

PRODUCCIÓN DE GAS *in vitro* Y CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE CONSORCIOS BACTERIANOS CELULOLÍTICOS RUMINALES DE BÚFALA DE AGUA (*Bubalus bubalis*) Y VACA SUIZ-BU

In vitro GAS PRODUCTION AND FERMENTATIVE CHARACTERISTICS OF RUMINAL CELLULOLYTIC BACTERIAL CONSORTIA OF WATER BUFFALO (*Bubalus bubalis*) AND SUIZ-BU COW

Nicolás Torres-Salado^{1,2}, Paulino Sánchez-Santillán^{1,2*}, R. Adelaido Rojas-García¹, Isaac Almaraz-Buendía³, Jerónimo Herrera-Pérez¹, Iván Reyes-Vázquez⁴, E. Jesús Mayren-Mendoza¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero. Km 197, Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero. ²Cuerpo Académico UAGro-CA-183 "Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico" (sanchezsantillanp@gmail.com). ³Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 43600. Tulancingo, Hidalgo, México. ⁴Nutritionist in Dairy Cattle Throw Nutrition, Mexico.

RESUMEN

Los consorcios bacterianos celulolíticos (CBC) sirven como aditivos en la alimentación de rumiantes para mejorar la degradación de celulosa y hemicelulosa. El objetivo de este estudio fue determinar la producción de gas *in vitro* y las características fermentativas de CBC de búfala de agua y vaca Suiz-bu en cocultivo con bacterias ruminales de vaca Suiz-bu. El fluido ruminal de una búfala de agua y de una vaca Suiz-bu se inocularon en medios de papel Whatman® y celulosa cristalina para obtener CBC de la búfala (CBC_{buf}) y de la vaca Suiz-bu (CBC_{ceb}). El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron los inóculos: bacterias ruminales totales (BRT), CBC_{ceb}, CBC_{buf}, cocultivo_{ceb} (BRT y CBC_{ceb}) y cocultivo_{buf} (BRT y CBC_{buf}). Los biodigestores usados contenían 0.5 g de pasto cobra, 45 mL de medio de cultivo y 5 mL de inóculo. La producción de gas se midió a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h y la de metano (CH₄) a las 24, 48 y 72 h. Las variables evaluadas fueron pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃), degradación de MS (DEGMS) y degradación de FDN (DEGFDN) y las bacterias se contabilizaron. CBC_{buf} y CBC_{ceb} produjeron mayor (p≤0.05) cantidad de gas y CH₄ acumulado a las 72 h, incrementaron (p≤0.05) DEGMS y DEGFDN, pero sin diferencias entre ellos (p>0.05). BRT no presentó diferencias (p>0.05) con el cocultivo_{ceb} en la DEGMS y con cocultivo_{buf} en la DEGFDN. Los inóculos con CBC no presentaron diferencias (p>0.05) en pH; además, el conteo

ABSTRACT

The cellulolytic bacterial consortia (CBC) serve as additives in the feed of ruminants to improve the degradation of cellulose and hemicellulose. The objective of the present study was to determine the *in vitro* production of gas and the fermentative characteristics of CBC of water buffalo and Suiz-bu cow in coculture with ruminal bacteria of Suiz-bu cow. The ruminal fluid of a water buffalo and of a Suiz-bu cow were inoculated in media of crystalline cellulose Whatman® paper to obtain CBC of the buffalo cow (CBC_{buf}) and of the Suiz-bu cow (CBC_{ceb}). The experimental design was completely randomized and the treatments were the inocula: total ruminal bacteria (TRB), CBC_{ceb}, CBC_{buf}, coculture_{ceb} (TRB and CBC_{ceb}) and coculture_{buf} (TRB and CBC_{buf}). The biodigesters contained 0.5 g of cobra grass, 45 mL of culture medium and 5 mL of inoculum. Gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h, and that of methane (CH₄) at 24, 48 and 72 h. The variables evaluated were pH, ammonia nitrogen (N-NH₃), dry matter degradation (DEGDM) and NDF degradation (DEGNDF), and the bacteria were counted. CBC_{buf} and CBC_{ceb} produced a higher amount (p≤0.05) of gas and CH₄ accumulated at 72 h, and increased (p≤0.05) DEGDM and DEGNDF, but without differences between them (p>0.05). TRB did not present differences (p>0.05) with the coculture_{ceb} in the DEGDM and with coculture_{buf} in the DEGNDF. The inocula with CBC did not present differences (p>0.05) in pH. Furthermore, the bacteria count and N-NH₃ were similar in the media evaluated with different source of inoculum (p>0.05). The cellulolytic bacterial consortia

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.
Recibido: noviembre, 2017. Aprobado: junio, 2018.
Publicado como ARTÍCULO en Agrocienza 53: 145-159. 2019.

de bacterias y N-NH_3 fue similar en los medios evaluados con diferente fuente de inóculo ($p>0.05$). Los consorcios bacterianos celulolíticos incrementan la producción de gas, CH_4 , degradación de MS y de FDN cuando se adicionan a las bacterias ruminales en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: forrajes, cocultivos, bacterias ruminales, *in vitro*, rumiantes.

INTRODUCCIÓN

Los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) están adaptados a climas tropicales y al consumo de forraje. Los búfalos rumian 50 % más que los bovinos (Lin *et al.*, 2015) y son más eficientes en el uso de los carbohidratos estructurales de los forrajes (Calabrò *et al.*, 2008; Khejornsart *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015). Esto se refleja en un incremento de digestibilidad de la materia orgánica en alfalfa (9.96 %) y ensilado de maíz (4.43 %) en pruebas *in vitro*, además de tasas de degradación de la proteína más altas en el rumen (Calabrò *et al.*, 2008). Las diferencias pueden deberse a que los búfalos tienen más bacterias celulolíticas y protozoarios ciliados que los bovinos (Calabrò *et al.*, 2008; Khejornsart *et al.*, 2011; Chanthakhoun *et al.*, 2012). Por ejemplo, Franzolin *et al.* (2006) reportaron diferencias entre la población de protozoarios de búfalos y bovinos, principalmente en la subfamilia *Diplodiniinae* (28.6 vs. 1.4 %) y *Epidinium* (5.3 vs. 0.0 %), respectivamente; Jabari *et al.* (2014) indicaron que el número de *Diplodinium* en búfalo es mayor que en bovinos (41.27 vs. 35.7 %), así como la población total de protozoarios (3.68×10^5 vs. 2.18×10^5 mL^{-1}). Además, Puppo *et al.* (2002) informaron que la población de bacterias en búfalos es $0.60 \log_{10}$ células g^{-1} mayor que en contenido ruminal seco de bovinos. Así, la digestión de la fibra en rumen del búfalo genera interés científico por la manipulación de estos microorganismos (Lin *et al.*, 2015).

La eficiencia de la degradación de sustratos celulósicos en rumen se debe a las enzimas producidas por bacterias y hongos. Las bacterias celulolíticas aisladas del rumen y cultivadas en laboratorio son *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* (Khejornsart *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2017a). Pero análisis metagenómicos basados en RNAr 16S indican que estas bacterias representan sólo 5 % de

increased production of gas, CH_4 , DM degradation and NDF degradation when they were added to the ruminal bacteria under *in vitro* conditions.

Key words: forage, cocultures, ruminal bacteria, *in vitro*, ruminants.

INTRODUCTION

Water buffalo (*Bubalus bubalis*) are adapted to tropical climates and to the consumption of forage. Buffalos ruminate 50 % more than bovines (Lin *et al.*, 2015) and are more efficient in the use of structural carbohydrates in forage (Calabrò *et al.*, 2008; Khejornsart *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015). This is reflected in an increment in digestibility of the organic matter in alfalfa (9.96 %) and maize silage (4.43 %) in *in vitro* tests, along with higher protein degradation rates in rumen (Calabrò *et al.*, 2008). The differences may be due to the fact that the buffalo have more cellulolytic bacteria and ciliated protozoa than the bovines (Calabrò *et al.*, 2008; Khejornsart *et al.*, 2011; Chanthakhoun *et al.*, 2012). For example, Franzolin *et al.* (2006) reported differences between the protozoa population of buffalos and bovines, mainly in the subfamily *Diplodiniinae* (28.6 vs. 1.4 %) and *Epidinium* (5.3 vs. 0.0 %), respectively. Jabari *et al.* (2014) indicated that the number of *Diplodinium* in buffalo is higher than in bovines (41.27 vs. 35.7 %), as well as the total population of protozoa (3.68×10^5 vs. 2.18×10^5 mL^{-1}). Furthermore, Puppo *et al.* (2002) reported that the population of bacteria in buffalo is $0.60 \log_{10}$ cells g^{-1} higher than in dry ruminal content of bovines. Thus, the digestion of the fiber in buffalo rumen generates scientific interest due to the manipulation of these microorganisms (Lin *et al.*, 2015).

The efficiency of the degradation of cellulosic substrates in rumen is due to the enzymes produced by bacteria and fungi. The cellulolytic bacteria isolated from the rumen and cultivated in the laboratory are *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* (Khejornsart *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2017a). However, metagenomic analyses based on RNAr 16S indicate that these bacteria represent only 5 % of the microorganisms of the rumen (Dai *et al.*, 2015); furthermore, bacteria of the genera *Clostridium* and

los microorganismos del rumen (Dai *et al.*, 2015); además, bacterias de los géneros *Clostridium* y *Bacteroides* también intervienen en la digestión ruminal de la fibra (Deng *et al.*, 2017a).

Los microorganismos rara vez viven aislados en la naturaleza, comúnmente coexisten en comunidades diversas y complejas denominadas consorcios (Bader *et al.*, 2010; Sabra *et al.*, 2010; Zuroff *et al.*, 2013) compuestos por múltiples especies que interactúan entre sí y con su entorno (Davey y O’toole, 2000). La comunicación dentro de los consorcios se realiza por interacciones directas célula-célula, metabolitos o señales moleculares (Brenner *et al.*, 2008; Bader *et al.*, 2010) como el quórum (Hibbing *et al.*, 2010; Bader *et al.*, 2010); además, realizan procesos fisiológicos interdependientes (Davey y O’toole, 2000) que no podría efectuar un solo microorganismo (Brenner *et al.*, 2008; Zuroff *et al.*, 2013). Los consorcios generan más de un producto y utilizan uno o varios sustratos (Sabra *et al.*, 2010), como los carbohidratos estructurales de las plantas.

Los consorcios celulolíticos pueden contribuir a la optimización de la degradación de la celulosa y hemicelulosa (Sabra *et al.*, 2010), ya que consumen los azúcares solubles liberados de la hidrólisis de la celulosa para producir ácidos orgánicos, CO₂ y H₂ (Zuroff *et al.*, 2013). Según Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta (2016) hay una heterofermentación debido a las interacciones entre un consorcio de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en cocultivo por interdependencia alimentaria y alimentación cruzada. Velez *et al.* (2017) encontraron una mejor producción de gas a las 72 h proveniente de la fermentación de un cocultivo entre un consorcio de bacterias celulolíticas combinado con bacterias ruminales que la producción de gas generada únicamente bacterias ruminales. La hipótesis de este estudio fue que los consorcios bacterianos celulolíticos mejoran la fermentación y degradación de los carbohidratos estructurales cuando se adicionan al proceso de fermentación de bacterias ruminales en pruebas *in vitro*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la producción de gas *in vitro* y las características fermentativas de consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos de una búfala de agua y una vaca Suiz-bu en cocultivo con bacterias ruminales de una vaca Suiz-bu.

Bacteroides also intervene in the ruminal digestion of the fiber (Deng *et al.*, 2017a).

Microorganisms rarely live isolated in nature, and commonly coexist in diverse and complex communities known as consortia (Bader *et al.*, 2010; Sabra *et al.*, 2010; Zuroff *et al.*, 2013) comprised of multiple species that interact among each other and their surroundings (Davey and O’Toole, 2000). Communication within the consortia is made by direct cell-cell interactions, metabolites or molecular signals (Brenner *et al.*, 2008; Bader *et al.*, 2010), such as the quorum (Hibbing *et al.*, 2010; Bader *et al.*, 2010); furthermore, they carry out interdependent physiological processes (Davey and O’Toole, 2000) that could not be performed by a single microorganism (Brenner *et al.*, 2008; Zuroff *et al.*, 2013). The consortia generate more than one product and utilize one or various substrates (Sabra *et al.*, 2010), such as the structural carbohydrates of the plants.

The cellulolytic consortia can contribute to optimize the degradation of the cellulose and hemicellulose (Sabra *et al.*, 2010), given that they consume the soluble sugars released from the hydrolysis of the cellulose to produce organic acids, CO₂ and H₂ (Zuroff *et al.*, 2013). According to Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta (2016), there is a heterofermentation due to the interactions between a consortium of reactivated cellulolytic bacteria and total ruminal bacteria in coculture through alimentary interdependence and crossed feeding. Velez *et al.* (2017) found better gas production at 72 h from the fermentation of a coculture among a consortium of cellulolytic bacteria combined with ruminal bacteria, than the production of gas generated only by ruminal bacteria. The hypothesis of this study was that the cellulolytic bacterial consortia improve the fermentation and degradation of the structural carbohydrates when they are added to the fermentation process of ruminal bacteria in *in vitro* tests. Therefore, the objective of this study was to determine the *in vitro* gas production and the fermentative characteristics of cellulolytic bacterial consortia obtained from a water buffalo and a Suiz-bu cow in coculture with ruminal bacteria from a Suiz-bu cow.

MATERIALES Y MÉTODOS

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 (UAGro), ubicada en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

Medio de cultivo con base en fluido ruminal (FR)

El medio de cultivo FR contenía: 30 mL de fluido ruminal clarificado (líquido ruminal fresco centrifugado a 12 857 g por 10 min y esterilizado 15 min a 121 °C y 15 psi), 5 mL de solución mineral I [K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich®), 6 g en 1000 mL de agua destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich®) + 6 g $(NH_4)_2SO_4$ (Merck®) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich®) + 2.45 g $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich®) + 1.6 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich®) en 1000 mL de agua destilada], 0.1 mL de resarzurina al 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 NaOH (Meyer®) 2N + 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (Meyer®) aforado en 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución al 8 % de Na_2CO_3 (Merck®) y 52.6 mL de agua destilada. El medio de cultivo se esterilizó 15 min en una autoclave (All American® 1941X, USA) a 121 °C y 15 psi según la metodología de Cobos y Yokoyama (1995) modificada por Sánchez-Santillán *et al.* (2016) y Cobos-Peralta *et al.* (2018).

Consortios de bacterias celulolíticas (CBC)

El fluido ruminal se obtuvo de una búfala de agua (*Bubalus bubalis*) y de una vaca Suiz-bu mediante el uso de una sonda esofágica. La búfala y la vaca se manejaron de acuerdo con el reglamento interno de bioética y bienestar de la UAGro con fundamento en las normas oficiales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-051-ZOO-1995). Los fluidos recolectados se centrifugaron a 1,157 g por 3 min en una centrífuga (Metrix Velocity 14, USA). La búfala y la vaca pastaron en praderas sin fertilizar de pasto pangola (*Digitaria decumbes*) con una edad de rebrote de 56 d antes de recolectar las muestras. En una campana de bioseguridad con purificador de Clase II (Labconco®, USA) provista de rayos ultravioleta, los sobrenadantes se recuperaron y se utilizaron como inóculos. La obtención del consorcio bacteriano celulolítico (CBC) se realizó con el mismo procedimiento para ambas fuentes de líquido ruminal. Nueve mL de medio FR estéril se agregaron a tubos de ensaye (Pirex®, México; 18x150 mm) que contenían una tira de papel Whatman® (3x30 mm) estéril, bajo flujo de CO_2 , y se mantuvieron 24 h a 39 °C en una incubadora (Ecoshel 9082, México) para verificar esterilidad. Un

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Animal Nutrition Laboratory of the Department of Veterinary Medicine and Animal Science No. 2 of the Autonomous University of Guerrero (UAGro), municipality of Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico.

Culture medium based on ruminal fluid (RF)

The culture medium RF contained: 30 mL of clarified ruminal fluid (fresh ruminal liquid centrifuged at 12 857 g for 10 min and sterilized 15 min at 121 °C and 15 psi), 5 mL of mineral solution I [K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich®), 6 g in 1000 mL of distilled water], 5 mL of mineral solution II [6 g KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich®) + 6 g $(NH_4)_2SO_4$ (Merck®) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich®) + 2.45 g $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich®) + 1.6 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich®) in 1000 mL of distilled water], 0.1 mL of resarzurine at 0.1 % (Sigma-Aldrich®), 0.2 g of soy peptone (Merck®), 0.1 g of yeast extract (Sigma-Aldrich®), 2 mL of cysteine-sulfide solution [2.5 g L-cysteine (Sigma-Aldrich®) in 15 mL of NaOH (Meyer®) 2n + 2.5 g of $Na_2S \cdot 9H_2O$ (Meyer®) calibrated in 100 mL of distilled water], 5 mL of solution at 8 % of Na_2CO_3 (Merck®) and 52.6 mL of distilled water. The culture medium was sterilized 15 min in an autoclave (All American® 1941X, USA) at 121 °C and 15 psi according to the methodology of Cobos and Yokoyama (1995), modified by Sánchez-Santillán *et al.* (2016) and Cobos-Peralta *et al.* (2018).

Consortia of cellulolytic bacteria (CBC)

The ruminal fluid was obtained from a water buffalo (*Bubalus bubalis*) and from a Suiz-bu cow using an esophageal probe. The buffalo and the cow were managed according to the internal rules of bioethics and well-being of the UAGro based on the official norms (NOM-062-ZOO-1999 and NOM-051-ZOO-1995). The fluids collected were centrifuged at 1157 g for 3 min in a centrifuge (Metrix Velocity 14, USA). The buffalo and the cow grazed unfertilized pastures of pangola grass (*Digitaria decumbes*) with a regrowth age of 56 d prior to collecting the samples. In a biosafety hood with Class II purifier (Labconco®, USA) with ultraviolet rays, the supernatants were recovered and utilized as inocula. The cellulolytic bacterial consortia (CBC) was obtained with the same procedure for both sources of ruminal liquid. Nine mL of sterile FR medium were added to test tubes (Pirex®, Mexico; 18 x 150 mm) that contained a strip of sterile Whatman® paper (3 x 30 mm), under a flow of CO_2 , and were maintained 24 h at 39 °C in an incubator (Ecoshel 9082, Mexico) to verify sterility. A sterile tube was inoculated with 1 mL of inoculus and maintained at 39 °C, until the Whatman® paper

tubo estéril se inoculó con 1 mL de inóculo y se mantuvo a 39 °C, hasta observarse la degradación del papel Whatman®. En otro tubo estéril se transfirió 1 mL de medio inoculado y se incubó a 39 °C hasta degradar el papel Whatman®. Tres transferencias se realizaron para obtener un inóculo A de cada especie. Nueve mL de medio FR estéril se agregaron a tubos (18x150 mm) con 0.05 g de celulosa cristalina (Sigma-Aldrich®) estéril, bajo flujo de CO₂, y en una incubadora se mantuvieron 24 h a 39 °C para verificar esterilidad. En un tubo estéril se agregó 1 mL de inóculo A y se mantuvo 72 h a 39 °C. En otro tubo estéril se transfirió 1 mL de medio inoculado y se incubó 72 h a 39 °C. Cinco transferencias seriadas se realizaron para obtener un consorcio de bacterias celulolíticas de cada especie con capacidad para degradar la celulosa del papel Whatman® y de la celulosa cristalina.

Tratamientos

Los tratamientos fueron los tipos de inóculo. 1) BRT: 5 mL de bacterias ruminales totales obtenidas del fluido ruminal de una vaca Suiz-bu, la cual pastó en praderas de pasto pangola; antes de tomar la muestra de fluido ruminal se centrifugó 3 min a 1157 g para precipitar protozoarios y partículas de fibra. 2) CBC_{ceb}: 5 mL de un consorcio de bacterias celulolíticas obtenidas de una vaca Suiz-bu, el cual creció en medio FR con celobiosa (0.2 g 100 mL⁻¹ medio; Sigma-Aldrich®). 3) CBC_{buf}: 5 mL de un consorcio de bacterias celulolíticas obtenidas de una búfala de agua, el cual creció en medio FR con celobiosa. 4) Cocultivo_{ceb}: 5 mL de BRT y 5 mL de CBC_{ceb}. 5) Cocultivo_{buf}: 5 mL de BRT y 5 mL de CBC_{buf}. En los cocultivos de BRT, CBC_{ceb} y CBC_{buf} se determinó la cantidad de bacterias totales usando el conteo directo en una cámara Petroff-Hausser (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA). Para el conteo se usó un microscopio (BX31, Olympus, USA) a una magnificación de 1000 (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016) y la concentración bacteriana se calculó con la fórmula: cantidad de bacterias = (promedio) (factor de dilución, 2X10⁷).

Sustrato

El pasto cobra (*Brachiaria hibrido* CV. CIAT BR02/1794) se cosechó a los 56 d de rebrote y se deshidrató a 60 °C hasta peso constante en una estufa (Felisa® FE-293A, México). Luego, el pasto se molió con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA). La composición bromatológica del pasto cobra fue 7.5 % de proteína cruda, 69.05 % de fibra detergente neutra, 47.96 % de fibra detergente ácida y 12.15 % de cenizas.

degraded. In another sterile tube 1 mL of inoculated medium was transferred and incubated at 39 °C until the Whatman® paper degraded. Three transfers were made to obtain an inoculus A of each species. Nine mL of sterile FR medium were added to tubes (18 x 150 mm) with 0.05 g of sterile crystalline cellulose (Sigma-Aldrich®), under a flow of CO₂, and were maintained 24 h in an incubator at 39 °C to verify sterility. In a sterile tube 1 mL of inoculus A was added and maintained 72 h at 39 °C. In another sterile tube 1 mL of inoculated medium was transferred and incubated 72 h at 39 °C. Five serial transfers were made to obtain a consortium of cellulolytic bacteria of each species with capacity to degrade the cellulose of the Whatman® paper and of the crystalline cellulose.

Treatments

The treatments were the types of inoculus: 1) TRB: 5 mL of total ruminal bacteria obtained from the ruminal fluid from a Suiz-bu cow grazing in pangola grass pastures before obtaining the sample of ruminal fluid, which was centrifuged 3 min at 1157 g to precipitate protozoa and fiber particles. 2) CBC_{ceb}: 5 mL of a cellulolytic bacteria consortium obtained from a Suiz-bu cow, which grew in FR culture medium with cellulose (0.2 g 100 mL⁻¹ medium; Sigma-Aldrich®). 3) CBC_{buf}: 5 mL of a cellulolytic bacteria consortium obtained from a water buffalo, which grew in FR medium with cellobiose. 4) Coculture_{ceb}: 5 mL of TRB and 5 mL of CBC_{buf}. In the cocultures of TRB, CBC_{ceb} and CBC_{buf} the amount of total bacteria was determined using direct count with a Petroff-Hausser camera (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA). A microscope (BX31, Olympus, USA) was used for the count at a magnification of 1000 (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016) and the bacterial concentration was calculated with the formula: amount of bacteria = (average) (dilution factor, 2x10⁷).

Substrate

The cobra grass (*Brachiaria hibrido* CV. CIAT BR02/1794) was harvested at 56 d of regrowth and dehydrated at 60 °C until constant weight in an oven (Felisa® FE-293A, Mexico). Next, the grass was ground with a 1 mm crib in a Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA). The bromatological composition of the cobra grass was 7.5 % crude protein, 69.05 % neutral detergent fiber, 47.96 % acid detergent fiber and 12.15 % ash.

Test of *in vitro* gas production

In sterilized serological vials (120 mL) 0.5 g of cobra grass and 45 mL of FR medium were added. All of the vials were

Prueba de producción de gas *in vitro*

En viales serológicos (120 mL) se agregaron 0.5 g de pasto cobra y 45 mL de medio FR previamente esterilizados. Todos los viales se mantuvieron en condiciones anaeróbicas con CO₂, se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno (20 mm de diámetro) y con un arillo de aluminio, por lo que cada vial se consideró un biodigestor. Cinco biodigestores se inocularon con BRT, CBC_{ceb}, CBC_{buf}, cocultivo_{ceb} o cocultivo_{buf} y se incubaron 72 h a 39 °C. La producción de gas de los biodigestores se midió por el desplazamiento del émbolo de una jeringa de vidrio (50 mL; BD Yale®, Brasil) a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h.

La producción de metano (CH₄) se midió con 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 biodigestor 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 descrita por Stolaroff *et al.* (2008). La producción de CH₄ se tomó como los mililitros desplazados de solución NaOH (2N) a las 24, 48 y 72 h; ya que, el CO₂ reacciona con el NaOH formando Na₂CO₃ (Prada-Matiz y Cortés-Castillo, 2011).

Características fermentativas

Al terminar la incubación se midió: pH con potenciómetro (Hanna® HI2211, Italia; calibración: pH 7 y 4); conteo de bacterias totales usando una cámara Petroff-Hausser (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016); concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) al mezclar 1 mL del medio contenido con 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % (Meyer®; proporción 4:1) y se centrifugó 3500 g por 25 min. El sobrenadante se recuperó en viales de 2 mL; 20 µL de este sobrenadante se mezclaron 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 1 L 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 en 1 L de agua destilada]. Las muestras se mantuvieron a 37 °C por 30 min en baño maría (Shel Lab® 1227, USA), se adicionaron 5 mL de agua destilada para diluir las muestras, se agitaron con un vórtex (Genie 2 G-560, USA) y se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway® 6850, USA) calibrado con un método (r² = 0.9994) de concentración de nitrógeno amoniacal, según McCullough (1967).

La muestra residual del biodigestor se filtró en bolsas ANKOM (ANKOM® Technology) a peso constante. Las bolsas con muestra se secaron 24 h a 60 °C en una estufa (Felisa® FE-

maintained under anaerobic conditions with CO₂, they were hermetically sealed with a neoprene stopper (20 mm diameter) and with an aluminum ring; thus each vial was considered a biodigester. Five biodigesters were inoculated with TRB, CBC_{ceb}, CBC_{buf}, coculture_{ceb} or coculture_{buf} and incubated 72 h at 39 °C. Gas production of the biodigesters was measured by the displacement of the plunger of a glass syringe (50 mL; BD Yale®, Brasil) at 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h.

Methane (CH₄) production was measured with a Taygon® hose (2.38 mm internal Ø and 45 mm length) with hypodermic needles (20 G x 32 mm) at the ends. The needles were used to couple a biodigester with a trap vial. The trap vials were filled with a solution of NaOH (2N) [80 g of NaOH (Merck®) in 1000 mL of distilled water] modified from the methodology described by Stolaroff *et al.* (2008). The production of CH₄ was taken as the milliliters displaced from the NaOH (2N) solution at 24, 48 and 72 h, given that the CO₂ reacts with the NaOH forming Na₂CO₃ (Prada-Matiz and Cortés=Castillo, 2011).

Fermentative characteristics

After incubation, the variables measured were: pH with a potentiometer (Hanna® HI2211, Italy; calibration: pH 7 and 4); total bacteria count using a Petroff-Hausser camera (Sánchez-Santillán *et al.*, 2016); concentration of ammoniacal nitrogen (N-NH₃) by mixing 1 mL of the medium contained with 0.25 mL of metaphosphoric acid at 25 % (Meyer®; ratio 4:1) and centrifuged 3,500 g for 25 min. The supernatant was recovered in vials of 2 mL; 20 µL of this supernatant were mixed with 1 mL of phenol solution [10 mg of Na₂(NO)Fe(CN)₅·H₂O (Meyer®) + 10 g of phenol crystals (Meyer®) measured in 1 L of distilled water] and 1 mL of hypochlorite solution [7.5 g of NaOH (Reasol®) + 21.3 g of Na₂HPO₄ (Meyer®) + 15 mL of hypochlorite (5 %; Reasol®) in 1 L of distilled water]. The samples were maintained 30 min at 37 °C in a double boiler (Shel Lab® 1227, USA), 5 mL of distilled water were added to dilute the samples, then agitated with a vortex (Genie 2 G-560, USA) and the absorbance was measured at 630 nm in a spectrophotometer UV-VIS (Jenway®6850, USA) calibrated with a method (r² = 0.9994) of concentration of ammoniacal nitrogen, according to McCullough (1967).

The residual sample of the biodigester was filtered in ANKOM bags (ANKOM® Technologies) to constant weight. The bags with samples were dried 24 h at 60 °C in an oven (Felisa® FE-293A, Mexico). The dry matter degradation (DEGDM) was calculated with the formula: % DEGDM = (initial sample – residual sample / initial sample) * 100 (Getachew *et al.*, 2004; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015; Hernández-Morales *et al.*, 2018). The ANKOM® bags were sealed with heat and the content of

293A, México). La degradación de la materia seca (DEGMS) se calculó con la fórmula % DEGMS = (muestra inicial – muestra residual / muestra inicial) * 100 (Getachew *et al.*, 2004; Sánchez-Santillán *et al.*, 2015; Hernández-Morales *et al.*, 2018). Las bolsas ANKOM® se sellaron con calor y se determinó el contenido de FDN con la metodología de ANKOM® Technology según Van Soest *et al.* (1991). El porcentaje de degradación de la FDN (% DEGFND) se calculó con la fórmula % DEGFND = (FDN inicial – FDN residual / FDN inicial) * 100 según Hernández-Morales *et al.* (2018).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los datos de la producción de gas y metano, pH, conteo de bacterias, nitrógeno amoniacal, degradación de la MS y degradación de FDN se analizaron con el procedimiento GLM de SAS® (SAS Institute Inc., 2011). Los valores promedio se compararon con la prueba de Tukey (p≤0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de gas *in vitro* de los cultivos microbianos mostró variación (p≤0.05) en los tiempos de fermentación evaluados (Cuadro 1). El CBC_{buf} produjo 22.5 % más gas que BRT a las 3 h; las BRT produjeron 86.8 y 111.3 % del gas producido por el cocultivo_{buf} a las 6 y 9 h de fermentación

NDF was determined with the methodology of ANKOM® Technology according to Van Soest *et al.* (1991). The percentage of degradation of the NDF (% DEGNDF) was calculated with the formula % DEGNDF = (initial NDF – residual NDF / initial NDF) * 100 according to Hernández-Morales *et al.* (2018).

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with five replications per treatment. The data of production of gas and methane, pH, bacteria count, ammoniacal nitrogen, degradation of DM and degradation of NDF were analyzed with the GLM procedure of SAS® (SAS Institute Inc., 2011). The average values were compared with the Tukey test (p≤0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro gas production of the microbial cultures showed variation (p≤0.05) in the fermentation times evaluated (Table 1). The CBC_{buf} produced 22.5 % more gas than TRB at 3 h; the TRB produced 86.8 and 111.3 % of the gas produced by the coculture_{buf} at 6 and 9 h of fermentation (p≤0.05). The TRBs produced higher (p≤0.05) gas at 12 h, but there were no differences (p≤0.05) with the cocultures at 24 h. CBC_{buf} and CBC_{bov} produced a higher (p≤0.05) amount of gas than TRB at 48 and 72 h of fermentation (p≤0.05). The variation in gas production can be attributed to the origin of

Cuadro 1. Producción de gas *in vitro* (mL g⁻¹ MS) de consorcios de bacterias celulolíticas de una búfala de agua y de una vaca Suiz-bu en cocultivo con bacterias ruminales.

Table 1. *In vitro* gas production (mL g⁻¹ DM) of cellulolytic bacterial consortia of a water buffalo and of a Suiz-bu cow in coculture with ruminal bacteria.

Inóculo	Tiempo de incubación (h)						
	3	6	9	12	24	48	72
CBC _{ceb}	56.39 ^{ab}	81.35 ^{ab}	89.83 ^{ab}	100.81 ^b	110.29 ^b	180.16 ^c	222.08 ^c
CBC _{buf}	59.32 ^a	80.75 ^{ab}	89.22 ^b	101.68 ^b	112.15 ^b	194.90 ^b	232.28 ^c
BRT	48.42 ^b	71.38 ^b	99.34 ^a	127.29 ^a	157.24 ^a	204.66 ^b	247.59 ^b
Cocultivo _{ceb}	52.47 ^{ab}	76.45 ^{ab}	91.44 ^{ab}	103.93 ^b	146.91 ^a	244.34 ^a	274.32 ^a
Cocultivo _{buf}	54.35 ^{ab}	82.27 ^a	94.74 ^{ab}	111.19 ^b	157.06 ^a	252.29 ^a	284.70 ^a
EEM	1.25	1.35	1.24	2.50	4.96	6.58	5.58

^{a,b,c} Medias con distinta letra en una columna son diferentes (p≤0.05); CBC_{ceb}=Consorcio bacteriano celulolítico de vaca Suiz-bu, concentración 9.47x10⁸ bacterias mL⁻¹; CBC_{buf}=Consorcio bacteriano celulolítico de búfala de agua, concentración 1.0x10⁹ bacterias mL⁻¹; BRT=Bacterias ruminales totales, concentración 1.29x10⁹ bacterias mL⁻¹; Cocultivo_{ceb}=CBC_{ceb} y BRT; Cocultivo_{buf}=CBC_{buf} y BRT; EEM=Error estándar de la media ♦ ^{a,b,c}Means with different letter in a column are different (p≤0.05); CBC_{ceb}=Cellulolytic bacterial consortium of Suiz-bu cow, concentration 9.47x10⁸ bacteria mL⁻¹; CBC_{buf}=Cellulolytic bacterial consortium of water buffalo, concentration 1.0 x10⁹ bacteria mL⁻¹; TRB=Total ruminal bacteria, concentration 1.29x10⁹ bacteria mL⁻¹; Coculture_{ceb}=CBC_{ceb} and TRB; Coculture_{buf}=CBC_{buf} and TRB; SEM=Standard error of the mean.

($p \leq 0.05$). Las BRT produjeron mayor ($p \leq 0.05$) gas a las 12 h, pero no hubo diferencias ($p > 0.05$) con los cocultivos a las 24 h. CBC_{buf} y CBC_{bov} produjeron mayor ($p \leq 0.05$) cantidad de gas que BRT a las 48 y 72 h de fermentación ($p \leq 0.05$). La variación en la producción de gas se puede atribuir al origen de los microorganismos (Zicarelli *et al.*, 2011) y su densidad (Bedoya-Mazo *et al.*, 2016) a la disponibilidad de nutrientes para los inóculos durante la fermentación (Elghandour *et al.*, 2016), eficiencia de uso del sustrato por los microorganismos (Noguera *et al.*, 2011), y porque la digestión de los carbohidratos produce una mezcla de componentes gaseosos como CO_2 y CH_4 (Posada *et al.*, 2006).

El comportamiento de la producción de gas acumulado de cada tratamiento en los tiempos de fermentación medidos se atribuye a la composición de la población bacteriana, ya que según el tipo de bacterias es el tipo de carbohidratos que fermentan (Anrique, 2010; Darwin *et al.*, 2018). Del inicio a las primeras 24 h de fermentación del pasto cobra, los cultivos evaluados (BRT, CBC_{ceb} , CBC_{buf} , cocultivo_{ceb}, cocultivo_{buf}) fermentaron primero los carbohidratos no estructurales (Anrique, 2010) junto con la fracción proteica (Rodríguez *et al.*, 2010). La producción de gas de los cocultivos a partir de las 48 h se relacionó con la capacidad de las bacterias celulolíticas para degradar carbohidratos estructurales (González *et al.*, 2011). Esto porque en todos los tratamientos evaluados se usó pasto cobra como único sustrato y la cantidad de proteína y carbohidratos fermentables fueron similares, implicando que los cambios observados en la cantidad de gas producido se atribuyen exclusivamente a los cocultivos evaluados (Noguera *et al.*, 2011; González *et al.*, 2011).

Calabrò *et al.* (2005) observaron una producción de gas de $133 \text{ mL g}^{-1} \text{ MO}$ a las 24 h de incubación cuando incubaron heno de pasto inoculado con fluido ruminal de búfalo, valores similares al CBC_{buf} del presente estudio; sin embargo, la producción de gas del cocultivo_{buf} fue mayor por la adición del CBC_{buf} a las BRT. Bedoya-Mazo *et al.* (2016) reportaron una producción de 162 y $157 \text{ mL g}^{-1} \text{ MS}$ de gas a las 48 h de incubación al inocular *Brachiaria decumbes* con fluido ruminal de búfalo y bovino, y estos valores son inferiores a CBC_{ceb} o CBC_{buf} de nuestro estudio. Los resultados del presente estudio son similares a los obtenidos por Vélez *et al.* (2017), quienes encontraron aumentos en la producción de

los microorganismos (Zicarelli *et al.*, 2011) y su densidad (Bedoya-Mazo *et al.*, 2016), a la disponibilidad de nutrientes para los inóculos durante la fermentación (Elghandour *et al.*, 2016), eficiencia de uso del sustrato por los microorganismos (Noguera *et al.*, 2011), and because the digestion of the carbohydrates produces a mixture of gassy components such as CO_2 and CH_4 (Posada *et al.*, 2006).

The behavior of gas production accumulated from each treatment in the fermentation times measured is attributed to the composition of the bacterial population, given that the type of bacteria determines the type of carbohydrates that ferment (Anrique, 2010; Darwin *et al.*, 2018). From the start to the first 24 h of fermentation of the cobra grass, the cultures evaluated (TRB, CBC_{ceb} , CBC_{buf} , cocultivo_{ceb}, cocultivo_{buf}) fermented, first, the non-structural carbohydrates (Anrique, 2010) along with the protein fraction (Rodríguez *et al.*, 2010). Gas production of the cocultures after 48 h was related to the capacity of the cellulolytic bacteria to degrade structural carbohydrates (González *et al.*, 2011). This is because in all of the treatments evaluated cobra grass was used as the only substrate and the amount of protein and fermentable carbohydrates were similar, implying that the changes observed in the amount of gas produced are attributed exclusively to the cocultures evaluated (Noguera *et al.*, 2011; González *et al.*, 2011).

Calabrò *et al.* (2005) observed a gas production of $133 \text{ mL g}^{-1} \text{ MO}$ at 24 h of incubation when they incubated grass hay inoculated with buffalo ruminal fluid, values similar to the CBC_{buf} of the present study. However, gas production of the cocultivo_{buf} was higher from the addition of the CBC_{buf} to the TRB. Bedoya-Mazo *et al.* (2016) reported a production of 162 and 157 mL of gas at 48 h of incubation when inoculating *Brachiaria decumbes* with ruminal fluid of buffalo and bovine, and these values are lower than CBC_{ceb} or CBC_{buf} of our study. The results of the present study are similar to those obtained by Vélez *et al.* (2017), who found increments in gas production at 72 h when they added a CBC obtained from a water buffalo to TRB, which can be attributed to the methodological conditions used in the present study (Mould *et al.*, 2005).

CBC_{ceb} and CBC_{buf} showed the lowest ($p \leq 0.05$) production of CH_4 , based on the DM incubated and the DM degraded in the times evaluated. The

gas a las 72 h al adicionar un CBC obtenido de una búfala de agua a BRT, el cual se puede atribuir a las condiciones metodológicas usadas en el presente estudio (Mould *et al.*, 2005).

CBC_{ceb} y CBC_{buf} mostraron la menor ($p \leq 0.05$) producción de CH₄, con base en la MS incubada y la MS degradada en los horarios evaluados. La producción de CH₄ a las 24 h no presentó diferencias entre BRT, cocultivo_{buf} y cocultivo_{ceb}. Sin embargo, cocultivo_{buf} y cocultivo_{ceb} mostraron mayor producción de CH₄ que BRT a las 48 y 72 h de fermentación ($p \leq 0.05$). Los tratamientos que contenían un CBC presentaron una mayor ($p \leq 0.05$) tasa de producción de CH₄ de las 24 a 48 h; en contraste, BRT mostró la mayor ($p \leq 0.05$) tasa respecto a los cocultivos entre las 48 y 72 h (Cuadro 2).

Las características bromatológicas de un producto sometido a fermentación ruminal es uno de los principales factores que influyen en la producción de CH₄ (Kumar *et al.*, 2014; Vanegas *et al.*, 2017) y la fermentación de carbohidratos estructurales por bacterias celulolíticas genera mayor producción de CH₄ (Vanegas *et al.*, 2017). La variación en la producción de CH₄ en nuestro estudio se atribuye al contenido de FDN del pasto cobra (69.05 % FDN; Calabrò *et al.*, 2013; Bedoya-Mazo *et al.*, 2016) y a las diferencias entre inóculos y patrón de producción

production of CH₄ at 24 h did not present differences among TRB, coculture_{buf} and coculture_{ceb}. However, coculture_{buf} and coculture_{ceb} showed higher production of CH₄ than TRB at 48 and 72 h of fermentation ($p \leq 0.05$). The treatments that contained a CBC presented a higher ($p \leq 0.05$) production rate of CH₄ from 24 to 48 h; in contrast, TRB showed the highest ($p \leq 0.05$) rate with respect to the cocultures between 48 and 72 h (Table 2).

The bromatological characteristics of a product subjected to ruminal fermentation is one of the principal factors that influence the production of CH₄ (Kumar *et al.*, 2014; Vanegas *et al.*, 2017) and the fermentation of structural carbohydrates by cellulolytic bacteria generates a higher production of CH₄ (Vanegas *et al.*, 2017). The variation in the production of CH₄ in our study is attributed to the NDF content of cobra grass (69.05 % NDF; Calabrò *et al.*, 2013; Bedoya-Mazo *et al.*, 2016) and to the differences between inocula and production pattern of AGV (Bedoya-Mazo *et al.*, 2016). The cellulolytic bacteria ferment the structural carbohydrates and their final product is acetate and hydrogen (Zhang *et al.*, 2015; Sánchez-Santillán *et al.*, 2016; Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta, 2016), which causes this type of bacteria to have a syntrophic relationship with the methanogens; given that they use the H₂

Cuadro 2. Producción de metano por consorcios de bacterias celulolíticas de una búfala de agua y de una vaca Suiz-bu en cocultivo con bacterias ruminales.

Table 2. Production of methane by cellulolytic bacterial consortia of a water buffalo and a Suiz-bu cow in coculture with ruminal bacteria.

Inóculo	Producción acumulada (mL g ⁻¹ MS incubada)			Producción 72 h (mL g ⁻¹ MS degradada)
	24 h	48 h	72 h	
CBC _{ceb}	14.48 ^b	28.46 ^b	35.45 ^c	57.32 ^b
CBC _{buf}	13.99 ^b	33.48 ^b	37.48 ^{bc}	56.90 ^b
BRT	22.43 ^a	32.40 ^b	42.38 ^b	61.22 ^b
Cocultivo _{ceb}	22.48 ^a	44.95 ^a	51.44 ^a	73.36 ^a
Cocultivo _{buf}	21.95 ^a	44.89 ^a	52.37 ^a	74.33 ^a
EEM	0.94	1.65	1.71	1.96

^{a,b,c}Medias con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); CBC_{ceb}=Consortio bacteriano celulolítico de vaca Suiz-bu, concentración 9.47x10⁸ bacterias mL⁻¹; CBC_{buf}=Consortio bacteriano celulolítico de búfala de agua, concentración 1.0x10⁹ bacterias mL⁻¹; BRT=Bacterias ruminales totales, concentración 1.29x10⁹ bacterias mL⁻¹; Cocultivo_{ceb}=CBC_{ceb} y BRT; Cocultivo_{buf}=CBC_{buf} y BRT; EEM=Error estándar de la media ♦
^{a,b,c}Means with different letter in a column are different ($p \leq 0.05$); CBC_{ceb}=Cellulolytic bacterial consortium of Suiz-bu cow, concentration 9.47x10⁸ bacteria mL⁻¹; CBC_{buf}=Cellulolytic bacterial consortium of water buffalo, concentration 1.0x10⁹ bacteria mL⁻¹; TRB=Total ruminal bacteria, concentration 1.29x10⁹ bacteria mL⁻¹; Coculture_{ceb}=CBC_{ceb} and TRB; Coculture_{buf}=CBC_{buf} and TRB; SEM=Standard error of the mean.

de AGV (Bedoya-Mazo *et al.*, 2016). Las bacterias celulolíticas fermentan los carbohidratos estructurales y su producto final es acetato e hidrógeno (Zhang *et al.*, 2015; Sánchez-Santillán *et al.*, 2016; Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta, 2016), lo cual propicia que este tipo de bacterias tengan una relación sintrópica con los metanógenos; ya que, estos usan el H₂ y el CO₂ como sustrato para producir CH₄ como estrategia metabólica para obtener energía (Araujo *et al.*, 2011; Noguera *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2014). La producción de CH₄ en el presente estudio no es congruente con lo señalado por Calabrò *et al.* (2013), quienes reportaron que la producción de CH₄ es menor en el fluido ruminal de búfalo que en el de bovino. Los tratamientos con un CBC en este estudio no mostraron diferencias entre especies, valores similares a los descritos por Kawashima *et al.* (2006). Lo anterior se atribuye a que los autores citados usaron BRT de las diferentes especies, mientras que en el presente estudio fueron consorcios bacterianos celulolíticos.

El CBC_{ceb} mostró menor ($p \leq 0.05$; Cuadro 3) DEGMS y DEGFND ($p \leq 0.05$) que el CBC_{buf}. Ambos cocultivos presentaron mayor DEGMS ($p \leq 0.05$), pero BRT no presentó diferencias ($p > 0.05$) con el cocultivo_{ceb}. Estos promedios son superiores a la menor degradación *in vitro* en *Nigella sativa* y *Rosmarinus officinalis* inoculados con bacterias ruminales de ovejas Merino (Medjekal *et al.*, 2017), alfalfa inoculada con *Fibrobacter succinogenes* (Grilli *et al.*, 2011) y pasto pangola inoculado con un CBC obtenido de una vaca Jersey (Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta, 2016). Lo anterior se relacionó con la especie donadora del inóculo, conformación de la población microbiana y tipo de inóculo (Bueno *et al.*, 2005; Mould *et al.*, 2005; Posada y Noguera, 2005; Abad-Guamán *et al.*, 2015), ya que esto es determinante en la degradación *in vitro* de los sustratos con alto contenido de FDN.

El CBC_{ceb} mejoró ($p \leq 0.05$) la DEGFND cuando se adicionó a BRT (cocultivo_{ceb}; Cuadro 3) y se podría potenciar el consumo de MS y la disponibilidad de energía de sustratos celulósicos (Hoffman *et al.*, 2004). Los valores de DEGFND de ambos cocultivos en el presente estudio son similares a los observados por González *et al.* (2011) pero inferiores a los reportados por Chanthakhoun *et al.* (2012), quienes reportaron una DEGFND de 60 % en la evaluación *in vitro* de una dieta para corderos que incluía 50 %

and the CO₂ as a substrate for producing CH₄ as a metabolic strategy for obtaining energy (Araujo *et al.*, 2011; Noguera *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2014). The production of CH₄ in our study is not congruent with what was indicated by Calabrò *et al.* (2013), who reported that the production of CH₄ is lower in the ruminal fluid of buffalo than with bovine. The treatments with a CBC in this study did not present differences among species, values similar to those described by Kawashima *et al.* (2006). The above is attributed to the fact that the authors cited used TRB from the different species, whereas in the present study cellulolytic bacterial consortia were used.

The CBC_{ceb} presented lower ($p \leq 0.05$; Table 3) DEGDM and DEGNDF ($p \leq 0.05$) than the CBC_{buf}. Both cocultures presented higher DEGDM ($p \leq 0.05$), but TRB did not present differences ($p > 0.05$) with the coculture_{ceb}. These averages are higher than the lower degradation *in vitro* in *Nigella sativa* and *Rosmarinus officinalis* inoculated with ruminal bacteria of Merino sheep (Medjekal *et al.*, 2017), alfalfa inoculated with *Fibrobacter succinogenes* (Grilli *et al.*, 2011) and pangola grass inoculated with a CBC obtained from a Jersey cow (Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta, 2016). The above was related to the donor species of the inoculum, conformation of the microbial population and type of inoculum (Bueno *et al.*, 2005; Mould *et al.*, 2005; Posada and Noguera, 2005; Abad-Guamán *et al.*, 2015), given that this is determinant in the *in vitro* degradation of the substrates with high FDN content.

The CBC_{ceb} improved ($p \leq 0.05$) the DEGNDF when it was added to TRB (coculture_{ceb}; Table 3) and the consumption of DM could be potentiated along with the availability of energy from cellulosic substrates (Hoffman *et al.*, 2004). The values of DEGNDF of both cocultures in the present study are similar to those observed by González *et al.* (2011) but lower than those reported by Chanthakhoun *et al.* (2012), who reported a DEGNDF of 60 % in the evaluation *in vitro* of a diet for lambs that included 50 % of pea hay (*Pisum sativum*; González *et al.*, 2011) and 78.4 and 71.6 % in rice straw (*Oryza sativa*) added with TRB inoculum from buffalo and bovine (Chanthakhoun, 2012) without differences among the inocula; these results are similar to what was obtained in our study. The degradation of the NDF is used to predict the contribution of nutrients, because during the lignification of the cell wall of

Cuadro 3. Características fermentativas *in vitro* de consorcios de bacterias celulolíticas de una búfala de agua y de una vaca Suiz-bu en cocultivo con bacterias ruminales.
Table 3. Fermentative characteristics *in vitro* of cellulolytic bacterial consortia of a water buffalo and of a Suiz-bu cow in coculture with ruminal bacteria.

Inóculo	DEGMS, %	DEGFDN, %	Bacteria, células mL ⁻¹	pH	N-NH ₃ , mg dL ⁻¹
CBC _{ceb}	61.80 ^d	55.41 ^d	1.74x10 ⁹	7.02 ^a	20.40
CBC _{buf}	65.73 ^c	59.42 ^c	1.84x10 ⁹	6.98 ^a	20.91
BRT	69.30 ^b	65.47 ^b	1.99x10 ⁹	6.91 ^b	20.16
Cocultivo _{ceb}	70.11 ^{ab}	66.94 ^a	1.93x10 ⁹	6.96 ^{ab}	22.01
Cocultivo _{buf}	70.44 ^a	66.35 ^{ab}	1.94x10 ⁹	6.97 ^a	22.60
EEM	0.760	1.049	3.31x10 ⁷	0.010	0.321

^{a,b,c,d} Medias con distinta letra en una columna son diferentes ($p \leq 0.05$); CBC_{ceb}=Consorcio bacteriano celulolítico de vaca Suiz-bu, concentración 9.47x10⁸ bacterias mL⁻¹; CBC_{buf}=Consorcio bacteriano celulolítico de búfala de agua, concentración 1.0x10⁹ bacterias mL⁻¹; BRT = Bacterias ruminales totales, concentración 1.29x10⁹ bacterias mL⁻¹; Cocultivo_{ceb}=CBC_{ceb} y BRT; Cocultivo_{buf}=CBC_{buf} y BRT; EEM=Error estándar de la media; DEGMS=Degradación de materia seca; DEGFDN=Degradación de la fibra detergente neutro; N-NH₃=Nitrógeno amoniacal. ♦ ^{a,b,c,d} Means with a different letter in a column are different ($p \leq 0.05$); CBC_{ceb}=Cellulolytic bacterial consortia of Suiz-bu cow, concentration 9.47x10⁸ bacteria mL⁻¹; CBC_{buf}=Cellulolytic bacterial consortium of water buffalo, concentration 1.0x10⁹ bacteria mL⁻¹; TRB=Total ruminal bacteria, concentration 1.29x10⁹ bacteria mL⁻¹; Coculture_{ceb}=CBC_{ceb} and TRB; Coculture_{buf}=CBC_{buf} and TRB; SEM=Standard error of the mean; DEGDM=Degradation of dry matter; DEGNDF=Degradation of neutral detergent fiber; N-NH:Ammoniacal nitrogen.

de heno de chícharo (*Pisum sativum*; González *et al.*, 2011) y 78.4 y 71.6 % en paja de arroz (*Oryza sativa*) adicionada con inóculo de BRT de búfalo y bovino (Chanthakhoun *et al.*, 2012), sin diferencias entre los inóculos; estos resultados son similares lo obtenido en el presente estudio. La degradación de la FDN se usa para predecir el aporte de nutrientes porque durante la lignificación de la pared celular de las plantas (FDN) disminuye la adherencia y la hidrólisis por las bacterias celulolíticas (Hoffman *et al.*, 2007a). Así, la degradación de la FDN sirve para estimar el contenido de energía de los forrajes y es un indicativo del consumo de materia seca, por lo cual degradaciones de FDN menores a 40 % indican afectaciones en el contenido de energía y consumo potencial de la MS (Hoffman *et al.*, 2007b).

El pH en el cultivo de BRT no mostró ($p > 0.05$) diferencias con el cocultivo_{ceb}, y los inóculos con un consorcio bacteriano celulolítico no presentaron diferencias ($p > 0.05$) en pH (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los reportados por Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta (2016) y Molina-Alcaide *et al.* (2017), quienes observaron de pH de 6.08 a 7.14. Las bacterias celulolíticas requieren de pH cercanos a la neutralidad para desarrollar su actividad enzimática (Barboza *et al.*, 2009; Anrique, 2010; Sánchez-Santillán y Cobos-Peralta, 2016), y cuando

the plants (NDF) the adhesion and hydrolysis by cellulolytic bacteria decreases (Hoffman *et al.*, 2007a). Thus, the degradation of the NDF serves to estimate the energy content of the fodder and is an indication of the consumption of dry matter; therefore, degradations of NDF lower than 40 % indicate affectations in the energy content and potential consumption of the DM (Hoffman *et al.*, 2007b).

The pH in the TRB culture did not show ($p > 0.05$) differences with the coculture_{ceb}, and the inocula with a cellulolytic bacterial consortium did not present differences ($p > 0.05$) in pH (Table 3). These results are similar to those reported by Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta (2016) and Molina-Alcaide *et al.* (2017), who observed a pH from 6.08 to 7.14. The cellulolytic bacteria require pH close to neutral to develop their enzymatic activity (Barboza *et al.*, 2009; Anrique, 2010; Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta, 2016), and when the pH is lower than 6.0 their activity is inhibited (Chen *et al.*, 2011; Ley de Coss *et al.*, 2016). The values of pH were higher than 6.9 during the fermentation of the structural carbohydrates of the cobra grass with the inocula evaluated in the present study (Christensen *et al.*, 2016), which implies the absence of the inhibitory effect of the pH in the bacterial metabolism.

el pH es inferior a 6.0 su actividad se inhibe (Chen *et al.*, 2011; Ley de Coss *et al.*, 2016). Los valores de pH fueron mayores a 6.9 durante la fermentación de los carbohidratos estructurales del pasto cobra con los inóculos evaluados en el presente estudio (Christensen *et al.*, 2016), lo cual implica la ausencia del efecto inhibitorio del pH en el metabolismo bacteriano.

La cuenta de bacterias totales y la concentración de N-NH₃ no fueron diferentes ($p > 0.05$; Cuadro 3) entre tipo de inóculos. El conteo de bacterias totales en el presente estudio fue mayor a lo reportado en un consorcio bacteriano celulolítico liofilizado sin preservador (7.21×10^8 bacterias mL⁻¹; Sánchez-Santillán *et al.*, 2016), en BRT de búfalo (3.3×10^8 bacterias mL⁻¹) y en BRT de bovino (2.8×10^8 bacterias mL⁻¹; Chanthakhoun *et al.*, 2012). La concentración del N-NH₃ depende de la degradabilidad de las fracciones nitrogenadas (Rodríguez *et al.*, 2010; Khejornsart *et al.*, 2011) y en el presente estudio no hubo cambios en la concentración de N-NH₃, ya que se usaron las mismas fuentes de PC en todos los inóculos. En contraste, Christensen *et al.* (2016) reportaron variación en el contenido de N-NH₃ (9.17 a 17.7 mg dL⁻¹) al usar pasto orchard (*Dactylis glomerata*) como sustrato y complementaron con ingredientes nitrogenados.

El proceso completo de la digestión anaerobia de la fibra requiere de una interacción compleja de microorganismos (Leschine, 1995; Deng *et al.*, 2017b) porque incluye hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis sintrópica de ácidos grasos volátiles y metanogénesis (Deng *et al.*, 2017b). Por lo tanto, los resultados en el presente estudio respecto al potencial del uso de consorcios bacterianos celulolíticos en las variables evaluadas (Cuadro 1, 2 y 3) se asume a la acción sinérgica de las bacterias para la degradación de biomasa celulósica por interdependencia alimentaria y alimentación cruzada (Sánchez-Santillán y Cobos Peralta, 2016), porque la producción de metabolitos intermedios se usan secuencialmente por bacterias estrechamente asociadas (Leng, 2014; Silva *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Las bacterias ruminales de una vaca Suiz-bu mejoraron la producción de gas, la degradación *in vitro* de la materia seca y de la fibra detergente neutra, cuando se cocultivaron con consorcios bacterianos

The total bacteria count and the concentration of N-NH₃ were not different ($p > 0.05$); Table 3) among types of inocula. The total bacteria count in the present study was higher than what was reported in a lyophilized cellulolytic bacterial consortium without preservative (7.21×10^8 bacteria mL⁻¹; Sánchez-Santillán *et al.*, 2016), in TRB of búfalo (3.3×10^8 bacteria mL⁻¹) and in TRB of bovine (2.8×10^8 bacteria L⁻¹; Chanthakhoun *et al.*, 2012). The concentration of N-NH₃ depends on the degradability of the nitrogenated fractions (Rodríguez *et al.*, 2010; Khejornsart *et al.*, 2011) and in our study there were no changes in the concentration of N-NH₃, given that the same sources of PC were used in all of the inocula. In contrast, Christensen *et al.* (2016) reported variation in the content of N-NH₃ (9.17 to 17.7 mg dL⁻¹) when they used orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrate and complemented with nitrogenated ingredients.

The complete process of anaerobic digestion of the fiber requires a complex interaction of microorganisms (Leschine, 1995; Deng *et al.*, 2017b) because it includes hydrolysis, acidogenesis, syntrophic acetogenesis of volatile fatty acids and methanogenesis (Deng *et al.*, 2017b). Therefore, the results in the present study with respect to the potential of the use of cellulolytic bacterial consortia in the variables evaluated (Tables 1, 2 and 3) are presumed to be due to the synergetic action of the bacteria for the degradation of cellulosic biomass through alimentary interdependence and crossed alimentation (Sánchez-Santillán and Cobos-Peralta, 2016), because the production of intermediary metabolites is used sequentially by closely associated bacteria (Leng, 2014; Silva *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

Ruminal bacteria from a Suiz-bu cow improved the gas production, the *in vitro* degradation of the dry matter and of the neutral detergent fiber, when they were cocultivated with cellulolytic bacterial consortia obtained from ruminal fluid. The cellulolytic bacterial consortia obtained in our study require *in situ* and *in vivo* studies to determine if they have the potential for elaborating a cellulolytic probiotic.

—End of the English version—

—*—

celulolíticos obtenidos de fluido ruminal. Los consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos en el presente estudio requieren estudios *in situ* e *in vivo* para determinar si tienen el potencial para elaborar un probiótico celulolítico.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio forma parte de los resultados del proyecto 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”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dentro de la convocatoria de Ciencia Básica CB-2015-01.

LITERATURA CITADA

- Abad-Guamán, R., M. D. Carro, R. Carabaño, y J. García. 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. Tomo I. Zaragoza, España. pp: 275-277.
- Anrique, R. G. 2010. Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono. *In: Contreras P., A., y M. Noro* (eds). Rumen: Morfofisiología, Trastornos y Modulación de la Actividad Fermentativa. 3ª ed. Valdivia, América. pp: 25-36.
- Araujo, R. C., A. V. Pires, G. B. Mourão, A. L. Abdalla, and S. M. A. Sallam. 2011. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167: 155-162.
- Bader, J., E. Mast-Gerlach, M. K. Popovic, R. Bajpai, and U. Stahl. 2010. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *J Appl. Microbiol.* 109: 371-387.
- Barboza, S. P., K. L. Parkey, and I. D. Hume. 2009. *Integrative Wildlife Nutrition*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, Germany. pp: 95-118.
- Bedoya-Mazo, S., R. R. Noguera y S. L. Posada. 2016. Efecto de la especie donadora de inóculo ruminal sobre la degradación de la materia seca y producción de metano *in vitro*. *LRRD* 28: 86. www.lrrd.org/lrrd28/5/bedo28086.html (Consulta: septiembre 2017).
- Brenner, K., L. You, and F. H. Arnold. 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26:483-489.
- Bueno, I. C. S., L. S. Sergio, C. Filho, S. P. Gobbo, H. Louvandini, D. M. S. S. Vitti, and A. L. Abdalla. 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 95-105.
- Calabrò, S., S. López, V. Piccolo, J. Dijkstra, M. S. Dhanoa, and J. France. 2005. Comparative analysis of gas production profiles obtained with buffalo and sheep ruminal fluid as the source of inoculum. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 51-65.
- Calabrò, S., G. Moniello, V. Piccolo, F. Bovera, F. Infascelli, R. Tudisco, and M. I. Cutrignelli. 2008. Rumen fermentation and degradability in buffalo and cattle using the *in vitro* gas production technique. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92: 356-362.
- Calabrò, S., F. Infascelli, R. Tudisco, N. Musco, M. Grossi, G. Monastra, and M. I. Cutrignelli. 2013. Estimation of *In vitro* methane production in buffalo and cow. *Buffalo Bull.* 32: 924-927.
- Chanthakhoun, V., M. Wanapat, P. Kongmun, and A. Cherdthong. 2012. Comparison of ruminal fermentation characteristics and microbial population in swamp buffalo and cattle. *Liv. Sci.* 143: 172-176.
- Chen, Y., G. B. Penner, M. Li, M. Oba, and L. G. Guan. 2011. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5770.
- Christensen, R. G., J. S. Eun, S. Y. Yang, B. R. Min, and J. W. MacAdam. 2016. *In vitro* effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) pasture on ruminal fermentation, microbial population, and methane production. *Prof. Anim. Sci.* 33: 451-460.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. The International Livestock Research Institute, Addis Ababa, Ethiopia. pp: 152-161.
- Cobos-Peralta, M. A., K. R. Curzaynz-Leyva, M. I. Rivas-Martínez, E. A. Santillán-Gómez, y J. R. Bárcena. 2018. Efecto *in vitro* de dietas para corderos más un suplemento de granos secos de destilería en la fermentación ruminal y emisiones de gases. *Agrociencia.* 52: 203-215.
- Dai, X., Y. Tian, J. Li, X. Su, X. Wang, S. Zhao, L. Liu, Y. Lou, D. Liu, H. Zheng, J. Wang, Z. Dong, S. Hu, and L. Huang. 2015. Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in cow rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1375-1386.
- Darwin, A. Barnes, and R. Cord-Ruwisch. 2018. *In vitro* rumen fermentation of soluble and non-soluble polymeric carbohydrates in relation to ruminal acidosis. *Ann. Microbiol.* 68 (1): 1-8.
- Davey, M. E., and G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- Deng, Y., Z. Huang, W. Ruan, M. Zhao, H. Miao, and H. Ren. 2017a. Co-inoculation of cellulolytic rumen bacteria with methanogenic sludge to enhance methanogenesis of rice straw. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 117: 224-235.
- Deng, Y., Z. Huang, M. Zhao, W. Ruan, H. Miao, and H. Ren. 2017b. Effects of co-inoculating rice straw with ruminal microbiota and anaerobic sludge: digestion performance and spatial distribution of microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 5937-5948.
- Elghandour, M. M. Y., A. E. Kholif, S. Lopez, G. D. Mendoza, N. E. Odongo, and A. Z. M. Salem. 2016. *In vitro* gas, methane and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses fed live yeasts in response to the supplementation with different yeast additives. *J. Equine Vet. Sci.* 38: 64-71.
- Franzolin, R., F. P. Rosales, W. V. B. Soares. 2006. 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. 46 (Suppl. 1) S15.
- Getachew, G. P. H. Robinson, E. J. DePeters, and S. J. Taylor. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 111: 57-71.
- González, G. U. A., M. R. González, J. G. F. Estrada, J. L. G. Bastida, N. S. Pecador, y A. Z. M. Salem. 2011. Inclusión de heno de chícharo (*Pisum sativum* L.) y producción de gas *in vitro* en dietas para corderos en crecimiento. Trop. Subtrop. Agroecosys. 14: 989-997.
- Grilli, D., S. Paez, V. Egea, M. Cerón, E. Cobos, L. Allegretti, y N. Arenas. 2011. Determinación *in vitro* de la digestibilidad de la celulosa contenida en pasturas autóctonas por una cepa de *Fibrobacter succinogenes* aislada de cabras biotipo criollo. Bioanálisis 38: 32-36.
- Hernández-Morales, J., P. Sánchez-Santillán, N. Torres-Salado, J. Herrera-Pérez, A. R. Rojas-García, I. Reyes-Vázquez, y M. A. Mendoza-Núñez. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. Rev. Mex. Cienc. Pec. 9: 105-120.
- Hibbing, M. E., C. Fuqua, M. R. Parsekand, and S. B. Peterson. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat. Rev. Microbiol. 8: 15-25.
- Hoffman, P., D. Combs, y F. E. Contreras-Govea. 2004. Uso de la digestibilidad del FDN en la formulación de raciones. Focus Forage. 6: 1-5.
- Hoffman, P. C., K. M. Lundberg, L. M. Bauman, R. D. Shaver, y F. E. Contreras-Govea. 2007a. El efecto de la madurez en la digestibilidad del FDN (fibra detergente neutro). Focus Forage. 5: 1-2.
- Hoffman, P. C., K. M. Lundberg, L. M. Bauman, R. D. Shaver, y F. E. Contreras-Govea. 2007b. Digestibilidad *in vitro* del FDN (fibra detergente neutra): el debate de 30 vs 48 horas. Universidad de Wisconsin. Focus Forage. 5: 1-4.
- Jabari, S., M. Eslami, M. Chaji, T. Mohammadabadi and M. Bojarpour. 2014. Comparison digestibility and protozoa population of Khuzestan water buffalo and Holstein cow. Vet. Res. Forum. 5: 295-300.
- Kawashima, T., W. Sumamal, P. Pholsen, R. Chaithiang, and M. Kurihara. 2006. Comparative study on energy and nitrogen metabolisms between Brahman cattle and swamp buffalo fed with low quality diet. JARQ 40: 183-188.
- Khejornart, P., M. Wanapat, and P. Rowlinson. 2011. Diversity of anaerobic fungi and rumen fermentation characteristic in swamp buffalo and beef cattle fed on different diets. Livestock Sci. 139: 230-236.
- Kumar, S., P. K. Choudhury, M. D. Carro, G. W. Griffith, S. S. Dagar, M. Puniya, S. Calabro, S. R. Ravella, T. Dhewa, R. C. Upadhyay, S. K. Sirohi, S. S. Kundu, M. Wanapat, and A. K. Puniya. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98: 31-34.
- Leng, R. A. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. Anim. Prod. Sci. 54: 519-543.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. Annu. Rev. Microbiol. 49:399-426.
- Ley de Coss, A., W. de León-de León, C. E. Guerra-Medina, C. Arce-Espino, y R. Pinto-Ruiz. 2016. Crecimiento de bacterias ruminales en un medio de cultivo a base de pasta de *Jatropha curcas* L. sin detoxificar. Agrociencia. 50: 1001-1011.
- Lin, B., G. Henderson, C. Zou, F. Cox, X. Liang, P. H. Janssen, and G. T. Attwood. 2015. Characterization of the rumen microbial community composition of buffalo breeds consuming diets typical of dairy production systems in Southern China. Anim. Feed Sci. Technol. 207: 75-84.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. Clinica Chimica Acta.17: 297-304.
- Medjekal, S., R. Bodas, H. Bousseboua, and S. López. 2017. Evaluation of three medicinal plants for methane production potential fiber digestion and rumen fermentation *in vitro*. Energy Procedia. 119: 632-641.
- Molina-Alcaide, E., M. D. Carro, M. Y. Rodela, M. R. Weisbjerg, V. Lind, and M. Novoa-Garrido. 2017. *In vitro* ruminal fermentation and methane production of different seaweed species. Anim. Feed Sci. Technol. 228: 1-12.
- Mould, F. L., K. E. Kliem, R. Morgan, and R. M. Mauricio. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124: 31-50.
- Noguera, R. R., D. M. Ortiz, y N. Gallego. 2011. Comparación de líquido ruminal vacuno y caprino como fuente de inóculo en la técnica *in vitro* de producción de gases. LRRD. 23: 225. <http://www.lrrd.org/lrrd23/11/nogu23225.htm> (Consulta: septiembre 2017).
- NOM-051-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana. Trato humanitario en la movilización de animales. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- 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.
- Posada, S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. LRRD. 17: 36. <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd17/4/posa17036.htm> (Consulta: septiembre 2017).
- Posada, S. L., R. Noguera, y D. Bolívar. 2006. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. Rev. Col. Cienc. Pec. 19: 407-414.
- Prada-Matiz, A., y C. E. Cortés-Castillo. 2011. Experiencias en la captura de los gases de combustión de la cascarilla de arroz con soluciones alcalinas. Orinoquia. 15:16-30.
- Puppo, S., S. Bartocci, S. Terramoccia and F. Grandoni. 2002. Rumen microbial counts and *in vivo* digestibility in buffaloes and cattle given different diets. Anim. Sci. 75: 323-329.
- Ramírez, J. F., S. O. Posada, R. Noguera. 2014. Ruminal methanogenesis and mitigation strategies. Rev. CES Med. Vet. Zoot. 9: 307-323.
- Rodríguez, M. C., E. Aguirre, F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, O. La O, y C. Villalobos. 2010. Producción de gas, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal *in vitro* con dietas basadas en pasto seco. Rev. Col. Cienc. Pec. 44: 251-259.
- Sabra, W. D. Dietz, D. Tjahjajari, and A. Zeng. 2010. Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. Eng. Life Sci. 10: 407-421.
- Sánchez-Santillán, P., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, E. Santellano-Estrada, y B. Alarcón-Zúñiga. 2015.

- Actividad fibrolítica y producción de gas por *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 en bagazo de caña. MVZ Córdoba 20: 4907-4916.
- Sánchez-Santillán, P., M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, A. I. Alvarado, D. Espinosa-Victoria, y J. G. Herrera-Haro. 2016. Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia* 50: 575-582.
- Sánchez-Santillán, P., y M. A. Cobos-Peralta. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. *Agrociencia* 50: 565-574.
- Silva, V., R. P. Ratti, I. K. Sakamoto, M. V. F. Andrade, and M. B. A. Varesche. 2018. Biotechnological products in batch reactors obtained from cellulose, glucose and xylose using thermophilic anaerobic consortium. *Renew. Energy*. 125: 537-545.
- SAS. Institute Inc. 2011. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. pp: 3154-3339.
- Stolaroff, J.K., D. W. Keit, and G. V. Lowry. 2008. Carbon dioxide capture from atmospheric air using sodium hydroxide spray. *Environ. Sci. Technol.* 42: 2728-2735.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Vanegas, J. L., J. González, and M. D. Carro. 2017. Influence of protein fermentation and carbohydrate source on *in vitro* methane production. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101: e288-e296.
- Velez, R. L. G., S. P. Sánchez, N. S. Torres, A. R. G. Rojas, M. A. N. Méndoza, y F. J. M. Mayren. 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.
- Zhang, J., G. Rong-Bo, Q. Yang-Ling, Q. Jiang-Tao, Y Xian-Zheng, S. Xiao-Shuang, and W. Chuan-Shui. 2015. Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresour. Technol.* 179: 306-313.
- Zicarelli, F., S. Calabrò, M. I. Cutrignelli, F. Infascelli, R. Tudisco, F. Bovera, and V. Piccolo. 2011. In vitro fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *J. Sci. Food Agric.* 91: 1213-1221.
- Zuroff, T. R., S. B. Xiques, and W. R. Curtis. 2013. Consortia-mediated bioprocessing of cellulose to ethanol with a symbiotic *Clostridium phytofermentans*/yeast co-culture. *Biotechnol. Biofuels.* 6: 59.

