

In vitro fermentation of fibrous substrates by water buffalo ruminal cellulolytic bacteria consortia

Fermentación *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfalos de agua en sustratos fibrosos

Jerónimo Herrera-Pérez^{1,2} Ph.D, Luis Velez-Regino¹ MVZ, Paulino Sánchez-Santillán^{1,2*} Ph.D, Nicolás Torres-Salado^{1,2} Ph.D, Adelaido Rojas-García^{1,2} Ph.D, María Maldonado-Peralta^{1,2} Ph.D.

¹Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional Kilómetro 197, Cuajinicuilapa, Guerrero, México, C.P. 41940. ²Cuerpo Académico UAGro-CA-183 "Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico". *Correspondencia: sanchezsantillanp@gmail.com

Received: February 2018; Accepted: July 2018.

ABSTRACT

Objective. To measure the *in vitro* fermentation variables of a cellulolytic bacteria consortium (CBC) isolated from a water buffalo rumen in coculture with total ruminal bacteria (TRB) on two fibrous substrates. **Materials and methods.** A CBC was isolated from the ruminal fluid of a female water buffalo in selective cellulolytic media. The experimental design was completely random with a 3x2 factorial arrangement; factors were treatments [TRB, CBC, and coculture (TRB + CBC)] and substrates (cobra grass and corn stover). Total gas and methane (CH₄) production were measured at different time intervals. At 72 h, measurements were taken of pH, ammoniacal nitrogen (NH₃-N), dry matter degradation (DMD), neutral detergent fiber degradation (NDFD) and total bacteria population. **Results.** Gas production with both substrates was highest ($p \leq 0.05$) in the coculture at 3, 6 and 24 h. At 48 and 72 h, gas production in the cobra grass was highest ($p \leq 0.05$) in the coculture. The coculture and TRB did not differ ($p > 0.05$) in terms of CH₄, DMD and NDFD values at 48 and 72 h. With the cobra grass, NH₃-N concentration was higher ($p \leq 0.05$) in the coculture than in the TRB. **Conclusions.** The gas production and dry matter degradation values of the water buffalo rumen cellulolytic bacteria consortia indicate them to be a promising alternative for improving cobra grass structural carbohydrates degradation when in coculture with bovine ruminal bacteria.

Keywords. Ruminal bacteria; *Bubalus bubalis*; cellulosic coculture; degradation (Source: DeCS).

RESUMEN

Objetivo. Determinar las variables fermentativas *in vitro* de un consorcio bacteriano celulolítico (CBC) aislado de una búfala de agua en cocultivo con bacterias ruminales totales (BRT) en sustratos fibrosos. **Materiales y métodos.** Un CBC se aisló de fluido ruminal de una búfala de agua en medios selectivos celulolíticos. El diseño experimental fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2, los factores fueron tratamientos [BRT, CBC y un cocultivo (BRT + CBC)] y sustratos (pasto pangola y rastrojo de maíz). La producción de gas total y metano (CH₄) se midieron a diferentes intervalos de tiempo. Además, se estimó pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃), degradación de materia seca (DMS) y de

fibra detergente neutro (DFDN), y la población de bacterias totales a 72 h de incubación. **Resultados.** El cocultivo produjo mayor ($p \leq 0.05$) cantidad de gas a las 3, 6 y 24 h en ambos sustratos. A las 48 y 72 h, el cocultivo produjo mayor ($p \leq 0.05$) gas en pasto cobra. El cocultivo y las BRT no presentaron diferencias ($p > 0.05$) en la producción de CH_4 a 48 y 72 h, y en DMS y DFDN ($p > 0.05$). En el pasto cobra, la concentración de N-NH_3 con el cocultivo fue mayor ($p \leq 0.05$) que con BRT. **Conclusiones.** La producción de gas y degradación de materia seca de los consorcios bacterianos celulolíticos procedentes del rumen de una búfala de agua muestran que son una alternativa para mejorar la fermentación de carbohidratos estructurales del pasto cobra cuando se cocultivan con bacterias ruminales bovinas.

Palabras clave: Bacterias ruminales; *Bubalus bubalis*; celulósicos; cocultivo; degradación (Fuente: DeCS).

INTRODUCTION

The dry tropics of Mexico contain approximately 51 million hectares of pasture, which represent a substantial source of forage for ruminants. These forages are characterized by their rapid growth and early maturation, leading to high concentrations of cellulose, hemicellulose and lignin (1).

The ruminal microorganisms of water buffalo (*Bubalus bubalis*) differ from those of cattle (*Bos indicus* and *B. taurus*), and are better adapted to tropical forages. Water buffalo are therefore better able to synthesize microbial protein due to more efficient fermentation of structural carbohydrates. They can transform low quality forages into available energy in the form of volatile fatty acids (2,3), and can ruminate 50% more than cattle (3). This difference may be due to the higher cellulolytic bacteria and ciliated protozoa populations in the water buffalo rumen compared to that of cattle (2). For example, water buffalo have substantially higher proportions of protozoa in the subfamilies *Diplodiniinae* (28.6 vs. 1.4%) and *Epidinium* (5.3 vs. 0.0%) (4), and the buffalo bacterial population is $0.60 \log^{10}$ cells g^{-1} larger than that of cattle (5). This discrepancy has fostered interest in understanding and manipulating the water buffalo microorganism community (3).

Microorganisms generally exist in diverse and complex communities known as consortia (6,7), which interact with their environment (8). Communication between microorganisms is via direct cell-cell interactions, metabolites or molecular signals (6). Cellulolytic consortia are very efficient at degrading cellulose and hemicellulose (7), and can be used as additives in ruminant feed to improve cellulose and hemicellulose degradation in forages. The present study objective was to estimate the *in vitro* fermentation characteristics of cellulolytic bacterial consortia collected from the rumen

INTRODUCCIÓN

En el trópico seco de México existen alrededor de 51 millones de h de praderas que constituyen una fuente importante de forraje para rumiantes. Estos forrajes se caracterizan por su rápido crecimiento y temprana maduración que resultan en incrementos en la concentración de celulosa, hemicelulosa y lignina (1).

Los microorganismos ruminales de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) son diferentes a los de bovinos (*Bos indicus* y *B. taurus*) permitiendo una mejor adaptación a los forrajes tropicales. Esta característica permite a los búfalos mejorar la síntesis de proteína microbiana debido a una fermentación más eficiente de carbohidratos estructurales para transformar forrajes de baja calidad en energía disponible en forma de ácidos grasos volátiles (2,3); además, pueden rumiar 50% más que los bovinos (3). Las diferencias pueden deberse a que el rumen de los búfalos contiene mayor población de bacterias celulolíticas y protozoarios ciliados que el rumen de los bovinos (2); por ejemplo, Franzolin et al (4) reportaron diferencias entre búfalos y bovinos en protozoarios de la subfamilia *Diplodiniinae* (28.6 vs. 1.4%) y *Epidinium* (5.3 vs. 0.0%); Puppo et al (5) reportaron que la población de bacterias en búfalos es $0.60 \log^{10}$ células g^{-1} mayor que en bovinos. Lo anterior, generó interés científico por la manipulación de dichos microorganismos (3).

En general, los microorganismos coexisten en comunidades diversas y complejas llamadas consorcios (6,7), los cuales interactúan entre sí y con su entorno (8). La comunicación entre ellos es por interacciones directas célula-célula y por metabolitos o señales moleculares (6). Los consorcios celulolíticos son muy eficientes para degradar celulosa y hemicelulosa (7), por lo que se pueden usar como aditivos en la alimentación de rumiantes para mejorar la degradación de la celulosa y hemicelulosa de los

of a female water buffalo (*Bubalus bubalis*) in coculture with ruminal bacteria from a female Swiss-bu (Brown Swiss x Brahman) calf using cobra grass (*Brachiaria* sp.) and corn (*Zea mays*) stover as substrates.

MATERIALS AND METHODS

Study site. The study was done at the Animal Nutrition Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny No. 2, Autonomous University of Guerrero (Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico). Located in southwest Mexico (16°08' N; 98°23' W; 50 m asl), regional climate is warm subhumid with summer rains, average rainfall is 1,200 mm and average annual temperature is 25°C (9).

Ethical aspects. Both the water buffalo and Swiss-bu calf were handled following the internal bioethical and well-being guidelines of the Autonomous University of Guerrero, which comply with established federal guidelines (NOM-062-ZOO-1999) (10).

Culture medium. Medium components were 30 mL clarified ruminal fluid [fresh bovine ruminal liquid centrifuged at 12,857 x g for 10 min and sterilized (All American® 1941X, USA) for 15 min at 121°C and 15 psi]; 5 mL mineral I solution [6 g K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich®) in 1000 mL distilled water]; 5 mL mineral II solution [6 g KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck®) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich®) + 2.45 g MgSO₄ (Sigma-Aldrich®) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Sigma-Aldrich®) in 1000 mL distilled water]; 0.1 mL 0.1% resazurin (Sigma-Aldrich®); 0.2 g soy peptone (Merck®); 0.1 g yeast extract (Sigma-Aldrich®); 2 mL cysteine-sulfide solution [2.5 g L-cysteine (Sigma-Aldrich®) in 15 mL 2N NaOH (Meyer®) + 2.5 g Na₂S-9H₂O (Merck®) diluted in 1000 mL distilled water]; 5 mL of an 8% Na₂CO₃ solution (Merck®) and 52.6 mL distilled water. The medium was sterilized for 15 min in an autoclave at 121°C and 15 psi (11).

Cellulolytic bacterial consortium. Before sample collection, the water buffalo (450 Kg PV) was kept in a pangola grass (*Digitaria decumbes*) pasture, without supplements. Ruminal fluid was extracted from the buffalo (*Bubalus bubalis*) with an esophageal probe and centrifuged at 1.157 x g for 3 min (Metrix Velocity 14, USA). The supernatant was recovered and, under a biosecurity hood (Labconco®, USA), used as an inoculum. Sterile culture medium (9 mL) was added to test tubes (Pirex®, Mexico; 18x150 mm) containing a sterile strip (3x30 mm) of Whatman® paper. The tubes were kept under CO₂ flow in an incubator (Ecoshel 9082, Mexico)

forrajes. El objetivo fue estimar las características fermentativas *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos del rumen de una búfala de agua (*Bubalus bubalis*) en cocultivo con bacterias ruminales de una becerra Suiz-bu (Pardo suizo X Brahman) usando pasto cobra y rastrojo de maíz como sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero ubicado en el Municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Geográficamente situado a 16°08' Latitud Norte y 98°23' de Longitud Oeste, a una altitud de 50 msnm, predominando un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano y cálido subhúmedo con lluvias en verano, con precipitación media anual de 1,200 mm y una temperatura promedio anual de 25°C (9)

Aspectos éticos. La búfala de agua y la becerra Suiz-bu se manejaron de acuerdo al reglamento interno de bioética y bienestar de la Universidad Autónoma de Guerrero según las normas oficiales NOM-062-ZOO-1999 (10).

Medio de cultivo. Los componentes del medio contenía 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 CaCl-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 en 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 (11).

Consortio bacteriano celulolítico. El fluido ruminal (FR) se extrajo de una búfala de agua (*Bubalus bubalis*) mediante el uso de una sonda esofágica y se centrifugó 3 min a 1,157 x g (Metrix Velocity 14, USA). Previo al muestreo la búfala (450 Kg PV) permaneció en una pradera de pangola (*Digitaria decumbes*) sin recibir suplemento. El sobrenadante del FR se

at 39°C for 24 h to verify sterility. Using three replicates, 1 mL inoculum was added to a test tube containing medium and sterile Whatman® paper, and incubated at 39°C until the paper was observed to degrade; 1 mL of this inoculum was transferred to another tube containing medium and sterile Whatman® paper and again incubated at 39°C until the paper degraded. After three transferences, a B inoculum was produced. Sterile medium (9 mL) was placed in tubes (18x150 mm) containing 0.05 g sterile crystalline cellulose (Sigma-Aldrich®), and the tubes placed under CO₂ flow at 39°C for 24 h to verify sterility. In triplicate, a tube containing crystalline cellulose was inoculated with 1 mL B inoculum and kept at 39°C for 72 h; 1 mL of the resulting inoculated medium was transferred to another sterile tube and incubated at 39°C for 72 h. Four of these transferences were done to produce a cellulolytic bacterial consortium capable of degrading Whatman® paper and crystalline cellulose.

Treatment. Three treatments were tested. 1) TRB = 5 mL total ruminal bacteria extracted from the ruminal fluid of a female Swiss-bu (Brown Swiss x Brahman) calf fitted with a ruminal canula; the calf had been kept in a pasture of pangola. The ruminal fluid was centrifuged at 1,157 g for 3 min to precipitate protozoa and fiber particles (11). 2) CBC = 5 mL of a cellulolytic bacteria consortium from water buffalo grown in culture medium containing cellobiose (0.2 g 100 mL⁻¹ medium; Sigma-Aldrich®). 3) Coculture = 5 mL TRB + 5 mL CBC; total bacterial population in the TBR and CBC was measured by direct count with a Petroff-Hausser camera (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA) and a microscope (BX31, Olympus, USA) at 1000x magnification. Bacterial population was calculated with the formula: number of bacteria = (quadrant average)(dilution factor, 2X10⁷) (11).

Substrate. Cobra grass (*Brachiaria hybrid* CV. CIAT BR02/1794) harvested 56 days post-resprout and corn stover were the two tested substrates. Both were dehydrated at 60 °C for 72 h in a drying oven (Felisa® FE-293A, Mexico), ground (Thomas-Wiley Mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) and screened through 1 mm mesh. Substrate crude protein (CP), ash (AS) and organic matter (OM) content were measured following AOAC methods (12). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were measured with the ANKOM Technology Method according to Van Soest et al (13)(Table 1).

In vitro gas production. Glass serological vials (120 mL) were filled with 0.5 g substrate and 45 mL culture medium, each being considered

recuperó y en condiciones de una campana de bioseguridad (Labconco®, USA) se utilizó como inóculo. Nueve mL de medio de cultivo estéril se agregaron a tubos de ensaye (Pirex®, México; 18x150 mm) que contenían una tira de papel Whatman® (3x30 mm) estéril, bajo flujo de CO₂ y se mantuvieron en una incubadora (Ecoshel 9082, México) a 39°C por 24 h para verificar esterilidad. A un tubo (triplicado) con medio y papel Whatman® estéril se agregó 1 mL de inóculo y se incubó a 39°C, hasta observarse la degradación del papel Whatman®; un mL de este medio inoculado se transfirió a otro tubo con medio y papel Whatman® estéril y se incubó a 39°C hasta degradar el papel Whatman®. Un inóculo B se obtuvo después de tres transferencias. Nueve mL de medio estéril se depositaron a tubos (18x150 mm) con 0.05 g de celulosa cristalina (Sigma-Aldrich®) estéril, bajo flujo de CO₂ y se mantuvieron 24 h a 39°C para verificar esterilidad. Posteriormente, un tubo estéril (triplicado) con celulosa cristalina se inóculo con 1 mL del inóculo B y se mantuvo 72 h a 39°C; así mismo, 1 mL de este medio inoculado se transfirió a otro tubo estéril y se incubó 72 h a 39°C. Cuatro transferencias se realizaron para obtener un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) capaces de degradar la celulosa del papel Whatman® y de la celulosa cristalina.

Tratamientos. Los tratamientos fueron: 1) BRT = 5 mL de bacterias ruminales totales obtenidas del FR de una becerria Suiz-bu (Pardo suizo X Brahman) provista con cánula ruminal; la becerria se mantuvo en praderas de pangola. El fluido ruminal se centrifugó 3 min a 1,157 g para precipitar protozoarios y partículas de fibra (11). 2) CBC = 5 mL de un consorcio de bacterias celulolíticas obtenidas de una búfala de agua; el cual creció en medio de cultivo con celobiosa (0.2 g 100 mL⁻¹ medio; Sigma-Aldrich®). 3) Cocultivo = 5 mL de BRT y 5 mL de CBC. En BRT y CBC se determinó la población de bacterias totales usando el conteo directo en una cámara Petroff-Hausser (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA) y un microscopio (BX31, Olympus, USA) a 1000x magnificación. La población de bacterias se calculó con la fórmula: cantidad de bacterias = (promedio de los cuadrantes) (factor de dilución, 2X10⁷) (11).

Sustrato. Los sustratos fueron pasto cobra (*Brachiaria* híbrido CV. CIAT BR02/1794) cosechado a 56 días de rebrote y rastrojo de maíz. Ambos sustratos se deshidrataron 72 h a 60°C en un horno de secado (Felisa® FE-293A, México). Los sustratos se molieron (Molino Thomas-Wiley Mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) y se pasaron a través de una criba de 1 mm. A los sustratos se determinó

Table 1. Chemical composition (% dry base) of cobra grass and corn stover substrates.

Substrate	CP	NDF	ADF	Hemicellulose	AS	OM
Cobra Grass	7.82	69.05	47.96	12.09	12.14	87.86
Corn stover	3.86	77.20	46.92	30.28	12.31	87.69

CP = crude protein; NDF = neutral detergent fiber; ADF = acid detergent fiber; As = ash; OM = organic matter.

a biodigester. These were sterilized for 15 min at 121°C and 15 psi, and incubated at 39°C for 24 h to verify sterility. Using four repetitions per treatment, the biodigesters were inoculated with TRB, CBC or the coculture and incubated at 39°C for 72 h. At seven incubation times (3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h) (14), gas production was measured by displacement of the plunger in a glass syringe (50 mL; BD Yale®, Brazil).

Methane (CH₄) production. This parameter was measured following a modified version of Stolaroff et al (15). Hypodermic needles (20 G x 32 mm) were attached to the ends of a Taygon® hose (2.38 mm internal Ø x 45 cm long), and used to connect the biodigesters to trap vials filled with a 2 N NaOH solution [80 g NaOH (Merck®) in 1000 mL distilled water]. Methane production was quantified as mL of displaced NaOH solution at 24, 48 and 72 h incubation.

pH. This parameter was measured with a potentiometer (Hanna® HI2211, Italy; calibration: pH 7 and 4) at 72 h incubation.

Total bacterial count. At 72 h incubation, 1 mL of medium was collected from the center of the biodigester, and placed in a test tube with 0.25 mL 10% formaldehyde (Sigma-Aldrich®). Total bacterial count was calculated by direct count in a Petroff-Hausser chamber (11).

Ammoniacal nitrogen (NH₃-N). A sample of medium (1 mL) from the biodigester was mixed with 0.25 mL 25% metaphosphoric acid (4:1 ratio), centrifuged at 3,500 x g for 25 min and the supernatant recovered in 2 mL vials. Supernatant (20 µL) was mixed with 1 mL phenol solution [10 mg Na₂(NO)Fe(CN)₅·H₂O (Meyer®) + 10 g phenol crystals (Meyer®) diluted in 1000 mL distilled water] and 1 mL hypochlorite solution [7.5 g NaOH (Reasol®) + 21.3 g Na₂HPO₄ (Meyer®) + 15 mL hypochlorite (5%; Reasol®) diluted to 1000 mL with distilled water]. This mixture was incubated for 30 min at 37 °C in a water bath. Distilled water (5 mL) was added to the mixture and it was agitated in a vortex (Genie 2 G-560, USA). Absorbance was measured at 630 nm in a UV-VIS spectrophotometer (Jenway® 6850, USA) calibrated (r² = 0.9994) with an ammoniacal nitrogen concentration method (16).

proteína cruda (PC), cenizas (Ce) y materia orgánica (MO) según AOAC (12); además, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) con la metodología de ANKOM Technology Method según Van Soest et al (13)(Tabla 1)

Producción de gas *in vitro*. Se usaron viales serológicos de vidrio (120 mL) con 0.5 g de sustrato y 45 mL de medio de cultivo (4 repeticiones independientes), por lo que cada vial se consideró un biodigester. Los biodigestores se esterilizaron 15 min a 121°C y 15 psi, y se incubaron 24 h a 39°C para verificar esterilidad. Los biodigestores se inocularon con BRT, CBC o cocultivo y se incubaron 72 h a 39°C. La producción de gas se midió mediante el desplazamiento del émbolo de una jeringa de vidrio (50 mL; BD Yale®, Brasil). El gas se midió a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h de incubación (14).

Producción de metano (CH₄). Se midió usando una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos. Las agujas se usaron para acoplar un biodigester con un vial trampa. Los viales trampa se llenaron con solución de NaOH (2N) [80 g de NaOH (Merck®) en 1000 mL de agua destilada] modificado de la metodología de Stolaroff et al (15). La producción de CH₄ se consideró como los mL desplazados de la solución NaOH (2N) a las 24, 48 y 72 h de incubación.

pH. El pH del medio se midió con un potenciómetro (Hanna® HI2211, Italia; calibración: pH 7 y 4) al término de las 72 h de incubación.

Conteo de bacterias totales. Un mL del medio contenido en la parte media del biodigester recolectado a 72 h de incubación. Este se colocó en un tubo de ensayo con 0.25 mL de formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich®). La cantidad de bacterias totales se calculó por conteo directo en una cámara Petroff-Hausser (11).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). Un mL del medio contenido en el biodigester se mezcló con 0.25 mL de ácido metafosfórico (Meyer®) al 25% (proporción 4:1) y se centrifugó 25 min a 3,500 x g y el sobrenadante se recuperó en viales de 2 mL. Un volumen de 20 µL de este sobrenadante se mezcló con 1 mL de solución fenol [10 mg de Na₂(NO)Fe(CN)₅·H₂O (Meyer®) + 10 g de cristales de fenol (Meyer®) aforado en 1000 mL de agua destilada] y 1 mL de solución hipoclorito [7.5 g de NaOH (Reasol®) + 21.3 g de Na₂HPO₄ (Meyer®) + 15 mL de hipoclorito (5%; Reasol®) aforado a 1000 mL con agua destilada]. La mezcla se incubó 30 min a 37°C en baño maría. Posteriormente, 5 mL de agua destilada se adicionaron para diluir y se agitaron con un

Degradation of dry matter (DMD) and neutral detergent fiber (NDFD). The sample remaining in the biodigester was filtered using ANKOM® 541 bags to a constant weight. Bags containing samples were dried for 24 h at 60°C in a drying oven. Dry matter degradation was calculated with the formula $DMD(\%) = (\text{initial sample} - \text{residual sample} / \text{initial sample}) * 100$ (14). The bags were then heat sealed and NDF content measured (13). The percentage of NDFD was calculated with the formula $NDFD(\%) = (\text{initial NDF} - \text{residual NDF} / \text{initial NDF}) * 100$ (14).

Results analysis. A completely random 3x2 factor analysis was applied using the three treatments (i.e. CBC, TRB and Coculture) and two substrates (i.e. cobra grass and corn stover).

The statistical model was

$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$; where
 Y_{ijk} = response variable; μ = general mean;
 A_i = effect of treatment; B_j = effect of substrate;
 AB_{ij} = effect of treatment / substrate interaction;
 ϵ_{ijk} = random error.

Data were analyzed with the GLM procedure in the SAS® package (17). Means were adjusted by least means using LSMEANS in SAS® (17), and compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS

With cobra grass, gas production at 3, 6, 24, 48 and 72 h was highest ($p \leq 0.05$) in the coculture versus the CAC and TRB treatments; the same was true with the corn stover at 3, 6, 9, 12 and 24 h (Table 2). At 48 and 72 h, no difference ($p > 0.05$) in gas production was observed between the coculture and TRB with corn stover. At these same times the coculture in cobra grass produced more ($p \leq 0.05$) gas than TRB and CBC (Table 2).

With cobra grass, methane (CH_4) production was highest ($p \leq 0.05$) when fermented with TRB at 24 h (Table 3). At 48 and 72 h, the coculture and TRB did not differ ($p > 0.05$) although both were higher ($p \leq 0.05$) than CBC. In contrast, CH_4 production in the corn stover was highest ($p \leq 0.05$) with TRB at all the evaluated times (Table 3). Overall, the CBC exhibited the lowest CH_4 production in both cobra grass and corn stover at all the evaluated times (Table 3).

No differences ($p > 0.05$) were observed in DMD and NDFD between the coculture and TRB in either substrate; however, overall DMD and NDFD values were higher in the cobra grass than in the corn stover. The lowest ($p \leq 0.05$) DMD and NDFD values in both substrates were produced by CBC

vórtex (Genie 2 G-560, USA). La absorbancia se midió a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway® 6850, USA) calibrado con un método ($r^2 = 0.9994$) de concentración de nitrógeno amoniacal según McCullough (16).

Degradación de la materia seca (DMS) y de la fibra detergente neutro (DFDN). En bolsas ANKOM® 541 con peso contante se filtró la muestra residual del biodigestor. Las bolsas con muestra se secaron 24 h a 60°C en un horno de secado. La DMS se calculó con la formula $DMS(\%) = (\text{muestra inicial} - \text{muestra residual} / \text{muestra inicial}) * 100$ (14). Las bolsas ANKOM® se sellaron a calor y se determinó el contenido de FDN (13). El porcentaje de degradación de la FDN (% DFDN) se calculó con la formula $DFDN(\%) = (\text{FDN inicial} - \text{FDN residual} / \text{FDN inicial}) * 100$ (14).

Análisis de resultados. Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2; considerando como factores a los tratamientos (CBC, BRT y cocultivo) y sustratos (pasto cobra y rastrojo de maíz).

El modelo estadístico fue

$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$; donde
 Y_{ijk} = variable de respuesta; μ = media general;
 A_i = efecto del factor tratamiento; B_j = efecto del factor sustrato; AB_{ij} = efecto de la interacción entre tratamiento y sustrato; ϵ_{ijk} = error aleatorio.

Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS® (17). Las medias se ajustaron por mínimos cuadrados usando LSMEANS de SAS® (17) y se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

La producción de gas con pasto cobra fue mayor ($p \leq 0.05$) en el cocultivo comparado con los medios inoculados con CBC y BRT a las 3, 6, 24, 48 y 72 h; mientras, con rastrojo de maíz esto ocurrió a las 3, 6, 9, 12 y 24 h (Tabla 2). En rastrojo de maíz, el cocultivo y las BRT no mostraron diferencias ($p > 0.05$) en la producción de gas a las 48 y 72 h. A las 48 y 72 h el cocultivo inoculado en el medio que contenía pasto cobra presentó mayor cantidad de gas ($p \leq 0.05$) que BRT y CBC (Tabla 2).

En la Tabla 3 se muestra que la fermentación de pasto cobra con BRT produjeron mayor ($p \leq 0.05$) cantidad de metano a las 24 h. El cocultivo y las BRT no presentaron diferencias en la producción de metano a las 48 y 72 h ($p > 0.05$), pero fueron mayores que CBC ($p \leq 0.05$); mientras, en el

Table 2. Gas volume (mL g⁻¹ DM) accumulated during *in vitro* fermentation of cobra grass and corn stover inoculated with a cellulolytic bacteria consortium from water buffalo, total ruminal bacteria from a cow and a coculture of these communities.

Incubation time (h)	Cobra Grass			Corn stover			SME
	CBC	Coculture	TRB	CBC	Coculture	TRB	
3	51.6 ^b	59.7 ^a	48.9 ^b	63.3 ^a	51.7 ^b	31.7 ^c	2.02
6	61.7 ^c	70.5 ^b	59.1 ^c	84.3 ^a	83.8 ^a	62.3 ^c	2.13
9	72.5 ^c	83.7 ^b	81.6 ^b	90.7 ^a	90.1 ^a	79.2 ^b	2.20
12	76.0 ^c	102.6 ^a	106.6 ^a	96.5 ^b	107.6 ^a	94.5 ^b	1.36
24	82.7 ^d	145.4 ^a	132.5 ^b	101.7 ^c	150.8 ^a	133.0 ^b	2.26
48	93.9 ^c	243.5 ^a	208.5 ^b	107.0 ^c	212.4 ^b	201.2 ^b	5.10
72	103.4 ^c	271.5 ^a	247.3 ^b	116.7 ^c	245.8 ^b	232.9 ^b	11.8

a,b,c,d: Different letter superscripts in the same row indicate significant difference (p≤0.05).

CBC = Water buffalo cellulolytic bacteria consortium (1.29 X 10⁹ cells mL⁻¹); TRB = Total ruminal bacteria (9.73 X 10⁹ cells mL⁻¹); Coculture = CBC + TRB; SME = Standard mean error.

(Table 4). Bacteria count in the cobra grass did not differ between the treatments (p>0.05). In the corn stover, TRB had a higher (p≤0.05) count than the coculture but did not differ from CBC (p>0.05; Table 4). Average pH in all treatments and substrates was 6.89 and did not differ (p>0.05) between them. Ammoniacal nitrogen (NH₃-N) concentration did not differ between the coculture and TRB in the corn stover (p>0.05), but was higher in the coculture with cobra grass (p≤0.05; Table 4).

Table 4. Dry matter and neutral detergent fiber degradation, bacteria count, pH and ammoniacal nitrogen during *in vitro* fermentation of cobra grass and corn stover inoculated with a cellulolytic bacteria consortium from water buffalo, total ruminal bacteria from a cow and a coculture of these communities.

Variable	Cobra Grass			Corn Stover			SME
	CBC	Coculture	TRB	CBC	Coculture	TRB	
DMD	29.65 ^c	70.92 ^a	70.42 ^a	27.86 ^c	59.20 ^b	60.84 ^b	3.70
NDFD	10.67 ^c	67.05 ^a	66.33 ^a	3.94 ^d	50.31 ^b	51.32 ^b	5.75
Bacteria	1.28 ^{abc}	1.36 ^{abc}	1.68 ^a	1.19 ^{bc}	1.08 ^c	1.56 ^{ab}	0.06
pH	6.93	6.91	6.88	6.95	6.87	6.84	0.05
NH ₃ -N	18.26 ^c	21.91 ^a	16.77 ^d	19.35 ^{bc}	20.50 ^{ab}	20.04 ^b	0.36

a,b,c,d: Different letter superscripts in the same row indicate significant difference (p≤0.05).

CBC = Water buffalo cellulolytic bacteria consortium (1.29 X 10⁹ cells mL⁻¹); TRB = Total ruminal bacteria (9.73 X 10⁹ cells mL⁻¹); Coculture = CBC + TRB; DMD = Dry matter degradation; NDFD = Neutral detergent fiber degradation; Bacteria = 10⁹ cells mL⁻¹; NH₃-N = mg dL⁻¹ NH₃-N; SME = Standard mean error.

Table 3. Methane (CH₄) volume (mL g⁻¹ DM) accumulated during *in vitro* fermentation of cobra grass and corn stover inoculated with a cellulolytic bacteria consortium from water buffalo, total ruminal bacteria from a cow and a coculture of these communities.

Incubation Time (h)	Cobra Grass			Corn Stover			SME
	CBC	Coculture	TRB	CBC	Coculture	TRB	
24	10.2 ^f	22.5 ^b	25.2 ^a	12.7 ^e	19.0 ^c	16.4 ^d	1.10
48	15.3 ^c	44.4 ^a	42.2 ^a	17.9 ^c	41.7 ^a	37.0 ^b	2.57
72	15.8 ^c	54.1 ^a	53.7 ^a	18.4 ^c	49.6 ^a	42.2 ^b	3.45

a,b,c,d: Different letter superscripts in the same row indicate significant difference (p≤0.05).

CBC = Water buffalo cellulolytic bacteria consortium (1.29 X 10⁹ cells mL⁻¹); TRB = Total ruminal bacteria (9.73 X 10⁹ cells mL⁻¹); Coculture = CBC + TRB; SME = Standard mean error.

rastrojo de maíz, el cocultivo mostró mayor producción de metano que las BRT en todos los tiempos evaluados (p≤0.05; Tabla 3). El CBC inoculado en el pasto cobra y rastrojo de maíz mostró la menor (p≤0.05) producción de metano en los tiempos evaluados (Tabla 3).

La DMS y DFDN no presentaron diferencias (p>0.05) entre el cocultivo y las BRT en los sustratos evaluados; sin embargo, en el pasto cobra la DMS y la DFDN fue mayor que en el rastrojo de maíz. Además, CBC inoculado en los sustratos evaluados presentó la menor (p≤0.05) DMS y DFDN (Tabla 4). El conteo de bacterias de los medios que contenían pasto cobra no fue diferente (p>0.05) entre tratamientos; pero, en el rastrojo de maíz las BRT tuvieron mayor cantidad de bacterias que el cocultivo (p≤0.05; Tabla 4), pero sin diferencias con CBC (p>0.05). El pH no presentó cambios (p>0.05) entre tratamientos y sustratos, promediando 6.89 de pH. La concentración de N-NH₃ no presentó diferencias (p>0.05) entre el cocultivo y las BRT en el rastrojo de maíz; en contraste, en el pasto cobra, el valor de N-NH₃ del cocultivo fue mayor que el observado en las BRT (p≤0.05; Tabla 4).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el cocultivo simula la adición de un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) en la población bacteriana ruminal de bovinos, mediante lo cual se analizó el potencial de degradación de sustratos celulósicos en respuesta a la adición del CBC. Las diferencias en la producción de gas (Tabla 2) y en la DMS (Tabla 4) observadas en este estudio en los horarios evaluados se atribuyen a los nutrientes disponibles en los sustratos, eficiencia de uso del sustrato por los microorganismos, y al origen y

DISCUSSION

The coculture treatment simulated addition of a cellulolytic bacterial consortium (CBC) to the bacterial community of the cattle rumen, allowing analysis of any changes in cellulosic substrate degradation in response to the addition. The differences in gas production (Table 2) and DMD (Table 4) observed at the tested times can be attributed to the nutrients available in the substrates, efficiency of substrate use by the microorganisms, and microorganism source and density (18). Gas production during the first 24 h responds to the capacity of TRB, CBC or the coculture to ferment substrate cell content. After 24 h, gas production by the coculture in cobra grass was due to the capacity of the cellulolytic bacteria to degrade cellulose, and, unlike with TRB, was related to gas production. Beginning at 48 h, gas production in the corn stover did not differ ($p > 0.05$) between the coculture and TRB, which can be attributed to the type of nutrients in this substrate (Table 1). These differences in gas production between the coculture and TRB in the two tested substrates are due to the corn stover having 8% more NDF and 10% more hemicellulose than the cobra grass (Table 1). The corn stover's higher NDF and hemicellulose contents are related to vegetal cell aging and changes in cell wall composition in which cellulose mixes with hemicellulose and lignin (19). Lower gas production than that observed here for the coculture at 48 h has been reported for *Brachiaria decumbens* inoculated with buffalo ruminal fluid (152 mL gas g^{-1} DM) or bovine ruminal fluid (167 mL gas g^{-1} DM) and fermented for 48 h (20).

Differences observed in CH_4 production (Table 3) were due to substrate carbohydrate content (Table 1) (19,23), and inoculate type (18). For instance, CH_4 production was 33.1 mL $CH_4 g^{-1}$ DM at 120 h incubation in a study of water buffalo ruminal fluid as an inoculate in wheat hay (21). This is lower than production observed here at 72 h for the coculture and TRB treatments. The difference between the two studies is due to wheat hay containing only 42% total digestible nutrients while corn stover contains 59% (22). The coculture produced higher CH_4 production than TRB in the corn stover, probably due to the volatile fatty acids production pattern (19). Cellulolytic bacteria produce acetate and hydrogen as cellulose fermentation products (11,23), and hydrogen is the substrate used by methanogenic Archaea to synthesize CH_4 (24).

The DMD percentages observed here differed from some previous studies. Those for cobra grass were higher than *in vitro* DMD values reported for sheep ruminal bacteria on two

densidad de los microorganismos presentes (18). La producción de gas en las primeras 24 h se debe a la capacidad de los inóculos BRT, CBC o cocultivo para fermentar el contenido celular. La producción de gas del cocultivo a partir de las 24 h en el pasto cobra se explica por la capacidad de las bacterias celulolíticas para degradar la celulosa y se relacionó con la producción de gas en comparación con lo observado en las BRT. En contraste, la producción de gas no presentó diferencias entre BRT y cocultivo ($p > 0.05$) en el rastrojo de maíz a partir de las 48 h, lo cual se atribuye al tipo de nutrientes que lo componen (Tabla 1). Las diferencias en la producción de gas entre el cocultivo y el BRT en los sustratos son debido a que el rastrojo de maíz contiene alrededor ocho y diez puntos porcentuales más de fibra detergente neutro y hemicelulosa que el pasto cobra cuando se cosecha a 56 d de rebrote, respectivamente (Tabla 1). Lo anterior se relaciona con el envejecimiento de la célula vegetal y cambios en la composición de la pared celular, donde la celulosa se mezcla con hemicelulosa y lignina (19). Resultados inferiores a los observados por el cocultivo a 48 h de fermentación en el presente estudio fueron publicados por Bedoya-Mazo et al (20), quienes reportaron producciones de 152 y 167 mL de gas g^{-1} MS en pasto *Brachiaria decumbens* inoculado con fluido ruminal bufalino y bovino a las 48 h, respectivamente.

Las diferencias en la producción de CH_4 (Tabla 3) se deben al contenido de carbohidratos de los sustratos (Tabla 1) (19,23) y tipos de inóculo (18). Calabrò et al (21) usaron fluido ruminal de búfalos de agua como inóculo para fermentar paja de trigo y reportaron 33.1 mL de $CH_4 g^{-1}$ MS a las 120 h de incubación; valor inferior a lo producido por los cocultivos y BRT a las 72 h en ambos sustratos del presente estudio porque la paja de trigo contiene 42% de nutrientes digestibles totales (22) y el rastrojo de maíz 59% (22). En el rastrojo de maíz, el cocultivo mostró mayor producción de CH_4 que las BRT, probablemente por el patrón de producción de ácidos grasos volátiles (19); ya que, las bacterias celulolíticas producen acetato e hidrógeno como producto de la fermentación de celulosa (11,23) y el hidrógeno es un sustrato usado por las arqueas metanogénicas para sintetizar CH_4 (24).

Medjekal et al (25) reportaron 55.9 y 54.0% de DMS *in vitro* de *Nigella sativa* y *Rosmarinus officinalis*, respectivamente, inoculados con bacterias ruminales de ovejas. Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta (23) reportaron 37.30 y 58.2% de DMS de rastrojo de maíz inoculado con un CBC y cocultivo (CBC y BRT) obtenido de una vaca Jersey, respectivamente. Estos resultados contrastan con lo obtenido en el presente trabajo; los valores de Medjekal et al (25) son inferiores a lo obtenido en pasto cobra y los resultados de Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta (23) son

substrates: 55.9% for *Nigella sativa* and 54.0% for *Rosmarinus officinalis* (25). However, they were lower than values reported for CBC and similar to those for coculturas (23). In a study using rice hay, NDFD values were 78.4% for buffalo TRB and 71.6% for cattle TRB, with no differences between inocula. This is similar to the lack of difference observed here between TRB and the cocultura in both the cobra grass and corn stover. The degradation percentages produced by CBC in the evaluated substrates can be attributed to its need to interact with microorganisms via nutritional interdependence and/or cross-feeding (26), as well as catabolic repression from the presence of glucose and other compounds in the medium, which inhibit enzymatic synthesis (27).

Due to the type of cellulolytic activity in the rumen, fermentation of the structural carbohydrates in cobra grass and corn stover does not change pH (28). The present results support this conclusion (Table 4). Ruminant bacteria, and particularly cellulolytic bacteria, require pH levels near neutral to function correctly (23), because their enzymatic activity is inhibited at levels below 6.0 (29).

The bacteria populations documented in the present results (Table 4) are higher than the 10^8 bacteria mL^{-1} reported for a lyophilized cellulolytic consortium without preservatives (11), and a buffalo and cattle inoculum used to ferment fibrous compounds (2). Variations in bacteria populations are caused by the intraruminal microorganism dynamic, and characterized based on fermented nutrient type (8), and pH and $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration (30). Medium $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration influences substrate CP content and degradability (2). However, $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration in the interactions between treatments and substrates did not differ ($p > 0.05$) between substrates (Table 4) even though CP content in the cobra grass and corn stover differed by four percent (Table 1). The $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations and CP contents were higher than reported for ruminal fluid from water buffaloes fed rice hay: 5.5 mg dL^{-1} $\text{NH}_3\text{-N}$ and $92 \text{ g Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ CP (2). Concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ are believed to be directly related to microbial populations since variations in ruminal bacteria depend on $\text{NH}_3\text{-N}$ content (29). However, this relationship was not observed in the present data since the higher bacteria counts did not coincide with higher $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations (Table 4). Differences in $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration and bacteria count influence each treatment's capacity to degrade substrates and the efficiency of microbial nitrogen synthesis (2).

superiores entre CBC y similares entre cocultivos. Chanthakhoun et al (2) reportaron DFDN de 78.4 y 71.6% en paja de arroz inoculada con BRT de búfalo y BRT bovino, concluyendo que no había diferencias entre inóculos. Esto es similar a lo obtenido en el presente estudio entre las BRT y cocultivo, tanto en el pasto cobra como en el rastrojo de maíz. Los porcentajes de degradación que mostró el CBC en los sustratos evaluados se atribuye a su necesidad de interactuar con otros microorganismos mediante interdependencia alimentaria y/o alimentación cruzada (26) y la capacidad de represión catabólica por la presencia de glucosa u otros compuestos en el medio, inhibiendo la síntesis enzimática (27).

La fermentación de carbohidratos estructurales presentes en el pasto cobra y rastrojo de maíz en rumen no propicia cambios de pH por el tipo de actividad celulolítica que se presenta (28), y es congruente con lo observado en el presente estudio (Tabla 4). Así, las bacterias ruminales, específicamente las celulolíticas requieren de pH cercanos a la neutralidad para su correcto funcionamiento (23); ya que, en pH inferiores a 6.0 se inhibe su actividad enzimática (29).

La población de bacterias determinada en el presente estudio (Tabla 4) fue mayor a 10^8 bacterias mL^{-1} reportado para de un consorcio bacteriano celulolítico liofilizado sin preservador (11) y al inóculo de búfalo y bovino usado por Chanthakhoun et al (2) para fermentar compuestos fibrosos. Estas variaciones son consecuencia de la dinámica en las poblaciones de microorganismos en el rumen y se caracteriza con base al tipo de nutriente fermentado (8), pH y concentración de N-NH_3 (30). La concentración de N-NH_3 en el medio se asume al contenido y degradabilidad de la PC que contienen los sustratos (2). Sin embargo, la concentración del N-NH_3 en las interacciones entre tratamientos y sustratos evaluados (Tabla 4) no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sustratos, aunque el pasto cobra y el rastrojo de maíz muestran cuatro unidades porcentuales de diferencia en el contenido de PC (Tabla 1). Chanthakhoun et al (2) reportaron 5.5 mg dL^{-1} de N-NH_3 ruminal en búfalos alimentados con paja de arroz y $92 \text{ g Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de PC, valores inferiores que en el presente estudio en todas las interacciones entre tratamientos y sustrato (Tabla 4). El N-NH_3 tiene una relación directa con la población microbiana, ya que el aumento o reducción de las bacterias ruminales depende del contenido de N-NH_3 (29) y en el presente estudio no se observó dicha relación porque los mayores conteos de bacterias no coincidieron con las mayores concentraciones de N-NH_3 (Tabla 4). Las diferencias en la concentración de N-NH_3 y conteo bacteriano se asume a la capacidad de cada tratamiento en la degradación del sustrato y a la eficiencia de síntesis de nitrógeno microbiano (2).

The gas production, and dry matter and neutral detergent fiber degradation values for the studied water buffalo cellulolytic bacteria consortia suggest that, when cocultured with bovine ruminal bacteria, they may be an alternative for improving structural carbohydrate fermentation in cobra grass. Coculture did not improve fermentation in the corn stover due to differences between the substrates used to produce the isolated cellulolytic consortium and stover proximate chemical composition. The cellulolytic bacteria consortia studied here require further *in situ* and *in vivo* evaluations to determine their potential use in producing a cellulolytic probiotic.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The research reported here was financed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología via project 253275 (Ciencia Básica CB-2015-01): "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".

La producción de gas, degradación de materia seca y de la fibra detergente neutra permite inferir que los consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos de búfalos de agua presentan una alternativa para mejorar la fermentación de carbohidratos estructurales del pasto cobra cuando se cocultivan con bacterias ruminales bovinas. Sin embargo, estos cocultivos no mejoran la fermentación de rastrojo de maíz por las diferencias entre los sustratos usados para obtener el consorcio celulolítico aislado y la composición química proximal del rastrojo de maíz. Los consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos en el presente estudio requieren evaluaciones posteriores *in situ* e *in vivo* para determinar si tienen su potencial para elaborar un probiótico celulolítico.

Conflicto de intereses

Los autores del presente estudio declaramos que no existe conflicto de intereses

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto 253275 dentro de la convocatoria de Ciencia Básica CB-2015-01 "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".

REFERENCES

1. Malherbe S, y Cloete TE. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2002; 1(2):105-114.
2. Chanthakhoun V, Wanapat M, Kongmun P, and Cherdthong A. Comparison of ruminal fermentation characteristics and microbial population in swamp buffalo and cattle. *Liv Sci*. 2012; 143(2-3):172-176.
3. Lin B, Henderson G, Zou C, Cox F, Liang X, Janssen PH et al. Characterization of the rumen microbial community composition of buffalo breeds consuming diets typical of dairy production systems in Southern China. *Anim Feed Sci Technol* 2015; 207:75-84.
4. Franzolin R, Rosales FP, and Soares WVB. Effect of two energy and two protein sources in sugar cane based diets on the population of rumen ciliate protozoa in water buffalo (*Bubalus bubalis*) and zebu cattle (*Bos taurus indicus*). *Reprod Nutr Dev*. 2006; 46(Suppl 1):S15
5. Puppo S, Bartocci S, Terramocchia S, and Grandoni F. Rumen microbial counts and *in vivo* digestibility in buffaloes and cattle given different diets. *Anim Sci*. 2002; 75(2):323-329.
6. Bader J, Mast-Gerlach E, Popovic MK, Bajpai R, and Stahl U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *J Appl Microbiol*. 2010; 109(2):371-387.
7. Sabra WD, Tjahjajari D, and Zeng A. Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Eng Life Sci*. 2010; 10(5):407-421.
8. Davey ME, and O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(4):847-867.

9. INEGI. Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (Acceso el 20 de junio de 2018). URL disponible en: www.beta.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=12023.
10. NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. SENASICA, México. 22 de agosto de 2001. URL disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999>.
11. Sánchez-Santillán P, Cobos-Peralta MA, Hernández-Sánchez D, Alvarado AI, Espinosa-Victoria D, Herrera-Haro JG. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia*. 2016; 50(5):575-582.
12. AOAC. Official Methods of Analysis (18th Ed) Association of official analytical chemist: Arlington, VA, USA; 2007.
13. Van Soest PJ, Robertson JB, and Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 1991; 74(10):3583-3597.
14. Hernández-Morales J, Sánchez-Santillán P, Torres-Salado N, Herrera-Pérez J, Rojas-García AR, Reyes-Vázquez I, Mendoza-Núñez MA. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Rev Mex Cienc Pec*. 2018; 9(01):105-120.
15. Stolaroff JK, Keit DW, and Lowry GV. Carbon dioxide capture from atmospheric air using sodium hydroxide spray. *Environ Sci Technol*. 2008; 42(8):2728-2735.
16. McCullough H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*. 1967;17(2):297-304.
17. SAS. Institute Inc. Statistical Analysis System, SAS, SAS Inst., Cary, NC: 2011.
18. Zicarelli F, Calabrò S, Cutrignelli MI, Infascelli F, Tudisco R, Bovera F et al. *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *J Sci Food Agric*. 2011; 91(7):1213-1221.
19. Gándara L, Borrajo CI, Fernández JA, Mercedes PM. Efecto de la fertilización nitrogenada y la edad del rebrote sobre el valor nutritivo de *Brachiaria brizantha* cv. "Marandú". *FCA Uncuyo*. 2017; 49(1):69-77.
20. Bedoya-Mazo S, Noguera RR, Posada SL. Effect of ruminal inoculum of buffalo, cattle and goat on dry matter degradation and methane production *in vitro*. *Livestock Research for Rural Development*. 2016; 28:5.
21. Calabrò S, Infascelli F, Tudisco R, Musco N, Grossi M, Monastra G et al. Estimation of *In vitro* methane production in buffalo and cow. *Buffalo Bull*. 2013; 32(2):924-927.
22. NRC. Nutrient requirements of small ruminants sheep, goats, cervios, and new world camelidos, The National Academies Press: USA: 2007.
23. Sánchez-Santillán P, y Cobos-Peralta MA. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. *Agrociencia*. 2016; 50(5):565-574.
24. Araujo RC, Pires AV, Mourão GB, Abdalla AL, Sallem AMA. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Anim Feed Sci Technol*. 2011; 166-167:155-162.
25. Medjekal S, Bodas R, Bousseboua H, and López S. Evaluation of three medicinal plants for methane production potential fiber digestion and rumen fermentation *in vitro*. *Energy Procedia*. 2017; 119:632-641.
26. Cobos PMA. Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Ed. Trillas: México; 2007.
27. Thurston B, Dawson KA, and Strobel HJ. Pentose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(4):1087-1092.
28. Christensen RG, Eun JS, Yang SY, Min BR, MacAdam JW. *In vitro* effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) pasture on ruminal fermentation, microbial population, and methane production. *Prof Anim Sci*. 2016; 33(4):451-460.
29. Chen Y, Penner GB, Li M, Oba M, and Guan LG. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a highgrain diet. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(16): 5770-5781.
30. Wanapat M, Phesatcha K, and Kang S. Rumen adaptation of swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) by high level of urea supplementation when fed on rice straw-based diet. *Trop Anim Health Prod*. 2016; 48(6): 1153-1140.