doi: 10.1039/C7ra06588d.
- [58] R. E. Quiroz And J. L. Folch, “Hydrolysis Of Biomass Mediated By Cellulases For The Production Of Sugars,” *Sustainable*

- Degradation Of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications And Commercialization, P. 275, 2013.
- [59] G. Mercado-Mercado, L. De La R. Carrillo, A. Wall-Medrano, J. A. L. Díaz, And E. Álvarez-Parrilla, "Compuestos Polifenólicos Y Capacidad Antioxidante De Especies Típicas Consumidas En México," *Nutricion Hospitalaria*, Vol. 28, No. 1. Sociedad Española De Nutrición Parenteral Y Enteral (Senpe), Pp. 36–46, 2013. Doi: 10.3305/Nh.2013.28.1.6298.
- [60] M. R. F. Lee, "Forage Polyphenol Oxidase And Ruminant Livestock Nutrition," *Frontiers In Plant Science*, Vol. 5, No. Dec. Frontiers Research Foundation, P. 694, Dec. 08, 2014. Doi: 10.3389/Fpls.2014.00694.
- [61] G. Goel, A. K. Puniya, And K. Singh, "Xylanolytic Activity Of Ruminant Streptococcus Bovis In Presence Of Tannic Acid," *Annals Of Microbiology*, Vol. 55, No. 4, Pp. 295–297, 2005.
- [62] N. Palevich et al., "Comparative Genomics Of Rumen Butyrivibrio Spp. Uncovers A Continuum Of Polysaccharide-Degrading Capabilities," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 86, No. 1, Pp. 1–19, 2020, Doi: 10.1128/Aem.01993-19.
- [63] D. Genzebu And G. Tesfay, "The Role Of Bacteria In Nitrogen Metabolism In The Rumen With Emphasis Of Cattle," 2015. Accessed: May 29, 2021. [Online]. Available: [Http://www.apexjournal.org](http://www.apexjournal.org)
- [64] S. C. Ricke, S. A. Martin, D. J. Nisbep, And S. C. Ricke, "Ecology, Metabolism, And Genetics Of Ruminant Selenomonads," *Critical Reviews In Microbiology*, Vol. 22, No. 1, P. 996, 1996.
- [65] P. Pristas, M. Píknova, A. Sprincova, And P. Javorsky, "Genetic Variability Of Rumen Selenomonads.," *Folia Microbiol (Praha)*, Vol. 53, No. 2, Pp. 165–172, 2008.
- [66] R. J. Wallace, G. A. Broderick, L. M. Rode, N. D. Walker, J. Newbold, And J. Kopečný, "Peptidases Of The Rumen Bacterium, *Prevotella Ruminicola*," *Physiology/Structural Biology/Biochemistry Anaerobe*, Vol. 3, Pp. 35–42, 1997.
- [67] X. Jiang And N. Jiao, "Nitrate Assimilation By Marine Heterotrophic Bacteria," *Science China Earth Sciences* 2015 59:3, Vol. 59, No. 3, Pp. 477–483, Nov. 2015, Doi: 10.1007/S11430-015-5212-5.
- [68] T. Govil, N. K. Rathinam, D. R. Salem, And R. K. Sani, *Taxonomical Diversity Of Extremophiles In The Deep Biosphere*. Elsevier Inc., 2018. Doi: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00035-6.
- [69] L. Sayavedra et al., "Desulfovibrio Diazotrophicus Sp. Nov., A Sulfate-Reducing Bacterium From The Human Gut Capable Of Nitrogen Fixation," *Environmental Microbiology*, Vol. 23, No. 6, Pp. 3164–3181, 2021, Doi: 10.1111/1462-2920.15538.
- [70] B. H. Howard And R. E. Hungate, "Desulfovibrio Of The Sheep Rumen.," *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 32, No. 4, P. 598, 1976, Accessed: Oct. 27, 2021. [Online]. Available: </Pmc/Articles/Pmc170313/?Report=Abstract>
- [71] A. K. Puniya, R. Singh, And D. N. Kamra, *Rumen Microbiology: From Evolution To Revolution*, No. January 2015. 2015. Doi: 10.1007/978-81-322-2401-3.
- [72] G. Den Besten, K. Van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D. J. Reijngoud, And B. M. Bakker, "The Role Of Short-Chain Fatty Acids In The Interplay Between Diet, Gut Microbiota, And Host Energy Metabolism," *Journal Of Lipid Research*, Vol. 54, No. 9, Pp. 2325–2340, 2013, Doi: 10.1194/Jlr.R036012.
- [73] N. V. Bhagavan, "Lipids I: Fatty Acids And Eicosanoids," *Medical Biochemistry*, No. Chapter 15, Pp. 365–399, 2002, Doi: 10.1016/B978-012095440-7/50020-2.
- [74] H. N. Abubackar, M. C. Veiga, And C. Kennes, "Ethanol And Acetic Acid Production From Carbon Monoxide In A Clostridium Strain In Batch And Continuous Gas-Fed Bioreactors," *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, Vol. 12, No. 1, Pp. 1029–1043, 2015, Doi: 10.3390/Ijerp120101029.
- [75] Z. Ning, G. T. Attwood, R. A. Lockington, And J. D. Brooker, "Genetic Diversity In Ruminant Isolates Of Selenomonas Ruminantium," *Current Microbiology*, Vol. 22, Pp. 279–284, 1991.
- [76] T. G. Nagaraja, *Rumenology*. 2016. Doi: 10.1007/978-3-319-30533-2.
- [77] D. M. Stevenson And P. J. Weimer, "Dominance Of *Prevotella* And Low Abundance Of Classical Ruminant Bacterial Species In The Bovine Rumen Revealed By Relative Quantification Real-Time Pcr," Pp. 165–174, 2007, Doi: 10.1007/S00253-006-0802-Y.



## CONCLUSION FINAL

Esta investigación representa el primer estudio de este tipo en AGROSAVIA y Colombia, que combina métodos independientes y dependientes de cultivo para la generación de una estrategia de aislamiento de bacterias anaerobias ruminales. Los resultados obtenidos, demuestran que las posibilidades de obtener microorganismos que no habían sido cultivados en la colección CMINA son logrables, desde la utilización de diluciones como método de extinción de muestra y el uso de otros medios de cultivo tanto reportados por literatura como los elaborados en la colección. La limitación humana frente a la imposibilidad de cultivar el cien por ciento de las colonias resultantes durante el proceso de aislamiento, disminuye las posibilidades de recuperación de la comunidad presente. Lograr caracterizar de manera básica los aislados obtenidos en su potencial antimicrobiano no debe ser visto como un hecho aislado, sino que debe comprenderse como un todo desde la ecología microbiana que existe en el rumen, el cual debe ser explorado a fondo. Finalmente, el uso de la metagenómica nos permitió determinar las capacidades metabólicas de la comunidad presente en los medios, generando así nuevas rutas de trabajo sobre la estrategia planteada; a futuro se espera realizar modificaciones de los medios CAN y KNT teniendo en cuenta los metabolismos descritos para cada MAG, con el fin de seleccionar aquellos microorganismos que durante toda la investigación se mostraron enriquecidos en dichos medios. Esta investigación no solo es de gran utilidad para AGROSAVIA, sino también para el campo de la microbiología ruminal, donde el aislamiento de microorganismos ruminales sigue siendo una caja negra con un potencial aun por descubrir.

## Productos

- Poster presentado en el evento ISME LAT 2021 ([https://www.researchgate.net/publication/353559350\\_Assessment\\_of\\_Alternative\\_Strategies\\_For\\_Culturing\\_Rumen\\_Bacteria\\_Using\\_Metabarcoding](https://www.researchgate.net/publication/353559350_Assessment_of_Alternative_Strategies_For_Culturing_Rumen_Bacteria_Using_Metabarcoding))



- Seminario Científico Interno de AGROSAVIA.

- A la fecha de elaboración de este documento, se encuentra en elaboración el paper: Botero, L. M., Acosta, A., Caro-Quintero, A. (2022). *Behind the conventional culture: A metataxonomic strategy improves the isolation of ruminal bacteria. "In preparation"*.

## Material Suplementario

### S1. Composición de los medios de cultivo anaerobios utilizados

#### 1. Medio CAN (Atlas, 2010)

Compuesto	Cantidad por L
Caseína pancreática	17 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
Soytone	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - fosfato dipotásico	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Solución Vitamina K	1 mL
Hemina	0,5 mL
Cisteína	5 mL
Solución resazurin	1 mL
Agar	20 g

#### *Preparación Solución Vitamina K*

Disolver 1g de vitamina K en 99 mL de etanol absoluto, mezclar y esterilizar mediante filtración por membrana de 0.22 µm. Almacenar en frasco ámbar.

Compuesto	Cantidad por 100mL
Vitamina K	1 g
Etanol absoluto	99 mL

#### *Preparación Solución Hemina*

Disolver 1g de Hemina en 20mL de una solución de NaOH(1N). Mezclar aforar a volumen de 100mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave 15min, 15 psi a 121 °C.

Compuesto	Cantidad por 20mL
Hemina	1 g
NaOH (1N)	20 mL

#### *Preparación Solución de Cisteína*

Disolver 0,4g de L-cisteína en la solución de NaOH. Mezclar.

Compuesto	Cantidad por 5mL
L-Cisteína	0,4 g
NaOH (1N)	5 mL

#### *Preparación Solución Resazurin.*

Disolver 0,1g de resazurin en 100mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Compuesto	Cantidad por 100mL
Resazurin	0,1g
H <sub>2</sub> O	100 ml

## 2. Medio ER (Atlas, 2010)

Compuesto	Cantidad por L
Glucosa	0,5 g
Maltosa	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Sulfato de amonio	0,5 g
Peptona	0,5 g
Almidon soluble	0,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
Sales	500 mL
Fluido ruminal	300 mL
Resazurin	4 mL
HCl-Cisteína	0,5 g
Agar	15 g

### *Preparación Solución de Sales*

Disolver el CaCl<sub>2</sub> y el MgSO<sub>4</sub> en 300mL de agua destilada. Mezclar hasta disolver y aforar a 800mL de agua y adicionar el resto de los componentes. Aforar a 1L. Mezclar hasta disolver por completo. Almacenar a 4°C.

Compuesto	Cantidad por L
NaHCO <sub>3</sub> -Bicarbonato de sodio	10 g
NaCl -Cloruro de sodio	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Fosfato dipotasio	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato monobasico	1 g
CaCl <sub>2</sub> -Cloruro de Calcio	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> – Sulfato de Magnesio	0,2 g

### *Preparación Fluido ruminal*

Posterior a la toma de fluido ruminal, este debe ser filtrado dos veces por gasa, paso seguido se debe dejar sedimentando a -20°C y finalmente utilizar solo el sobrenadante libre de material particulado.

### *Preparación Solución Resazurin.*

Disolver 0,011g de resazurin en 44mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Compuesto	Cantidad por 44mL
Resazurin	0,011 g
H <sub>2</sub> O	44 ml

## 3. Medio Glucosa/Celobiosa (Rodríguez et al., 2011)

Compuesto	Cantidad por L
Glucosa	5g
Celobiosa	5g*
Extracto de levadura	2,5g
Sal I	150mL
Sal II	150mL
AGVs	0,4mL
NaHCO <sub>3</sub>	6g
Fluido ruminal	400mL
Resazurin	1mL
HCl-Cisteína	1g
Agar	13g

\*En el caso del medio Celobiosa la glucosa no será añadida, en su reemplazo se debe agregar 10 g - L de Celobiosa. Los componentes restantes permanecen igual.

#### *Preparación de sales*

Disolver cada una de las sales (Sal I y II) en el volumen requerido y mezclar en plancha de agitación. Almacenar a 4°C en botella ambar.

Compuesto	Cantidad por L
SAL I	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Fosfato dipotasico	3g
SAL II	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato monopotasico	3g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Sulfato de amonio	6g
NaCl- Cloruro de sodio	6g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O – Sulfato de Magnesio	1,23g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O -Cloruro de Calcio	0,79g

#### *Preparación Solución de AGVs*

En un frasco ambar adicionar cada uno de los AGVs y mezclar. Almacenar a 4°C

Compuesto	Cantidad por L
Ácido acético	17mL
Acido butírico	4mL
Ácido propiónico	6mL
Acido iso-butírico	1mL
Ácido 2metil-butírico	1mL
Ácido n-valerico	1mL
Ácido isovalerico	1mL

#### *Preparación Fluido ruminal*

Posterior a la toma de fluido ruminal, este debe ser filtrado dos veces por gasa, paso seguido se debe dejar sedimentando a -20°C y finalmente utilizar solo el sobrenadante libre de material particulado.

#### *Preparación Solución Resazurin.*

Disolver 0,1g de resazurin en 100mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Compuesto	Cantidad por 100mL
Resazurin	0,1g
H <sub>2</sub> O	100mL

#### **4. Medio Goodman** (Goodman et al., 2011)

Compuesto	Cantidad por L
Glucosa	0,4g
Celobiosa	1g
Maltosa	1g
Fructosa	1g
Peptona de caseina	2g
Extracto de levadura	1g
Extracto de carne	5g
Solución KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato monopotasico	100mL

MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O – Sulfato de Magnesio	20mg
NaHCO <sub>3</sub> -Bicarbonato de sodio	400mg
NaCl <sub>2</sub> -Cloruro de sodio	80mg
Solución CaCl <sub>2</sub>	1mL
Solución Vitamina K	1mL
Solución FeSO <sub>4</sub>	1mL
Solución Histidina/Hematina	1mL
Tween 80	2mL
Solución de Vitaminas	10mL
Solución de Minerales	10mL
Solución de AGVs	5,8mL
Resazurin	4mL
HCl-Cisteína	1g
Agar	12g

*Preparación solución KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*

Realizar una solución stock 1M con pH 7.2, se debe ajustar con escamas de NaOH. Almacenar a 4°C

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por 100mL</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

*Preparación Solución CaCl<sub>2</sub>*

Realizar una solución stock de cloruro de calcio. Almacenar a 4°C.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por 100mL</b>
CaCl <sub>2</sub>	800 mg
H <sub>2</sub> O	100 mL

*Preparación Solución Vitamina K*

Disolver 10mg en 10mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y esterilizar por filtro de 0.22uM. Almacenar a 4°C.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por 10mL</b>
Vitamina K	10 mg
H <sub>2</sub> O	10 mL

*Preparación Solución FeSO<sub>4</sub>*

Disolver 8 mg de sulfato de hierro en 20mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar a 4°C.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por 20mL</b>
FeSO <sub>4</sub>	8 mg
H <sub>2</sub> O destilada	20 mL

*Preparación Solución Histidina*

Disolver la hematina en solución de histidina 0.2M. Mezclar y esterilizar por filtro de 0.22uM. Almacenar a 4°C.

Compuesto	Cantidad por 15mL
Hematina	18 mg
Histidina 0.2M	15 mL

#### *Preparación Solución Tween 80*

Preparar una solución de Tween 80 al 25%. Mezclar y almacenar a 4°C.

Compuesto	Cantidad por 10mL
Tween 80	2,5 mL
H2O destilada	10 mL

#### *Preparación Solución Vitaminas*

Disolver todos los componentes en el volumen indicado; mezclar y esterilizar por filtro de 0,22uM. Almacenar en frasco ámbar a 4°C

Compuesto	Cantidad por 1 L
Ácido Fólico	0,002 g
Piridoxina Hidrocloruro	0,01 g
Riboflavina	0,005 g
Biotina	0,002 g
Tiamina	0,005 g
Ácido Nicotínico	0,005 g
Pantotenato de calcio	0,005 g
Vitamina B12	0,1 mg
Acido P-aminobenzoico	0,005 g
Fosfato monopotasio	0,9 g

#### *Preparación Solución Minerales*

Disolver todos los componentes en el volumen indicado; mezclar y esterilizar por filtro de 0,22uM. Almacenar en frasco ámbar a 4°C

Compuesto	Cantidad 1 L
EDTA	0,5 g
MgSO4*7H2O – Sulfato de Magnesio heptahidratado	3 g
MnSO4*H2O – Sulfato de Manganeso	0,5 g
NaCl – Cloruro de Sodio	1 g
FeSO4*7H2O – Sulfato de Hierro heptahidratado	0,1 g
Co (NO3)2 *6H2O – Nitrato de Cobalto hexahidratado	0,1 g
CaCl2 -Cloruro de Calcio	0,1 g
ZnSO4*7H2O – Sulfato de Zinc heptahidratado	0,1 g
CuSO4*5H2O – Sulfato de Cobre pentahidratado	0,01 g
H3BO3- Ácido Bórico	0,01 g
Na2MoO4*2H2O – Molibdato de Sodio dihidratado	0,01 g
Na2SeO3 -Selenito de sodio	0,001g
Na2WO4*2H2O – Tungstato de Sodio dihidratado	0,01 g
NiCl2*6H2O – Cloruro de Niquel Hexahidratado	0,02 g

### Preparación AGVs

En un frasco ambar adicionar cada uno de los AGVs y mezclar. Almacenar a 4°C

Compuesto	Cantidad por 50mL
Ácido Acético	14,65 mL
Ácido Isovalerico	0,86 mL
Ácido Propiónico	17,24 mL
Ácido Butirico	17,24 mL

### Preparación solución Resazurin

Disolver 0,025g de resazurin en 10mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar, almacenar en frasco ámbar a 4°C.

Compuesto	Cantidad por 100 mL
Resazurin	0,025 g
H <sub>2</sub> O	10 mL

## 5. Medio Kenters (Kenters, Henderson, Jeyanathan, Kittelmann, & Janssen, 2011)

Compuesto	Cantidad por L
Solución Sales Minerales	950 mL
Solución Selenito/Tungstato	1 mL
Fluido Ruminal Enriquecido**	5% (v/v)
Solución 10	1 mL
HCl- Cisteína	0,5 g
NaHCO <sub>3</sub>	4,2 g
Resazurin	0,4 mL

### Preparación Solución de Sales Minerales

Compuesto	Cantidad por 950 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato dipotásico	1,4 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – Sulfato de Amonio	0,6 g
KCl- Cloruro de Potasio	1,5 g

### Preparación Solución Selenito/Tungstato

Compuesto	Cantidad por 1 L
NaOH – Hidroxido de Sodio	0,5 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> *5H <sub>2</sub> O -Selenito de Sodio pentahidratado	0,003 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O - Tungstato de Sodio dihidratado	0,004 g

### Preparación Fluido Ruminal Enriquecido \*\*

**Antes de empezar:** Posterior a la toma de fluido ruminal, este debe ser filtrado dos veces por gasa, paso seguido se debe dejar sedimentando a -20°C y finalmente utilizar solo el sobrenadante libre de material particulado. Centrifugar por 20 minutos a 12.000g; gasificar el sobrenadante por 100min y esterilizar por 15min, 15psi a 121°C. El fluido debe permanecer en condiciones anóxicas. Posteriormente adicionar 1,63g de MgCl<sub>2</sub> \*6H<sub>2</sub>O y 1,18g de CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O por cada 100mL. Centrifugar a 30.000g, 4°C por 60 min, para eliminar el precipitado. **El sobrenadante es el Fluido Ruminal clarificado.** Finalmente adicionar los siguientes componentes.



Compuesto	Cantidad por 100 mL Fluido
Glucosa	0,34 g
Celobiosa	0,34 g
Xilosa	0,30 g
Arabinosa	0,30 g
Lactato de Sodio	0,30 g
Casaminoacidos	2 g
BactoPeptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
Vitaminas 10	2 mL

*Preparación Solución Vitaminas 10*

Compuesto	Cantidad 1L
Ácido Fólico	0,01 g
Piridoxina Hidrocloruro	0,15 g
Riboflavina	0,03 g
Biotina	0,01 g
Tiamina	0,1 g
Ácido Nicotínico	0,1 g
Pantotenato de calcio	0,05 g
Vitamina B12	0,05 g
Acido P-aminobenzoico	0,04 g

*\*\*Nota: El fluido ruminal enriquecido debe ser esterilizado por filtro de 0,22µM*

*Preparación Solución 10*

Compuesto	Cantidad por 1L
H3BO3	0,006 mg
CuCl2	0,002 mg

*Preparación Solución Resazurin*

Compuesto	Cantidad por 100L
Resazurin	0,1 g
H2O	100 mL

**6. Medio Kikuyo (CMINA)**

Compuesto	Cantidad por L
Sal I	150 mL
Sal II	150 mL
AGVs	0,4 mL
NaHCO3	6 g
Zumo de Kikuyo	400 mL
Resazurin	1 mL
HCl-Cisteína	1 g
Agar	13 g

### Preparación de sales

Disolver cada una de las sales (Sal I y II) en el volumen requerido y mezclar en plancha de agitación. Almacenar a 4°C en botella ámbar.

Compuesto	Cantidad por L
SAL I	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Fosfato dipotásico	3 g
SAL II	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato monopotásico	3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Sulfato de amonio	6 g
NaCl- Cloruro de sodio	6 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O – Sulfato de Magnesio	1,23 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O -Cloruro de Calcio	0,79 g

### Preparación Solución de AGVs

En un frasco ámbar adicionar cada uno de los AGVs y mezclar. Almacenar a 4°C

Compuesto	Cantidad por L
Ácido acético	17 mL
Acido butírico	4 mL
Ácido propionico	6 mL
Ácido 2metil-butirico	1 mL
Acido iso-butírico	1 mL
Ácido n-valerico	1 mL
Ácido isovalerico	1 mL

### Preparación Zumo de Kikuyo

Colectar forraje kikuyo y licuar, el zumo obtenido debe ser filtrado por gasa. Guardar el zumo a -20°C.

### Preparación Solución Resazurin.

Disolver 0,1g de resazurin en 100mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar

Volumen para 100mL	
Resazurin	0,1 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

## 7. Medio Nyonyo (Nyonyo, Shinkai, & Mitsumori, 2014)

Compuesto	Cantidad por L
Celobiosa	0,5 g
Azo-CMC	2 g
NaCl	0,9 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,9 g
MnCl <sub>2</sub>	0,16 g
MgCl <sub>2</sub>	1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,066 g
MgSO <sub>4</sub>	0,1 g
FeSO <sub>4</sub>	0,02 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,02 g
CoCl <sub>2</sub>	0,002 g

Casaminoácidos	2 g
Hemina	0,0005 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4 g
Fluido Ruminant	400 mL
AGVs	66,7 mL
Solución de Vitaminas	10 mL
HCl-Cisteína	0,5 g
Resazurin	1 mL

#### *Preparación de Solución de Vitaminas*

Disolver cada uno de los componentes en el volumen requerido y mezclar en plancha de agitación. Almacenar a 4°C en botella ámbar.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por L</b>
Piridoxina Hidrocloruro	0,2 g
Riboflavina	0,2 g
Tiamina hidrocloruro	0,2 g
Nicotinamida	0,2 g
Acido pantoténico	0,2 g
Acido amino benzoico	0,01 g
Acido Fólico	0,005 g
Biotina	0,005 g
Vitamina B12	0,005 g

#### *Preparación Solución de AGVs*

En un frasco ámbar adicionar cada uno de los AGVs y mezclar. Almacenar a 4°C

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por L</b>
Ácido acético	20 mL
Acido iso-butírico	1 mL
Ácido iso-valerico	1,2 mL
Ácido n-valerico	1,2 mL
Acido 2-metilbutírico	1,2 mL

#### *Preparación Solución Resazurin.*

Disolver 0,1g de resazurin en 100mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar

<b>Volumen para 100mL</b>	
Resazurin	0,1 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

### **8. Medio Trébol (CMINA)**

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por L</b>
Sal I	150 mL
Sal II	150 mL
AGVs	0,4 mL
NaHCO <sub>3</sub>	6 g
Zumo de Trébol	400 mL
Resazurin	1 mL
HCl-Cisteína	1 g
Agar	13 g

### Preparación de Sales

Disolver cada una de las sales (Sal I y II) en el volumen requerido y mezclar en plancha de agitación. Almacenar a 4°C en botella ambar.

	Compuesto	Cantidad por L
SAL I	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Fosfato dipotásico	3 g
SAL II	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato monopotásico	3 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Sulfato de amonio	6 g
	NaCl- Cloruro de sodio	6 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O – Sulfato de Magnesio	1,23g
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O -Cloruro de Calcio	0,79g

### Preparación Solución de AGVs

En un frasco ambar adicionar cada uno de los AGVs y mezclar. Almacenar a 4°C

Compuesto	Cantidad por L
Ácido acético	17 mL
Acido butírico	4 mL
Ácido propionico	6 mL
Ácido 2metil-butirico	1 mL
Acido iso-butírico	1 mL
Ácido n-valerico	1 mL
Ácido isovalerico	1 mL

### Preparación Zumo de Trébol

Colectar forraje trébol rojo y licuar, el zumo obtenido debe ser filtrado por gasa. Guardar el zumo a -20°C.

### Preparación Solución Resazurin.

Disolver 0,1g de resazurin en 100mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar.

Compuesto	Volumen para 100mL
Resazurin	0,1g
H <sub>2</sub> O	100mL

### Medio Dilución (Rodríguez et al., 2011)

Compuesto	Cantidad por L
Sal I	150 mL
Sal II	150 mL
NaHCO <sub>3</sub>	6 g
Resazurin	1 mL
HCl-Cisteína	1 g

### Preparación de sales

Disolver cada una de las sales (Sal I y II) en el volumen requerido y mezclar en plancha de agitación. Almacenar a 4°C en botella ambar.

	Compuesto	Cantidad por L
SAL I		
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Fosfato dipotásico	3 g
SAL II		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato monopotásico	3 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Sulfato de amonio	6 g
	NaCl- Cloruro de sodio	6 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O – Sulfato de Magnesio	1,23g
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O -Cloruro de Calcio	0,79g

### *Preparación Solución Resazurin.*

Disolver 0,1g de resazurin en 100mL de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar y almacenar en frasco ámbar.

Compuesto	Volumen para 100mL
Resazurin	0,1g
H <sub>2</sub> O	100mL

## **S2. Protocolo de extracción de ADN**

1. Centrifugar el contenido de un cultivo completamente crecido a 10000 x g por 10 min y descartar el sobrenadante
2. Resuspender el pellet en 1 mL de EDTA salino (500mL: 15 mL NaCl 5M, 200mL EDTA 0.25M ph 8.0 (Para 1 L: Disolver 93.05 g EDTA, ajustar pH con pelleta de NaOH)), adicionar 3.3 uL de lizosima (300 mg/mL), 10 uL de proteinasa K (10 mg/mL), 10 uL de RNAsa A (20 mg/mL), mezclar por vortex.
3. Incubar por por 45 min a 37 °C hasta que la muestra presente una apariencia viscosa.
4. Adicionar 80 uL de SDS 20 % y mezclar por vortex.
5. Incubar por 10 min a 65 °C.
6. Adicionar 250 uL de NaCl 5M y mezclar por inversión.
7. Dividir la muestra en dos, distribuyendo el volumen en partes iguales (~ 671 uL por tubo).
8. Adicionar un volumen (671 uL) de fenol: cloroformo:isoamil-alcohol (25:24:1), mezclar por inversión varias veces.
9. Centrifugar por 6 min a 10000 x g y recuperar el sobrenadante evitando tomar la fase de fenol-cloroformo.
10. Repetir y lavar con cloroformo: isoamil-alcohol (24:1) los pasos 8 y 9.
11. Si
  - a. El volumen del sobrenadante recuperado es 550 uL o menos, unir los dos sobrenadantes por muestra en un tubo de 2 mL y precipitar el ADN adicionando: 1/9

del volumen de Acetato de Sodio 3M (pH: 7) y 0.6 del volumen de isopropanol.

b. El volumen es mayor que 550 uL, precipitar el ADN según lo descrito anteriormente, pero de forma separada.

12. Mezclar e incubar por 20 min a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

13. Centrifugar por 30 min a  $10000\times g$  y descartar el sobrenadante. Lavar con 500 uL de etanol al 70 % y mezclar de manera suave por inversión. Centrifugar por 10 min a  $10000\times g$ , retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet.

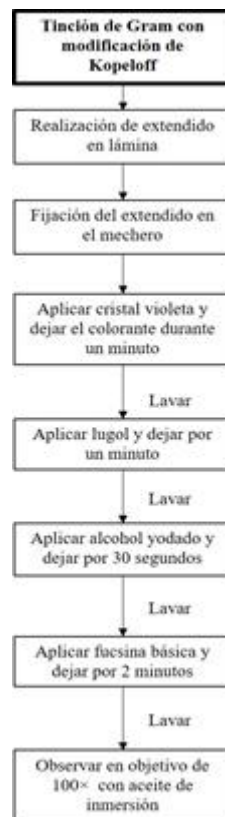
14. Resuspender el ADN en agua ultrapura estéril ( $\sim 100\text{ uL}$ )

15. Almacenar el ADN a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**S3.** Tabla S3.1. Configuración de 48 tratamientos para cada réplica biológica.

Medio	Dilución	Tiempo
<b>CAN</b>	-2	3
		7
	-6	3
		7
	-12	3
<b>ER</b>		7
	-2	3
		7
	-6	3
		7
<b>GC</b>	-12	3
		7
	-2	3
		7
	-6	3
<b>GOOD</b>		7
	-12	3
		7
	-2	3
		7
<b>KNT</b>	-6	3
		7
	-12	3
		7
	-2	3
<b>KYO</b>		7
	-6	3
		7
	-12	3
		7
<b>NYO</b>	-2	3
		7
	-6	3
		7
	-12	3
<b>TRB</b>		7
	-2	3
		7
	-6	3

#### S4. Tinción de Gram modificada Kopeloff



**Figura S4.1 Tinción de Gram modificada para bacterias anaerobias.**

#### S5. Tabla S5.1: Concentraciones de ADN y ratios de calidad obtenidos para cada aislado.

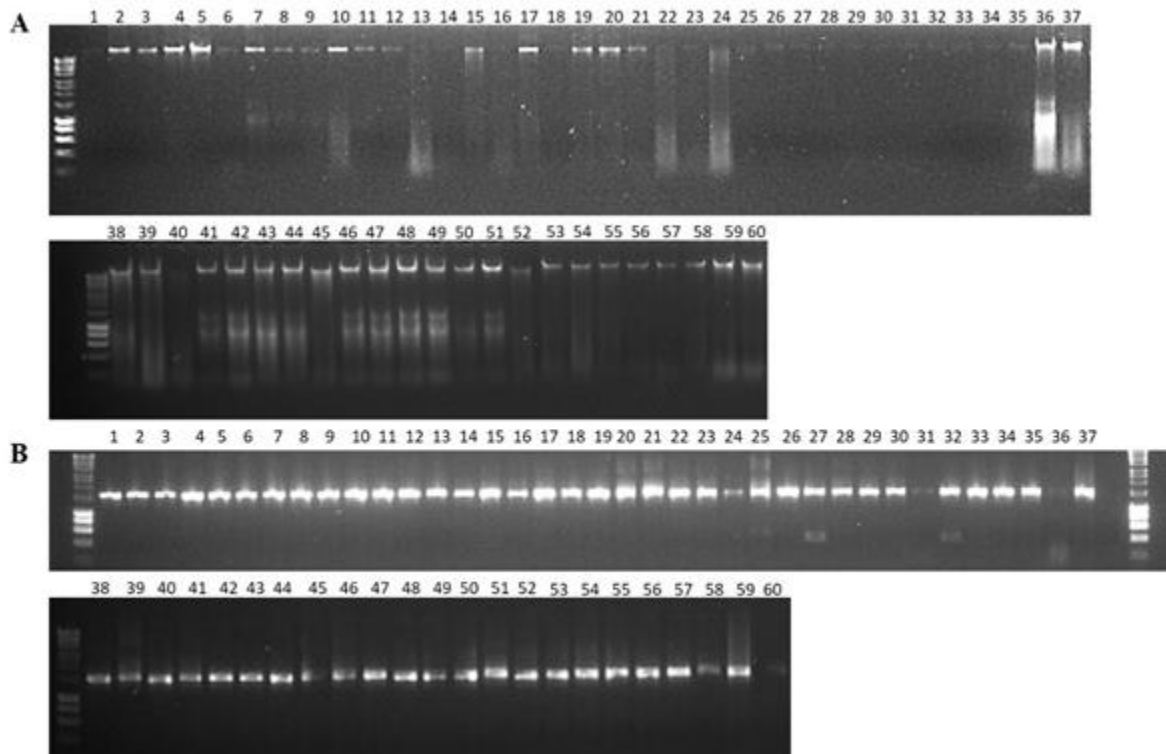
Identificador	[]	260/280	260/230	Identificador	[]	260/280	260/230
C 7D#16-11(1)	29,9	2,2	1,5	C10#4-2	10,4	2,1	1,7
C 7D#7-11(2)	58,1	2,7	1,4	K 7D #15-3(1)	35,3	1,8	1,2
C 7D#7-11(1)	14,1	1,2	1,5	C10#1	46,0	2,4	1,6
C 7D#19-9(1)	10,0	2,0	2,1	C 10#5	13,6	1,2	1,3

<b>C 7D#16-11(2)</b>	29,0	2,4	1,1	<b>C 3D#19-11</b>	442,7	2,1	2,3
<b>K 7D #5</b>	402,1	2,0	2,1	<b>K 3D#16-4(3)</b>	91,6	2,0	1,9
<b>K 7D #6</b>	89,5	2,0	2,0	<b>K 7D#13-5(2)</b>	98,3	2,0	1,8
<b>K 3D#8-3(2)</b>	105,8	2,4	2,5	<b>K 7D#6-4(1)</b>	154,4	2,0	1,8
<b>K 3D#6-5(3)</b>	4,3	1,9	2,0	<b>C 10#1-2</b>	17,0	1,9	2,0
<b>K 3D#3(1)</b>	12,2	2,0	1,9	<b>K 7D#15-5(1)</b>	7,8	2,0	5,0
<b>K 3D#11-4(2)</b>	10,0	2,0	2,0	<b>K 7D#(O)- 10(1)</b>	49,1	1,7	1,0
<b>C 7D#16-10(1)</b>	5,9	1,9	2,1	<b>K 3D#16-8(2)</b>	7,2	2,6	23,9
<b>C 7D#7-11(3)</b>	24,6	2,8	1,7	<b>K 7D#"A1"- 11(1)</b>	199,1	2,1	1,5
<b>K 3D#6-5(2)</b>	31,0	2,9	1,8	<b>K 7D#"U"- 8(2)</b>	19,5	1,5	0,8
<b>C 7D#15-12(1)</b>	47,9	2,4	19,9	<b>C 3D#10-12 (4.1)</b>	27,2	1,9	1,6
<b>C 7D#16-11(3)</b>	95,9	1,4	0,4	<b>K 3D#16-8(3)</b>	13,4	2,1	1,3
<b>C 7D#19-9(2)</b>	13,0	1,6	1,0	<b>K 7D#"P"- 10(11)</b>	419,9	2,1	1,9
<b>C 7D #15-12(3)</b>	41,0	2,8	1,5	<b>K K-17(3)</b>	509,0	2,1	2,1
<b>C 7D #15-17(2)</b>	47,1	2,4	3,8	<b>C 3D #13- 12(1)</b>	162,9	2,0	2,2
<b>K 3D#11-4(1)</b>	15,3	2,0	1,7	<b>K 7D#K16-6</b>	474,6	2,1	1,8
<b>K 7D #11-5(3)</b>	20,0	2,1	1,2	<b>K 7D#K16-1</b>	392,3	2,1	2,0
<b>K 3D#3-2(1)</b>	13,0	2,1	2,1	<b>K 7D#K16-4</b>	573,3	2,1	2,2
<b>K 7D#13-5(1)</b>	84,7	2,5	2,3	<b>K 7D#"R"</b>	445,6	2,1	1,6
<b>K 7D#7-4(2)</b>	24,2	3,7	1,2	<b>K 7D#K16-5</b>	138,8	2,1	1,6



K 7D#11-5(2)	19,0	2,3	1,1	K 7D#"P"	168,8	2,0	1,5
K 7D#6(2)-7(1)	139,6	2,3	1,4	Xyl K#2	26,0	3,0	0,9
K 3D #16-4(3)	813,7	2,1	1,7	Xyl K1#3	57,3	2,3	2,6
K 3D #15	277,5	2,0	2,0	Xyl K #1	55,5	2,1	0,9
C10#4	6,3	2,3	1,3	C#2-9	5,0	1,0	3,0
C2#2	51,7	1,8	1,4	Xy K1#1	41,2	2,5	2,4

**S6. Figura S6.1.** Electroforesis de agarosa al 1.5%. **A:** Visualización de la integridad de los ADNs obtenidos. **B:** Resultado de la amplificación del gen 16s rRNA para los aislados, los cuales presentaron una amplificación de banda a la altura de 1000 pb.



**S7. Tabla S7.1: Identificación Molecular de los aislados, con las bases de secuencias RPD y NCBI.**

Aislado	Identificador*	%id	Genus RDP	sp	%id	Genus NCBI	sp
1	C 7D#16-11(1)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri/pasteuri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
2	C 7D#7-11(2)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri/pasteuri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
3	C 7D#7-11(1)	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>
4	C 7D#19-9(1)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
5	C 7D#16-11(2)	98	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	99	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>
6	K 7D #5	70	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	-	94	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	-
7	K 7D #6	71	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	<i>ruminis</i>	94	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	-
8	K 3D#8-3(2)	99	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus/lutetiensis</i>
9	K 3D#6-5(3)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus/lutetiensis</i>
10	K 3D#3(1)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus/lutetiensis</i>
11	K 3D#11-4(2)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus/lutetiensis</i>
12	C 7D#16-10(1)	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>
13	C 7D#7-11(3)	99	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	100	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>
14	K 3D#6-5(2)	97	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	99	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>
15	C 7D#15-12(1)	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
16	C 7D#16-11(3)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>

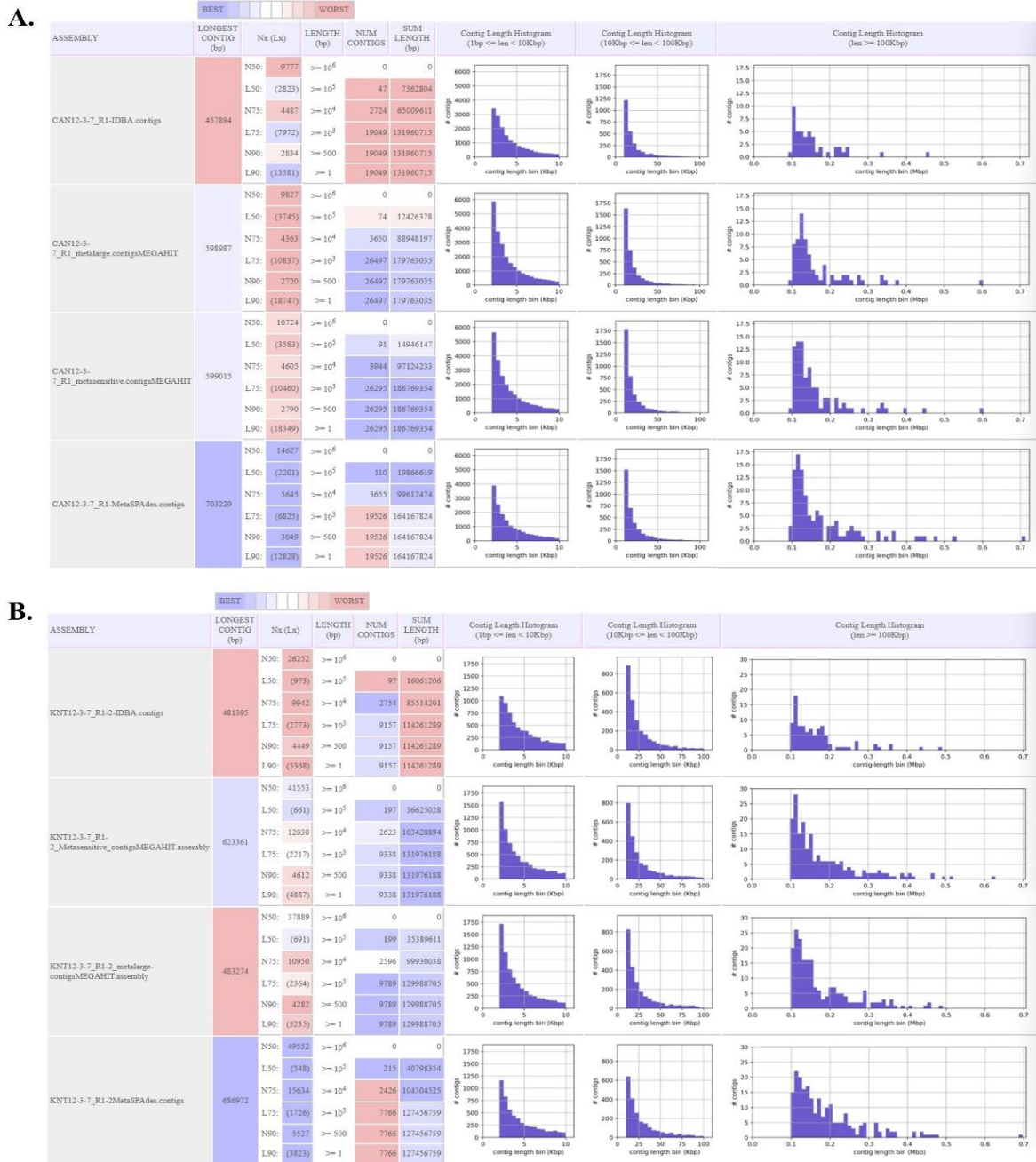
17	C 7D#19-9(2)	93	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
18	C 7D #15-12(3)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
19	C 7D #15-17(2)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>
20	K 3D#11-4(1)		<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i>		<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i>
21	K 7D #11-5(3)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri/pasteuri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
22	K 3D#3-2(1)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus/ lutetiensis</i>
23	K 7D#13-5(1)	99	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	99	<i>Streptococcus</i>	<i>lutetiensis/ equinus</i>
24	K 7D#7-4(2)	99	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	99	<i>Streptococcus</i>	<i>lutetiensis/ equinus</i>
25	K 7D#11-5(2)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri/pasteuri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
26	K 7D#6(2)-7(1)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>lutetiensis/ equinus</i>
27	K 3D #16-4(3i)	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
28	K 3D #15	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
29	C10#4	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
30	C2#2	77	<i>Streptococcus</i>	<i>ratti</i>	99	<i>Streptococcus</i>	<i>orisasini</i>
31	C10#4-2	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
32	K 7D #15-3(1)	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>
33	C10#1	99	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>mucosae</i>	100	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>mucosae</i>
34	C 10#5	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri/pasteuri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri/warneri</i>
35	C 3D#19-11	45	<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i>	88	<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i>

36	K 3D#16-4(3)	89	<i>Oribacterium</i>	-	98	<i>Oribacterium</i>	-
37	K 7D#13-5(2)	97	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	99	<i>Streptococcus</i>	<i>lutetiensis/ equinus</i>
38	K 7D#6-4(1)	100	<i>Streptococcus</i>	<i>equinus</i>	100	<i>Streptococcus</i>	<i>lutetiensis/ equinus</i>
39	C 10#1-2	99	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>mucosae</i>	100	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>mucosae</i>
40	K 7D#15-5(1)	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>
41	K 7D#(O)-10(1)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri/pasteuri</i>	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>
42	K 3D#16-8(2)	89	<i>Oribacterium</i>	-	98	<i>Oribacterium</i>	-
43	K 7D#"A1"-11(1)	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
44	K 7D#"U"-8(2)	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>	-	<i>baja calidad</i>	<i>baja calidad</i>
45	C 3D#10-12 (4.1)	100	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>	99	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>
46	K 3D#16-8(3)	98	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
47	K 7D#"P"-10(11)	98	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
48	K K-17(3)	98	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
49	C 3D #13-12(1)	96	<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i>	99	<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i>
50	K 7D#K16-6	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
51	K 7D#K16-1	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
52	K 7D#K16-4	98	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
53	K 7D#"R"	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>
54	K 7D#K16-5	99	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvens</i>

55	K 7D#"P"	98	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvans</i>	100	<i>Succinivibrio</i>	<i>dextrinosolvans</i>
56	Xyl K#2	96	<i>Actinomyces</i>	<i>ruminicola</i>	98	<i>Actinomyces</i>	<i>ruminicola</i>
57	Xyl K1#3	95	<i>Butyrivibrio</i>	<i>fibrisolvens</i>	100	<i>Butyrivibrio</i>	<i>fibrisolvens</i>
		92	<i>Butyrivibrio</i>	<i>hungatei</i>	99	<i>Butyrivibrio</i>	<i>hungatei</i>
58	Xyl K #1	94	<i>Actinomyces</i>	<i>ruminicola</i>	98	<i>Actinomyces</i>	<i>ruminicola</i>
59	C#2-9	-	-	-	77	<i>Streptococcus</i>	<i>orisasini</i>
60	Xy K1#1	95	<i>Butyrivibrio</i>	<i>fibrisolvens</i>	100	<i>Butyrivibrio</i>	<i>fibrisolvens</i>
		92	<i>Butyrivibrio</i>	<i>hungatei</i>	99	<i>Butyrivibrio</i>	<i>hungatei</i>

\*La letra C corresponde a los aislados recuperados del medio CAN, la letra K corresponde a los aislados recuperados del medio KNT. En 3 días (3D) o 7 días (7D).

**S8. Figura S8.1. Datos estadísticos del ensamblaje para CAN 12-3-7R1 y KNT 12-3-7R1-2, en los ensambladores IDBA, MEGAHIT y MetaSPades. La coloración de azul a rojo muestra los mejores y peores valores de cada ensamblaje**



**S9. Figura S9.1: Árbol filogenético de los bins de CAN 12-3-7R1. Clado A: Bin.052, Clado B: Bin.083, Clado C: Bin.084, Bin.067, Clado D: Bin.026, Bin.038, Bin.082, Clado E: Bin.044, Bin.043, Clado F: Bin.042, Clado G: Bin.034, Clado H: Bin.072, Clado I: Bin.066, Bin.028, Clado J: Bin.063, Clado K: Bin.057, Clado L: Bin.002, Bin.058, Bin.080.**

