



PRODUCCIÓN DE BIOGÁS Y CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS *in vitro* DE CONSORCIOS BACTERIANOS CELULOLÍTICOS RUMINALES OBTENIDOS DE DIFERENTES FIBRAS †

[BIOGAS PRODUCTION AND FERMENTATION CHARACTERISTICS *in vitro* OF CELLULOLYTIC RUMINAL BACTERIAL CONSORTIUMS OBTAINED FROM DIFFERENT FIBERS]

**David Hernández-Sánchez², Jerónimo Herrera-Pérez¹,
Serafín Jacobo López Garrido³, Nicolás Torres Salado¹,
and Paulino Sánchez-Santillán^{1*}**

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero. Km 197 Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, Cuajinicuilapa, Guerrero, México. C.P. 41940. E-mails: mvzjero@hotmail.com, nivigas@yahoo.com.mx, sanchezsantillanp@gmail.com

²Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillos, Edo. de México, México. C.P. 56230. E-mail: sanchezd@colpos.mx

³Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Carretera Vía Sola de Vega, San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca, México. C.P. 71980. E-mail: serafin@zicatela.umar.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Cellulolytic bacterial consortia (CBC) serve as additives to improve fiber degradation in ruminants, since they improve biogas production and *in vitro* fermentation characteristics. **Objective.** To evaluate the biogas production and fermentative characteristics *in vitro* of mulatto grass inoculated with ruminal CBC obtained from ground sawdust, ground mulatto grass or whole stem as substrates in the selective culture medium. **Methodology.** The CBC were obtained from ruminal fluid from a Suiz-Bu cow fitted with a ruminal cannula, which was transferred six times in a selective anaerobic medium. The test consisted of preparing sterile biodigesters with 0.5 g of mulatto grass with 63 d of regrowth, 45 mL of culture medium. The inoculation was with 5 mL of a type of CBC. The biodigesters were incubated 72 h at 39 °C. Biogas production was measured at 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h. In the culture media, ammonia nitrogen (N-NH₃), total bacterial count, cellulase activity, pH, dry matter degradation (DMD) and neutral detergent fiber degradation (NDFD) were determined at 12, 24, 48 y 72 h. In the biogas production a completely random design was used; while in the rest of the variables a completely randomized design was carried out with a 3x4 factorial arrangement, with fiber source and incubation time as factors. **Results.** The biogas production of the CBC obtained from the ground grass showed higher (p<0.05) accumulated production in all the evaluated times. The CBC obtained from sawdust increased the biogas production by 175% from 24 to 48 h and by 313% from 48 to 72 h. There was an interaction effect (p <0.05) on DMD, NDFD, N-NH₃, total bacterial count and cellulase enzymatic activity. The CBC obtained from ground mulatto grass at 72 h increased (p <0.05) the DMD and NDFD. The CBC obtained from sawdust increased DMD by 19.1% and NDFD by 33% from 48 to 72 h. The concentration of bacteria in the observed interactions is within the range of the ruminal ecosystem. The highest (p<0.05) content of N-NH₃ was determined when the CBC obtained from grass stem with 12, 24 and 72 h of incubation were used. **Implications.** Using the same fiber source to obtain the CBCs improves the degradation of said fiber. **Conclusion.** The size and source of fiber are decisive in the type of bacteria that make up the cellulolytic bacterial consortia of ruminal origin under the conditions of this *in vitro* test.

Key words: mulatto grass, sawdust, *in vitro* degradation; gas production technique.

RESUMEN

Antecedentes. Los consorcios bacterianos celulolíticos (CBC) en condiciones *in vitro* aumentan las características fermentativas y producción de biogás cuando se usan sustratos fibrosos. **Objetivo.** Evaluar la producción de biogás y características fermentativas *in vitro* de pasto mulatto inoculado con CBC ruminales obtenidos de aserrín molido, pasto mulatto molido o tallo entero como sustratos en el medio de cultivo selectivo. **Metodología.** Los CBC se

† Submitted December 3, 2021 – Accepted June 24, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4127>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

obtuvieron de fluido ruminal de una vaca Suiz-Bu provista con cánula ruminal, el cual se transfirió seis veces en medio anaerobio selectivo. La prueba consistió en elaborar biodigestores estériles con 0.5 g de pasto mulato con 63 d de rebrote y 45 mL de medio de cultivo. La inoculación fue con 5 mL de un tipo de CBC. Los biodigestores se incubaron 72 h a 39 °C. La producción de biogás se midió a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h. En los medios de cultivo se determinó nitrógeno amoniacal (N-NH₃), conteo total de bacterias, actividad de celulasas, pH, degradación de MS (DMS) y de la FDN (DFDN) a las 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Para medir la producción de biogás se usó un diseño completamente al azar; mientras en el resto de las variables se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4, con fuente de fibra y tiempo de incubación como factores. **Resultados.** La producción de biogás del CBC obtenido del pasto molido mostró mayor ($p < 0.05$) producción acumulada en todos los horarios evaluados. El CBC obtenido de aserrín incrementó 175% la producción de biogás de 24 a 48 h y de 313% de 48 a 72 h. Hubo efecto de interacción ($p < 0.05$) en la DMS, DFDN, N-NH₃, conteo total de bacterias y la actividad enzimática celulasas. El CBC obtenido de pasto mulato molido a las 72 h aumentó ($p < 0.05$) la DMS y DFDN. El CBC obtenido de aserrín incremento 19.1% la DMS y 33% la DFDN de las 48 a 72 h. La concentración de bacterias en las interacciones observadas está dentro del rango del ecosistema ruminal. El mayor ($p < 0.05$) contenido de N-NH₃ se determinó cuando se usaron los CBC obtenidos de tallo de pasto con 12, 24 y 72 h de incubación. **Implicaciones.** Usar la misma fuente de fibra para obtener los CBC propicia mejorar la degradación de dicha fibra. **Conclusión.** La fuente de fibra es determinante en el tipo de bacterias que integran los consorcios bacterianos celulolíticos de origen ruminal en las condiciones del presente ensayo *in vitro*.

Palabras clave: Pasto mulato; aserrín; *in vitro*; degradaciones; técnica de producción de gas.

INTRODUCCIÓN

En el rumen los alimentos ingeridos son digeridos por un proceso de fermentación que realizan microorganismos que lo habitan (bacterias, protozoarios y hongos) (Burns, 2008; Castillo-González *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2015). Sin embargo, el proceso de fermentación no es totalmente eficaz; existen pérdidas de energía en forma de biogás, compuesto principalmente por dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) (Kingston-Smith *et al.*, 2012; Castillo-González *et al.*, 2014). Los microorganismos presentes en el rumen son 10⁹⁻¹¹ bacterias, 10²⁻³ protozoarios flagelados, 10⁴⁻⁶ protozoarios ciliados, 10³⁻⁵ hongos, 10⁵⁻⁸ arqueas y 10⁹⁻¹⁰ bacteriófagos por mL (Kumar *et al.*, 2015; Nagaraja, 2016). La actividad microbiana ruminal está modulada por factores como la temperatura (39-39.5° C), pH (5.5 - 7.0), capacidad amortiguadora, presión osmótica (250 - 350 mOsm kg⁻¹) y potencial redox (-250 a -450 mV) (Yokoyama y Johnson, 1988; Lodemann y Martens 2006; Aschenbach *et al.*, 2011; Wahrmund *et al.*, 2012). La secuenciación de ADN muestra que hay 13 filos bacterianos en el rumen, que incluyen 40 órdenes, alrededor de 80 clases, 180 familias bacterianas, 320 géneros y más de 2000 especies (Russell, 2002; Petri *et al.*, 2012; Castillo-González *et al.*, 2014; Castillo-López y Domínguez-Ordóñez, 2019).

Los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacterias* y *Fibrobacteres* representan 95% de las bacterias ruminales; mientras los géneros *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Succiniclaticum*, *Fibrobacter* y *Butyrivibrio* conforman aproximadamente 20% de esta población (Castillo-López *et al.*, 2014; Danielsson *et al.*, 2017; Castillo-López y Domínguez-Ordóñez, 2019). Así mismo, las especies

Ruminococcus albus, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* son de mayor manipulación a nivel de laboratorio (Khejornart *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2017). Así mismo, los microorganismos que degradan polisacáridos de la pared celular de plantas se relacionan taxonómicamente con un número limitado de especies: *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, así como algunos hongos anaerobios y protozoarios (Dai *et al.*, 2015).

Los consorcios son comunidades diversas y complejas de microorganismos que interactúan entre sí y con su entorno; su comunicación es por interacciones directas célula-célula, metabolitos o señales moleculares. Así mismo, realizan procesos fisiológicos interdependientes, utilizan uno o varios sustratos como los carbohidratos estructurales de las plantas (Torres-Salado *et al.*, 2019). Los consorcios bacterianos celulolíticos sirven como aditivos en la alimentación de rumiantes para mejorar la degradación de celulosa y hemicelulosa (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019). Este tipo de consorcios incrementan la producción de gas (Vélez *et al.*, 2017; Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019), CH₄, degradación de materia seca y fibra, cuando se adicionan a bacterias ruminales en condiciones *in vitro* (Herrera-Pérez *et al.*, 2018; Torres-Salado *et al.*, 2019). Según Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta (2016) durante la fermentación *in vitro* se producen varios productos como consecuencia de la interacción que presentan las bacterias en el proceso metabólico.

La fibra son componentes de plantas que no digieren los sistemas enzimáticos de los mamíferos; en otras palabras, es la pared celular de los forrajes. Esta

representa entre 30 y 80% de la materia orgánica (MO). Los forrajes tropicales contienen alto contenido de fibra y su digestibilidad es baja. Sin embargo, los forrajes son importantes en la nutrición de rumiantes porque proveen alrededor de 90% de la energía que consumen los rumiantes. Actualmente, el reto es aumentar la eficiencia de utilización de la fibra en los forrajes (Barahona y Sánchez, 2005). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la producción de biogás y características fermentativas *in vitro* de pasto mulato inoculado con consorcios bacterianos celulolíticos (CBC) ruminales obtenidos de aserrín molido, pasto mulato molido o tallo entero como sustratos en el medio de cultivo selectivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, ubicada en la cabecera municipal de Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

Medio de cultivo

Los componentes del medio fueron 30 mL de fluido ruminal clarificado [líquido ruminal bovino fresco centrifugado 10 min a 12,857 x g y esterilizado (All American® 1941X, USA) 15 min a 121 °C y 15 psi], 5 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich®) en 1000 mL de agua destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck®) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich®) + 2.45 g MgSO₄ (Sigma-Aldrich®) + 1.6 g CaCl₂·2H₂O (Sigma-Aldrich®) en 1000 mL de agua destilada], 0.1 mL de resazurina a 0.1% (Sigma-Aldrich®), 0.2 g de peptona de soya (Merck®), 0.1 g de extracto de levadura (Sigma-Aldrich®), 2 mL de solución cisteína-sulfido [2.5 g L-cisteína (Sigma-Aldrich®) en 15 mL de 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g de Na₂S·9H₂O (Merck®) aforado a 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución a 8% de Na₂CO₃ (Merck®) y 52.6 mL de agua destilada. El medio se esterilizó 15 min en autoclave a 121 °C y 15 psi (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016).

Conorcios bacterianos celulolíticos (CBC).

Las fuentes de fibra que se usaron en el medio de cultivo selectivo para obtener los CBC fueron tallo entero de pasto mulato (*Brachiaria híbrido* CIAT 36087) con 63 d de rebrote, pasto mulato molido [(tamaño de partícula 1 mm con un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA)] con 63 d de rebrote y aserrín de madera molido.

La inoculación y elaboración del medio celulolítico fue en anaerobiosis usando flujo continuo de CO₂.

Nueve mililitros de medio de cultivo estéril se agregaron a tubos de ensaye estériles (18x150 mm; Pirex®, México) que contenían 0.1 g de muestra de la fuente de fibra estéril y se mantuvieron en incubadora (Ecoshel 9082, México) a 39°C por 24 h para verificar esterilidad.

Previo al muestreo, el bovino provisto con una cánula ruminal permaneció en un periodo de adaptación de 60 días en una pradera de pasto pangola (*Digitaria decumbes*) sin recibir suplemento. El animal recibió un manejo con base en los lineamientos de bienestar de la UAGro según la norma NOM-062-ZOO-1999. El fluido ruminal (FR) se manejó según lo descrito por Sánchez-García *et al.* (2019). A cada tubo (triplicado) con medio de cultivo y fuente de fibra se agregó 1 mL de inóculo y se incubó a 39 °C por 7 d; posteriormente, 1 mL de este medio se transfirió a otro tubo con medio y misma fuente de fibra y se incubó a 39 °C por 7 d; este proceso se repitió seis veces para obtener un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) de cada fuente de fibra evaluada. Una vez obtenidos los tres diferentes CBC según la fuente de fibra, se procedió a evaluar con la técnica de producción de gas *in vitro* su capacidad de producción de biogás y degradación de la materia seca de pasto mulato molido con 63 d de rebrote.

Ensayo *in vitro*

En viales serológicos (120 mL) se agregaron 0.5 g de materia seca (MS; método 930.15, AOAC, 2005) de pasto mulato molido con 63 d de rebrote (Tabla 1) y 45 mL de medio de cultivo; este se consideró la unidad experimental del presente estudio. Las condiciones de manejo de los viales fueron según lo descrito por Torres-Salado *et al.* (2019). Los biodigestores se esterizaron a 121 °C, por 15 min y 15 psi, y se incubaron a 39 °C por 24 h para verificar esterilidad. Posteriormente, se inocularon con 5 mL de un tipo de CBC y se incubaron a 39 °C por 72 h en baño María.

La producción de biogás se midió mediante el desplazamiento del émbolo de una jeringa de vidrio (50 mL; BD Yale®, Brasil). El biogás se midió a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h de incubación, empleando cinco repeticiones por inóculo (Hernández-Morales *et al.*, 2018) y se reportó la producción acumulada en los tiempos de medición por origen del CBC (tallo entero de pasto mulato, pasto mulato molido o aserrín molido). Cabe destacar, se usaron 3 biodigestores blanco que se caracterizaron porque no contenían pasto mulato molido como sustrato y se usaron como factor de corrección en la producción de biogás para cada tiempo medido.

Tabla 1. Análisis químico de pasto mulato (*Brachiaria* híbrido CIAT 36087) con 63 días de rebrote.

	Materia seca (g kg ⁻¹)	Materia orgánica (g kg ⁻¹ MS)	Proteína cruda (g kg ⁻¹ MS)	Fibra detergente neutro (g kg ⁻¹ MS)	Fibra detergente ácido (g kg ⁻¹ MS)	Hemice-lulosa (g kg ⁻¹ MS)	Cenizas (g kg ⁻¹ MS)
Pasto mulato	946.1 ± 1.99*	950.5 ± 0.57*	37.9 ± 2.94*	804.3 ± 7.97*	486.4 ± 9.37*	317.9 ± 11.33*	49.5 ± 0.57*

*Desviación estándar

A las 12, 24, 48 y 72 h de incubación [cinco repeticiones por interacción (tiempo de incubación y origen CBC) independientes] se tomó 1 mL del medio contenido en el biodigestor y se mezcló con 0.25 mL de ácido metafosfórico (Meyer®) al 25% (proporción 4:1) para determinar la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) según la metodología descrita por McCullough (1967). También 1 mL del medio se extrajo y se mezcló con 0.25 mL de formaldehído (Sigma-Aldrich®) al 10% para realizar el conteo total de bacterias según lo descrito por Sánchez-Santillán *et al.* (2016). La actividad de celulasas se determinó por la técnica de azúcares reductores de Miller (1959) modificada por Texta *et al.* (2019). El pH del medio se registró con un potenciómetro (Hanna® HI2211, Italia; calibración: pH 7 y 4). En bolsas ANKOM® F57 con peso contante se filtró la muestra residual del biodigestor de cada interacción para estimar la degradación de la materia seca (DMS) y degradación de fibra detergente neutro (DFDN) según lo descrito por Sánchez-Santillán *et al.* (2015) y Hernández-Morales *et al.* (2018).

Análisis estadístico

La producción de biogás acumulado a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h se analizó en un diseño completamente al azar y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). El modelo estadístico fue: $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$; donde Y_{ij} = variable de respuesta, μ = media general, T_i = efecto del i -ésimo tratamiento, ξ = error experimental. Las variables N-NH₃, pH, conteo de bacterias, celulasas, DMS y DFDN se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4. Los factores fueron fuente de fibra para obtener el CBC (tallo entero de pasto mulato, pasto mulato molido y aserrín molido) y tiempo de incubación (12, 24, 48 y 72 h). El modelo estadístico fue: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$; donde Y_{ijk} = Variable de respuesta; μ = Media general; A_i = Efecto del factor fuente de fibra; B_j = Efecto del factor tiempo de incubación; $(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre fuente de fibra y tiempo de incubación; ε_{ijk} = Error experimental. Los datos se analizaron usando el procedimiento GLM (SAS Inc., 2011). Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de biogás del CBC obtenido del pasto molido mostró mayor ($p < 0.05$) producción acumulada en los horarios evaluados; mientras, los CBC obtenidos de aserrín molido tuvieron la menor producción de biogás ($p < 0.05$; Figura 1). La producción de biogás de los CBC originados en pasto molido a las 72 h fue 52% mayor a la observada en CBC obtenido del tallo entero de pasto. Esto indicó que el CBC obtenido de pasto molido mostró mayor fermentación de los carbohidratos disponibles del pasto mulato; ya que, la producción de biogás es indicador indirecto de la disponibilidad de los carbohidratos (Texta *et al.*, 2019) durante la simulación de la fermentación ruminal mediante la técnica de producción de gas *in vitro*.

Además, la producción de biogás hasta las 24 h se relaciona con la fermentación de carbohidratos no estructurales o solubles, después de este tiempo se fermentan los carbohidratos estructurales, y a las 48 h se muestra el desdoblamiento de los carbohidratos estructurales entrelazados con lignina (Sánchez-Santillán *et al.*, 2015). De esta manera, el origen de los CBC modifica el tipo de carbohidratos que se fermentan (Figura 1).

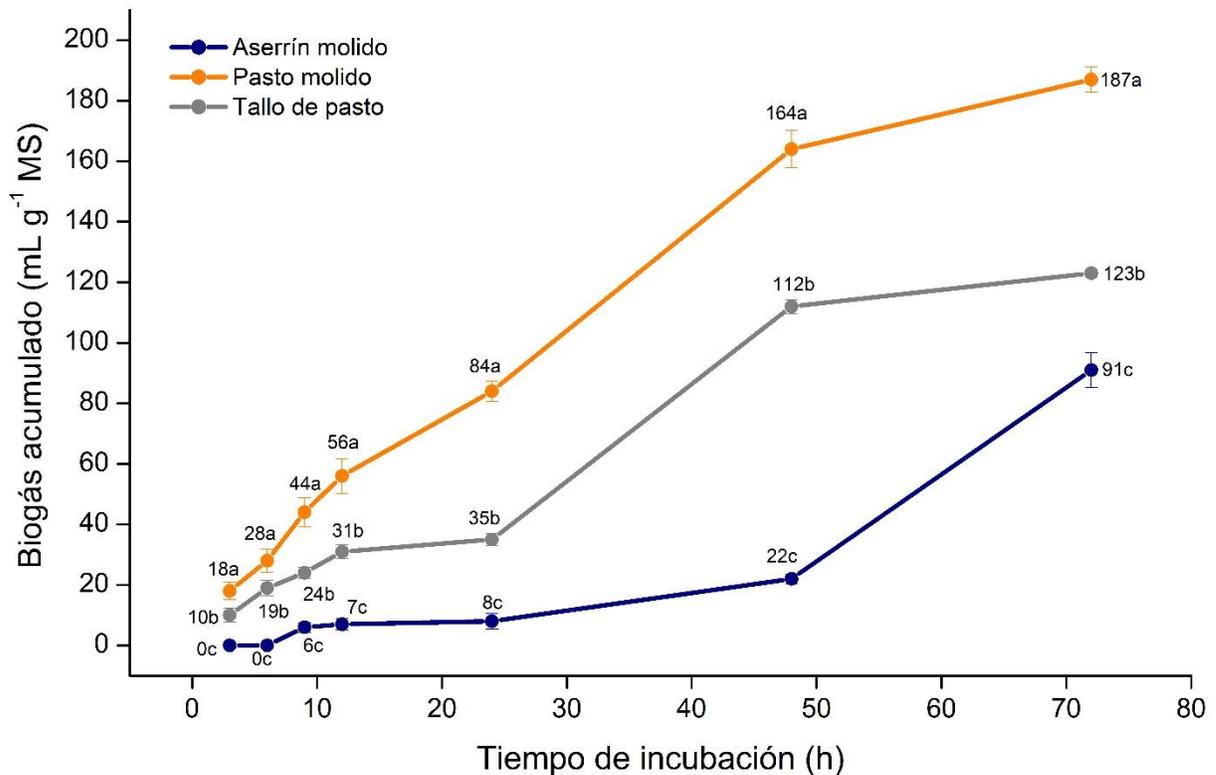
Por ejemplo, el CBC obtenido de aserrín mostró un incremento de 175% en la producción de biogás de 24 a 48 h y de 313% de 48 a 72 h, indicando la capacidad de utilizar carbohidratos estructurales adheridos a lignina de las bacterias presentes en el CBC. En el caso del CBC obtenido del tallo de pasto presentó 220% mayor producción de biogás de las 24 a 48 h y de sólo 10% de las 48 a 72 h. El CBC obtenido de pasto molido mostró que de las 24 a 48 h la producción de biogás aumento 95% y de las 48 a 72 h sólo 14%. Esto muestra que los CBC están constituidos por poblaciones de bacterias que interaccionan para hidrolizar los carbohidratos presentes en el pasto mulato; además, que la fuente de fibra inicial del aislamiento resulta vital para el tipo de carbohidratos que hidrolizan los CBC. Esto porque el CBC obtenidos de aserrín presentó mayor hidrólisis de carbohidratos a partir de las 48 h, ya que produjo 75% del biogás total, mientras que en los CBC

obtenidos del pasto promedio sólo 11% del biogás (Figura 1).

Valores superiores de producción de biogás en los mismos horarios de incubación del presente estudio (Figura 1) se observaron en CBC obtenidos de búfala de agua y vaca Suiz-Bu usando papel Whatman (541) y celulosa cristalina como fuente de carbono; ya que promediaron una producción de $222 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$ de pasto cobra con 56 d de rebrote (Torres-Salado *et al.*, 2019). Sin embargo, la tasa de producción de biogás de las 24 a 48 h y de 48 a 72 h es menor al presente estudio en comparación con cualquiera de los CBC (Figura 1); ya que Torres-Salado *et al.* (2019) promediaron un aumento de 68% de las 24 a 48 h, mientras que de las 48 a 72 h se estimó un incremento de 21%, valor inferior al CBC obtenido de aserrín (Figura 1). Herrera-Pérez *et al.* (2018) reportaron una producción de $116 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$ de rastrojo de maíz usando un CBC obtenido de papel Whatman y celulosa cristalina como fuente de carbono; valor

similar al CBC obtenido de tallo de pasto y superior al CBC obtenido de aserrín. No obstante, Herrera-Pérez *et al.* (2018) estimaron en promedio tasas de producción de biogás de 5 y 8% de las 24 a 48 h y de las 48 a 72 h, respectivamente; valores inferiores a los reportados en el presente estudio (Figura 1) después de las 24 h.

Los valores de producción de biogás *in vitro* del presente estudio y de los autores citados resaltan la importancia de la fuente de carbono usada para obtener los CBC (Zicarelli *et al.*, 2011) y el tipo de carbohidratos fermentados (Noguera *et al.*, 2011). En el presente estudio resulta esencial la cantidad de biogás que se produce después de las 24 h por los CBC que se obtuvieron a partir de la fuente de fibra. Esto indicó dos cosas: a) la obtención de CBC a partir de las mismas condiciones del sustrato usado en el ensayo de producción de biogás, se reflejó en mayor producción de biogás por la eficiencia del uso del sustrato por el CBC (Noguera *et al.*, 2011) y la



a,b,c Medias con distinta literal en el mismo horario de incubación indican diferencias ($p < 0.05$).

Valor de las barras en cada horario de incubación indica la desviación estándar de la fuente de fibra que se usó para obtener los consorcios bacterianos celulolíticos ruminales.

El conteo total de bacterias de los inóculos fue: aserrín molido = 4.0×10^8 células mL^{-1} , tallo de pasto = 6.0×10^8 células mL^{-1} , pasto molido = 1.22×10^9 células mL^{-1} . El pH del medio fue 6.8.

Figura 1. Producción acumulada de biogás *in vitro* de pasto mulato inoculado con consorcios bacterianos celulolíticos ruminales obtenidos de diferentes fuentes de fibra en medios selectivos.

alimentación cruzada (Cobos, 2007); b) se puede obtener un CBC especializado en fermentar carbohidratos estructurales adheridos a lignina según su origen (Zicarelli *et al.*, 2011), dado que el CBC obtenido de aserrín mejoraron la hidrólisis de este tipo de carbohidratos. Lo anterior sugiere que la producción de CBC permite una manipulación del ecosistema ruminal y mejorar la hidrólisis de componentes fibrosos.

La DMS, DFDN, N-NH₃ del medio de cultivo, conteo total de bacterias y la actividad enzimática celulasas presentaron efecto de interacción ($p < 0.05$) entre fuente de fibra usada para obtener el CBC y el tiempo de fermentación (Tabla 2). El valor de pH del medio no presentó una interacción entre factores ($p > 0.05$; Tabla 2). La Tabla 3 muestra la comparación de medias de las características fermentativas *in vitro* por factor.

El valor de pH del medio (Tabla 3) por fuente de fibra para la obtención de CBC mostró una tendencia similar a la producción de biogás (Figura 1); ya que a mayor producción acumulada de biogás (Figura 1) menor ($p < 0.05$) es el valor del pH del medio. De modo que, el CBC obtenido de pasto molido mostró el menor ($p < 0.05$) valor de pH del medio (Tabla 3) y mayor ($p < 0.05$) producción de biogás (Figura 1). Por tiempo de incubación se observó que conforme aumenta el tiempo, el valor de pH tiende a disminuir (Tabla 3). Sin embargo, los valores de pH en el presente estudio se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de las bacterias celulolíticas (Millen *et al.*, 2016).

El CBC obtenido de pasto mulato molido a las 72 h mostró la mayor DFDN ($p < 0.05$), reflejada en un aumento de la DMS (Tabla 4). El CBC obtenido de aserrín mostró aumento ($p < 0.05$) de 19.1 y 33.0% para la DMS y DFDN de las 48 a 72 h; mientras que

Tabla 2. Valor de p de las características fermentativas *in vitro* de pasto mulato inoculado con consorcios bacterianos celulolíticos ruminales obtenidos con diferentes fuentes de fibra en medios selectivos a diferentes tiempos de incubación.

Factores e interacción	DMS	DFDN	pH	N-NH ₃	Bacteria	Celulasas
Fuente de fibra	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tiempo de fermentación	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0021	<0.0001	<0.0001
Fuente de fibra*Tiempo de fermentación	<0.0001	<0.0001	0.053	<0.0001	<0.0001	<0.0001

DMS = degradación de materia seca, DFDN = degradación de fibra detergente neutro, pH = potencial de hidrógeno, N-NH₃ = nitrógeno amoniacal, Bacteria = conteo total de bacterias, Celulasas = actividad enzimática de celulasas.

Tabla 3. Características fermentativas *in vitro* de pasto mulato inoculado con consorcios bacterianos celulolíticos ruminales por factores.

Nivel de factores	DMS (%)	pH	DFDN (%)	N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	Bacteria (10 ⁹ células mL ⁻¹)	Celulasas (mU mL ⁻¹)
Fuente de fibra						
Aserrín molido	28.19 ^b	6.67 ^a	13.36 ^c	11.08 ^c	2.45 ^a	120.1 ^b
Pasto molido	39.58 ^a	6.46 ^c	31.15 ^a	12.37 ^b	0.96 ^c	216.9 ^a
Tallo de pasto	36.03 ^a	6.55 ^b	28.71 ^b	16.42 ^a	1.60 ^b	120.3 ^b
Tiempo de incubación, h						
12	24.95 ^c	6.69 ^a	5.78 ^d	12.48 ^b	1.20 ^b	96.2 ^c
24	25.14 ^c	6.68 ^a	14.38 ^c	13.27 ^{ab}	1.43 ^b	106.4 ^c
48	38.17 ^b	6.46 ^b	30.25 ^b	13.10 ^b	1.95 ^a	180.4 ^b
72	50.14 ^a	6.40 ^b	47.21 ^a	14.32 ^a	2.12 ^a	226.6 ^a
EEM	1.82	0.02	2.85	0.50	0.14	11.81

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

DMS = Degradación de materia seca, DFDN = Degradación de fibra detergente neutro, N-NH₃ = nitrógeno amoniacal, Bacteria = Conteo total de bacterias, Celulasas = Actividad enzimática celulasas, EEM = Error estándar de la media.

El conteo total de bacterias de los inóculos fue: aserrín molido = 4.0×10^8 células mL⁻¹, tallo de pasto = 6.0×10^8 células mL⁻¹, pasto molido = 1.22×10^9 células mL⁻¹. El pH del medio fue 6.8.

Tabla 4. Características fermentativas *in vitro* de pasto mulato inoculado con consorcios bacterianos celulolíticos ruminales obtenidos con diferentes fuentes de fibra en medios selectivos a diferentes tiempos de fermentación ruminal.

Fuente fibra	Tiempo de fermentación	DMS (%)	pH	DFDN (%)	N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	Bacteria (10 ⁹ células mL ⁻¹)	Celulasas (mU mL ⁻¹)
Aserrín molido	12 h	27.27 ^{cd}	6.76 ^a	3.49 ^f	8.67 ^e	1.47 ^{cd}	87.3 ^d
	24 h	21.74 ^d	6.75 ^a	5.23 ^f	8.88 ^e	2.49 ^b	88.4 ^d
	48 h	22.32 ^d	6.64 ^{ab}	5.83 ^f	14.53 ^{cb}	3.37 ^a	89.4 ^d
	72 h	41.42 ^{bc}	6.51 ^{bc}	38.87 ^c	12.23 ^{cd}	2.47 ^b	215.2 ^b
Pasto molido	12 h	25.04 ^d	6.62 ^{ab}	9.22 ^{ef}	12.32 ^{cd}	0.88 ^d	113.5 ^{cd}
	24 h	25.00 ^d	6.62 ^{ab}	13.67 ^e	12.73 ^{cd}	0.81 ^d	134.8 ^{cd}
	48 h	48.42 ^{ab}	6.30 ^d	45.16 ^{bc}	10.32 ^{ed}	0.71 ^d	301.2 ^a
	72 h	59.88 ^a	6.31 ^d	56.55 ^a	14.12 ^{cb}	1.44 ^{cd}	317.9 ^a
Tallo de pasto	12 h	22.55 ^d	6.68 ^a	4.63 ^f	16.45 ^{ab}	1.24 ^{cd}	87.8 ^d
	24 h	28.66 ^{cd}	6.66 ^{ab}	24.24 ^d	18.19 ^a	0.97 ^{cd}	96.1 ^d
	48 h	43.79 ^b	6.44 ^{cd}	39.76 ^{bc}	14.43 ^{bc}	1.76 ^{bc}	150.7 ^c
	72 h	49.11 ^{ab}	6.40 ^{cd}	46.21 ^b	16.61 ^{ab}	2.44 ^b	146.8 ^c
EEM		1.82	0.02	2.85	0.50	0.14	11.81

a,b,c,d,e,f Medias con distinta literal en una misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

DMS = Degradación de materia seca, DFDN = Degradación de fibra detergente neutro, N-NH₃ = Nitrógeno amoniacal, Bacteria = Conteo total de bacterias, Celulasas = Actividad enzimática celulasas, EEM = Error estándar de la media.

El conteo total de bacterias de los inóculos fue: aserrín molido = 4.0×10^8 células mL⁻¹, tallo de pasto = 6.0×10^8 células mL⁻¹, pasto molido = 1.22×10^9 células mL⁻¹. El pH del medio fue 6.8.

el CBC obtenido de pasto molido aumentó 11.5 y 11.4% y el CBC obtenido de tallo de pasto aumentó 5.3 y 6.4%, respectivamente (Tabla 4). Esto concuerda con los valores de producción de biogás; dado que, el CBC obtenido de aserrín presentó mayor producción de biogás de las 48 a 72 h (Figura 1). Por lo que los valores de DMS y DFDN en el presente estudio se asumen a la conformación de los CBC (Abad-Guamán *et al.*, 2015) y su eficiencia en el uso del sustrato (Noguera *et al.*, 2011). Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta (2016) reportaron 43.9% de DMS de pasto pangola usando CBC obtenido de celulosa cristalina como inóculo a las 72 h de incubación, valores inferiores a los observados en el presente estudio cuando se usó CBC obtenido de pasto molido, y es similar a los resultados observados cuando se usó CBC obtenido de tallo de pasto. Torres-Salado *et al.* (2019) publicaron degradaciones de 61.8% para MS y 55.4% para FDN de pasto cobra a las 72 h, superiores a los registrados en el presente estudio (Tabla 4).

Aunque el mayor conteo de bacterias se observó en el CBC obtenido de aserrín molido a las 48 h de incubación ($p < 0.05$; Tabla 4), el número de bacterias observado en todas las interacciones se encuentra dentro del rango del ecosistema ruminal (Millen *et al.*, 2016). El mayor contenido de N-NH₃ en el medio se determinó cuando se usaron los CBC obtenidos de tallo de pasto con 12, 24 y 72 h de incubación ($p < 0.05$); sin embargo, los rangos en el presente

estudio se encuentran debajo de lo reportado por Mehrez *et al.* (1977) como ideales para tener la mayor tasa de digestibilidad de la materia seca. La mayor actividad enzimática de celulasas se determinó con el CBC obtenido de pasto molido a las 48 y 72 h de incubación ($p < 0.05$); pero siguen la misma tendencia que la producción de biogás, por lo que confirma lo discutido anteriormente. Esto porque el CBC obtenido de aserrín muestra que la actividad celulasas tuvo una tasa de crecimiento de 141% de las 48 a 72 h, mientras que el CBC obtenido de pasto molido mostró una tasa de 166% de las 24 a 48 h (Tabla 4); que coincide con las mayores tasas de producción de biogás en los mismos periodos de incubación (Figura 1).

Torres-Salado *et al.* (2019) publicaron valores de 7.0 de pH, 20.4 mg dL⁻¹ de N-NH₃ y 1.7×10^9 células bacterianas mL⁻¹ usando pasto cobra como sustrato, CBC de un bovino como inóculo fermentando en biodigestores a 72 h de incubación; los cuales resultan similares para los conteos de células bacterianas y superiores en pH y N-NH₃ al presente estudio (Tabla 4). Por otra parte, Herrera-Pérez *et al.* (2018) reportaron 6.9 de pH, 19.4 mg dL⁻¹ de N-NH₃ y 1.1×10^9 células bacterianas mL⁻¹ en biodigestores con rastrojo de maíz como sustrato, 72 h de incubación y CBC obtenido de un bovino y papel Whatman y celulosa cristalina como fuente de carbono; valores que resultan similares en el conteo de células

bacterianas y superiores en pH y N-NH₃ a los del presente estudio (Tabla 4).

CONCLUSIONES

La fuente de fibra es determinante en el tipo de bacterias que integran los consorcios bacterianos celulolíticos de origen ruminal con base a los resultados de producción de biogás y características fermentativas *in vitro* observados en este estudio. Los resultados de las variables evaluadas con la técnica de producción de gas *in vitro* sugieren el aislamiento de consorcios bacterianos celulolíticos a partir del sustrato que se pretende evaluar. Los consorcios bacterianos celulolíticos aislados de aserrín molido mostraron los mejores cambios en producción de biogás y degradación de los componentes del sustrato a partir de las 48 h de incubación por una composición bacteriana con mayor potencial celulolítico.

Funding. The present study is part of the results of project 253275 “Elaboración de un probiótico a partir de bacterias celulolíticas aisladas de búfalos de agua y bovinos para mejorar la degradación *in vitro* de los principales forrajes usados en la alimentación de rumiantes”, funded by the National Council of Science and Technology within the Basic Science call CB-2015-01

Conflict of interest. The authors declare and agree with the information presented in the article, and accept the order in which each author is listed in the document and there is no conflict of interest to declare on the part of the authors.

Compliance with ethical standards. The *in vitro* work did not involve animal experimentation, and was carried out according to procedures accepted by the Universidad Autónoma de Guerrero. The donor animal was handled according to the welfare regulation of the UAGro according to the Mexican guidelines NOM-062-ZOO-1999.

Data availability. Data are available from Paulino Sánchez Santillán at sanchezsantillan@gmail.com.

Author contribution statement (CRediT). **D. Hernández-Sánchez** – Writing – original draft, Writing – review and editing, **J. Herrera-Pérez** – Writing – original draft, Writing – review and editing, **López-Garrido S.F.** –Data curation, Formal analysis, **Torres-Salado** – Formal analysis, **Sánchez-Santillán** – Conceptualization, Methodology, Writing, Formal analysis.

REFERENCIAS

- Abad-Guamán, R., Carro, M.D., Carabaño, R. and García, J., 2015. Estudio de la cinética de producción de la pulpa de remolacha con inóculos ileales y cecales de conejos: comparación de modelos. *In: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (ed). XVI Jornadas sobre producción animal*, Zaragoza, España. pp. 275-277.
- AOAC. 2005. *Official methods of analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemist. Arlington, VA, USA.
- Aschenbach, J.R., Penner G.B., Stumpff, F. and Gäbel, G., 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science*, 89, pp. 1092-1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>
- Barahona, R.R. and Sánchez, P.S., 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(01), pp. 69-82.
- Burns, J.C., 2008. ASAS Centennial Paper: utilization of pasture and forages by ruminants: a historical perspective. *Journal of Animal Science*, 86, pp. 3647-3663. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1240>
- Castillo-González, A.R., Burrola-Barraza, M.E., Domínguez-Viveros, J. and Chávez-Martínez, A., 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3), pp. 349-361.
- Castillo-López, E. and Domínguez-Ordóñez, M.G., 2019. Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(1), pp. 120-148. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4547>
- Castillo-López, E., Ramírez-Ramírez, H.A., Klopfenstein, T.J., Anderson, C., Alughge, N.D., Fernando, S.C. and Kononoff, P.J., 2014. Effect of feeding dried distillers grains with solubles on ruminal biohydrogenation, intestinal fatty acid profile, and gut microbial diversity evaluated through DNA pyrosequencing. *Journal of Animal Science*, 92, pp. 733-743. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7223>

- Cobos, M.A., 2007. *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Ferrera-Cerrato, R. y Alarcon, A. (eds). Trillas. Distrito Federal, México. 268 p.
- Dai, X., Tian, Y., Li, J., Su, X., Wang, X., Zhao, S., Liu, L., Lou, Y., Liu, D., Zheng, H., Wang, J., Dong, Z., Hu, S. and Huang, L., 2015. Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in cow rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, pp. 1375-1386. <https://doi.org/10.1128/AEM.03682-14>
- Danielsson, R., Dicksved, J., Sun, L., Gonda, H., Müller, B., Schnürer, A. and Bertilsson, J., 2017. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Frontiers in Microbiology*, 8, pp. 226. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>
- Deng, Y., Huang, Z., Ruan, W., Zhao, M., Miao, H. and Ren, H., 2017. Co-inoculation of cellulolytic rumen bacteria with methanogenic sludge to enhance methanogenesis of rice Straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, pp. 224-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.017>
- Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A.R., Reyes-Vázquez, I. and Mendoza-Núñez, M.A., 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana en Ciencias Pecuarias*, 9(1), pp.105-120. <https://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4332>
- Herrera-Pérez, J., Vélez-Regino, L.G., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Rojas-García, A.R. and Maldonado-Peralta, M.A., 2018. *In vitro* fermentation of fibrous substrates by wáter buffalo ruminal cellulolytic bacteria consortia. *Revista MVZ Córdoba*, 23(3), pp. 6860-6870. <https://dx.doi.org/10.21897/rmvz.1374>
- Khejornart, P., Wanapat, M. and Rowlinson, P., 2011. Diversity of anaerobic fungi and rumen fermentation characteristic in swamp buffalo and beef cattle fed on different diets. *Livestock Science*, 139, pp. 230-236. <https://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2011.01.011>
- Kingston-Smith, A.H., Marshall, A.H. and Moorby, J.M., 2012. Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. *Animal*, 1, pp. 79-88. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731112000961>.
- Kumar, C.P., Salem, A.Z.M., Jena, R., Kumar, S., Singh, R. and Kumar, P.A., 2015. *Rumen microbiology: an overview*. In: Kumar, A.P., Sing, R. and Nadan, D.K. (eds), *Rumen microbiology: from evolution to revolution*, (Springer, New Delhi, India), pp. 3-16.
- Lodemann, U. and Martens, H., 2006. Effects of diet and osmotic pressure on Na⁺ transport and tissue conductance of sheep isolated rumen epithelium. *Experimental Physiology*, 91, pp. 539-550. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032078>
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17(2), pp. 297-304. [https://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90133-7](https://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(67)90133-7)
- Mehrez, A.Z., Orskov, E.R. and McDonald, I., 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition*, 38, pp. 437-443.
- Millen, D.D., Arrigoni, M.D.B. and R.D.L., 2016. *Rumenology*. Springer international. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2>
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Biochemistry*, 31(3), pp. 426-428.
- Nagaraja, T.G., 2016. *Microbiology of the Rumen*. In: Domingues, M.D., De Beni, A.M., and Días, R.L.P. (Eds.), *Rumenology*, Switzerland: Springer Nature, pp. 39-61.
- Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (NOM-062-ZOO-1999), 1999. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <https://fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> Consulta: 10 de agosto de 2020.

- Noguera, R.R., Ortiz, D.M. and Gallego, N., 2011. Comparación de líquido ruminal vacuno y caprino como fuente de inóculo en la técnica *in vitro* de producción de gases. *Livestock Research for Rural Development*, 23(11).
- Petri, RM, Forster, R.J., Yang, W., McKinnon, J.J. and McAllister, T.A., 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), pp. 1152–1162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05295.x>
- Russell, J., 2002. *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, NY. Cornell University Press.
- Sánchez-Santillán, P., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L.A., Santellano-Estrada, E. and Alarcón-Zúñiga, B., 2015. Fibrinolytic activity and gas production by *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius* - EUM1 in bagasse cane. *MVZ Córdoba*, 20, pp. 4907-4916. <https://doi.org/10.21897/rmvz.6>
- Sánchez-Santillán, P. and Cobos-Peralta, M.A., 2016. *In vitro* production of volatile fatty acids by reactivated cellulolytic bacteria and total ruminal bacteria in cellulosic substrate. *Agrociencia*, 50(05), pp. 565-574.
- Sánchez-Santillán, P., Cobos-Peralta, M.A., Hernández-Sánchez, D., Alvarado, A.I., Espinosa-Victoria, D. and Herrera-Haro, J.G., 2016. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia*, 50, pp. 575-582
- SAS. Institute Inc., 2011. *Statistical Analysis System*, SAS, User's Guide: Cary, NC. SAS Inst., pp. 3154-3339.
- Texta, N.J., Sánchez-Santillán, P., Hernández, S.D., Torres-Salado, N., Crosby, G.M., Rojas-García, A.R., Herrera, P.J. and Maldonado, P.M., 2019. Use of disaccharides and activated carbon to preserve cellulolytic ruminal bacterial consortiums lyophilized. *MVZ Córdoba*, 24(3), pp. 7305-7313. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1412>
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, A.R., Almaraz-Buendía, I., Herrera-Pérez, J., Reyes-Vázquez, I. and Mayren-Mendoza, F.J., 2019. *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Suiz-bu cow. *Agrociencia*, 53(02), pp. 145-159
- Vélez, R.L.G., Sánchez, S.P., Torres, S.N., Rojas, G.A.R., Méndoza, N.M.A. and Mayren, M.F.J., 2017. Producción de gas *in vitro* de un cultivo bacteriano celulolítico obtenido de búfalos de agua. In: Memoria del XLI Congreso Nacional de Buiatría. 3-5 de agosto. Acapulco, Guerrero, México. pp. 420-424
- Wahrmund, J.L., Ronchesel, J.R., Krehbiel, C.R., Goad, C.L., Tros, S.M. and Richards, C.J., 2012. Ruminant acidosis challenge impact on ruminal temperature in feedlot cattle. *Journal Animal Science*, 90, pp. 2794-2801. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4407>
- Yokoyama, M.T. and Johnson, K.A., 1988. *Microbiología del rumen e intestino*. En: El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (Ed.). Editorial Acribia.
- Zicarelli, F., Calabrò, S., Cutrignelli, M.I., Infascelli, F., Tudisco, R., Bovera, F. and Piccolo, V., 2011. *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *Journal Science Food and Agriculture*, 91, pp. 1213-1221.