

PRODUCCIÓN *in vitro* DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS REACTIVADAS Y BACTERIAS RUMINALES TOTALES EN SUSTRATOS CELULÓSICOS

In vitro PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS BY REACTIVATED CELLULOLYTIC BACTERIA AND TOTAL RUMINAL BACTERIA IN CELLULOSIC SUBSTRATE

Paulino Sánchez-Santillán^{1*}, M. Antonio Cobos-Peralta²

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero. Km 197 Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero. (sanchezsantillanp@gmail.com). ²Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km 36.5, Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, estado de México.

RESUMEN

Los métodos *in vitro* son adecuados para comparar la degradación de sustratos celulósicos y la síntesis de productos derivados de la fermentación como los ácidos grasos volátiles. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron comparar la producción de AGV de un cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas (CBC) con bacterias ruminales totales (BRT) en sustratos celulósicos y, además, evaluar la relación entre AGV y la degradación *in vitro*. El cultivo de bacterias celulolíticas se obtuvo luego de cuatro transferencias de fluido ruminal fresco en medios de cultivo y papel Whatman, y conservadas mediante liofilización. Los inóculos fueron CBC, BRT y un cocultivo (50:50) entre ambos inóculos. Los sustratos fueron alfalfa, rastrojo de maíz, pasto bermuda y celulosa cristalina. En la degradación *in vitro* se midió pH, porcentaje de degradación de materia seca (MS) (%DEGMS) y AGV. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3×4 con inóculos y sustratos como factores. Todos los inóculos presentaron actividad heterofermentativa en los sustratos celulósicos. Los tres inóculos no presentaron diferencias en la producción de AGV ($p > 0.05$) en la fermentación de alfalfa, pasto bermuda y rastrojo de maíz, pero el CBC produjo más acetato ($p \leq 0.05$) que las BRT al fermentar alfalfa y pasto bermuda. El CBC presentó sinergismo en la producción de acetato con las BRT en celulosa cristalina, ya que el cocultivo produjo más acetato que BRT ($p \leq 0.05$). El cocultivo y BRT no presentaron diferencias ($p > 0.05$) en el %DEGMS en pasto bermuda, rastrojo de maíz y celulosa cristalina. Bajo estas condiciones el cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas presenta actividad heterofermentativa en sustratos celulósicos y el acetato es el principal producto de la fermentación, pero estas bacterias no mejoran la degradación

ABSTRACT

In vitro methods are suitable for comparing degradation of cellulosic substrates and synthesis of products derived from fermentation, such as volatile fatty acids (VFA). The objectives of this study were to compare the production of VFA of a culture of reactivated cellulolytic bacteria (CBC) with that of total ruminal bacteria (TRB) in cellulosic substrates, and to evaluate the relationship between VFA and *in vitro* degradation. The culture of cellulolytic bacterial was obtained after four transfers of ruminal fluid to fresh culture media and Whatma paper, and preserved by lyophilization. The inocula were CBC, TRB and one co-culture (50:50) of the two inocula together. The substrates were alfalfa, maize stalks, Bermuda grass and crystalline cellulose. In *in vitro* degradation, pH, percentage of dry matter (DM) degradation (%DMDEG) and VFA were measured. The experimental design was completely randomized with a 3x4 factorial array; inocula and substrates were factors. The three inocula had heterofermentative activity in the cellulosic substrates. None of the three were different in VFA production ($p > 0.05$) in fermentation of alfalfa, Bermuda grass or maize stalks. However, CBC produced more acetate ($p \leq 0.05$) than the TRB in fermentation of alfalfa and Bermuda grass. CBC exhibited synergism in the production of acetate with TRB in crystalline cellulose since the co-culture produced more acetate than TRB ($p \leq 0.05$). The co-culture and TRB were not different ($p > 0.05$) in %DMDEG in Bermuda grass, maize stalks and crystalline cellulose. Under these conditions, the culture of reactivated cellulolytic bacteria exhibits heterofermentative activity in cellulosic substrates, and acetate is the main product of fermentation. These bacteria, however, do not improve DM degradation when co-cultured (50:50) with total ruminal bacteria.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.
Received: September, 2015. Approved: April, 2016.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 50: 565-574. 2016.

Key words: Acetate, *in vitro* fermentation, *in vitro* degradation, cellulose, bacteria.

de la MS al usarse en cocultivo (50:50) con bacterias ruminales totales.

Palabras clave: Acetato, fermentación *in vitro*, degradación *in vitro*, celulosa, bacterias.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos vegetales son fuente de energía para ruminantes y se dividen en polisacáridos estructurales y polisacáridos no estructurales. Los estructurales están en la pared celular, es la fibra detergente neutro (FDN), se componen de celulosa, hemicelulosa y lignina (Barboza *et al.*, 2009) y la proporción depende de la especie, tipo de célula y etapa de desarrollo (Vermerris, 2008). El ambiente anaerobio y los microorganismos del rumen degradan de manera eficiente los polisacáridos de origen vegetal, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* producen endoglucanases, exoglucanases y β -glucosidasas que actúan sinérgicamente en la degradación de celulosa en el rumen (Cai *et al.*, 2010).

Los estudios de fermentación ruminal usan la evaluación *in vitro* de sustratos celulósicos para medir la degradación de un sustrato en un tiempo determinado, así como los ácidos grasos volátiles (AGV) obtenidos en la fermentación. Los microorganismos ruminales se usan como inóculo para simular las condiciones del rumen (Dhanoa *et al.*, 2004; Váradyová *et al.*, 2005). Los métodos *in vitro* son adecuados para comparar la degradación de sustratos celulósicos y la formación de productos derivados de la fermentación. Los AGV producto de fermentaciones *in vitro* difieren según las condiciones experimentales (Weimer *et al.*, 2011).

La digestibilidad de materia seca (MS) de forrajes y residuos agrícolas se reduce con la madurez fisiológica por el incremento de polisacáridos estructurales (Barboza *et al.*, 2009). Las bacterias celulolíticas pueden degradar polisacáridos estructurales de la pared celular; sin embargo, una sola especie bacteriana no produce las enzimas necesarias para digerirla, por lo cual deben asociarse fisiológicamente para combinar la acción de las enzimas (Miron *et al.*, 2001). Además requieren interactuar con otros microorganismos mediante interdependencia alimentaria o alimentación cruzada (Cobos, 2007). El producto principal de esta degradación es acetato y CO₂ (Lynd *et al.*, 2002).

INTRODUCTION

Plant carbohydrates are the energy source for ruminants. They are divided into structural and non-structural polysaccharides. Structural polysaccharides are in the cell wall as neutral detergent fiber (NDF), they are made up of cellulose, hemicellulose and lignin (Barboza *et al.*, 2009), and the proportion depends on the species, cell type and development stage (Vermerris, 2008). In the anaerobic environment, microorganisms in the rumen efficiently degrade the polysaccharides from plants. *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes* produce endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases, which act synergistically in the degradation of cellulose in the rumen (Cai *et al.*, 2010).

Studies on ruminal fermentation use *in vitro* assessment of cellulosic substrates to measure degradation of a substrate in a given time, as well as volatile fatty acids (VFA) obtained in fermentation. Ruminal microorganisms are used as inoculum to simulate the conditions in the rumen (Dhanoa *et al.*, 2004; Váradyová *et al.*, 2005). *In vitro* methods are suitable for comparing degradation in cellulosic substrates and formation of products derived from fermentation. VFA produced by *in vitro* fermentation differs depending on experimental conditions (Weimer *et al.*, 2011).

Digestibility of dry matter (DM) from forages and agricultural residues decreases with physiological maturation because of the increase in structural polysaccharides (Barboza *et al.*, 2009). Cellulolytic bacteria can degrade the structural polysaccharides of the cell wall. However, one bacterial species alone does not produce the enzymes necessary for its digestion. For this reason, the bacteria should be associated physiologically to combine the action of the enzymes produced (Miron *et al.*, 2001). Moreover, they must interact with other microorganisms through nutrient interdependence or crossed alimentation (Cobos, 2007). The main product of this degradation is acetate and CO₂ (Lynd *et al.*, 2002).

In the literature reviewed, there are no publications about the addition of cellulolytic bacteria to a population of ruminal microorganisms to observe their effects on fermentation variables. *In vitro* degradation of DM by cellulolytic bacteria in pure or co-cultures was studied by Min *et al.* (2006) and Grilli *et al.* (2011), but it was not evaluated in co-culture

En la literatura revisada no hay publicaciones sobre la adición de bacterias celulolíticas a una población de microorganismos ruminales para observar los efectos en las variables de fermentación. La degradación *in vitro* de MS por bacterias celulolíticas como cultivos puros o cocultivos entre ellas la estudiaron Min *et al.* (2006) y Grilli *et al.* (2011), pero no se ha evaluado en cocultivo con bacterias ruminales. Por tanto, los objetivos de este estudio fueron comparar la producción de AGV de un cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas (CBC) con bacterias ruminales totales (BRT) en cuatro sustratos celulósicos, así como establecer la relación entre AGV y la degradación *in vitro* de sustratos celulósicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el Km 36.5, carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Medio de cultivo para bacterias celulolíticas

El medio de cultivo para bacterias celulolíticas 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 [6 g K₂HPO₄ (Sigma) en 1000 mL de H₂O destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (Sigma) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich) + 2.45 g MgSO₄ (Sigma) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Sigma) en 1000 mL de H₂O 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), 2 mL de solución sulfido-cisteína [2.5 g L-cisteína (Sigma) en 15 mL de 2N NaOH (Meyer) + 2.5 g de Na₂S-9H₂O (Meyer) aforado en 100 mL de H₂O destilada], 5 mL de solución al 8 % de Na₂CO₃ (Baker) y 52.6 mL de H₂O destilada. El medio de cultivo se esterilizó 15 min en autoclave (Tuttnauer® 2540F, Israel) a 121 °C y 15 psi (Cobos y Yokoyama, 1995).

Cultivo de bacterias celulolíticas

El fluido ruminal se obtuvo de una vaca Jersey con cánula ruminal, la cual pastó en praderas de alfalfa (*Medicago sativa*) antes de tomar la muestra de fluido ruminal que se centrifugó 3 min a 1157 g en una centrífuga (Eppendorf® 5804, Alemania) a 25 °C. En una campana Labconco® (USA) de bioseguridad con purificador de Clase II provista de rayos ultravioleta, se

with ruminal bacteria. Therefore, the objectives of this study were to compare the production of VFA by a culture of reactivated cellulolytic bacteria (CBC) with that of total ruminal bacteria (TRB) in four cellulosic substrates and to establish the relationship between VFA and *in vitro* degradation of cellulosic substrates.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the Laboratory of Ruminal Microbiology and Microbial Genetics of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, located at Km 36.5, Carretera Mexico-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico.

Culture medium for cellulolytic bacteria

The culture medium for cellulolytic bacteria contained 30 mL 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 mineral solution I [6 g K₂HPO₄ (Sigma) in 1000 mL distilled H₂O], 5 mL mineral solution II [6 g KH₂PO₄ (Sigma) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich) + 2.45 g MgSO₄ (Sigma) + 1.6 g CaCl-2H₂O (Sigma) in 1000 mL distilled H₂O], 0.1 mL resazurin at 0.1 % (Sigma-Aldrich), 0.2 g soy peptone (Merck), 0.1 g yeast extract (Sigma), 2 mL cysteine sulfide solution [2.5 g L-cysteine (Sigma) in 15 mL 2N NaOH (Meyer) + 2.5 g Na₂S-9H₂O (Meyer), gauged in 100 mL distilled H₂O], 5 mL 8% solution of Na₂CO₃ (Baker) and 52.6 mL distilled H₂O. The culture medium was sterilized at 121 °C and 15 psi for 15 min in an autoclave (Tuttnauer™ 2540F, Israel) (Cobos and Yokoyama, 1995).

Culture of cellulolytic bacteria

The ruminal fluid was obtained from a Jersey cow fitted with a ruminal cannula. The cow grazed on pastures of alfalfa (*Medicago sativa*) before collection of ruminal fluid sample, which was centrifuged at 1157 g in a centrifuge (Eppendorf 5804, Germany) at 25 °C for 3 min. In a Labconco™ (USA) biosafety bell with a Class II purifier equipped with ultraviolet rays, the supernatant was recovered and used as the inoculum. Nine mL of sterile culture medium was added to three sterile 18x150 mm tubes containing a strip of Whatman™ paper (3x30 mm) and 0.05 g crystalline cellulose (Sigma). In an incubator (Riossa™ EO-71, Mexico), the three tubes were incubated at 39 °C for 24 h to verify their sterility. They were then inoculated with 1 mL of the inoculum and incubated at 39 °C for 7 d until the Whatman™ paper degraded. To obtain only bacteria with the capacity to

recuperó el sobrenadante y se utilizó como inóculo. En tres tubos de 18×150 mm con una tira de papel Whatman® (3×30 mm) y 0.05 g de celulosa cristalina (Sigma) estériles, bajo flujo de CO₂, se adicionaron 9 mL de medio de cultivo estéril y en una incubadora (Riossa® EO-71, México) se incubaron 24 h a 39 °C para verificar esterilidad. Los tres tubos se inocularon con 1 mL de inóculo; el medio se incubó 7 d a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman®. Para obtener sólo bacterias con capacidad de degradar material celulósico, en otro tubo estéril se transfirió 1 mL de medio inoculado y se incubó a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (7 d). Cuatro transferencias se realizaron para obtener un cultivo de bacterias celulolíticas con capacidad para degradar la celulosa constituyente del papel Whatman®.

En viales serológicos de vidrio (50 mL) con una tira de papel Whatman (3×30 mm) y 0.1 g de celulosa cristalina (Sigma) estériles se depositaron 27 mL de medio de cultivo estéril, bajo flujo constante de CO₂, y se incubaron 72 h a 39 °C para verificar esterilidad. El medio de cultivo en los viales se inoculó con 3 mL del producto obtenido de la cuarta transferencia del cultivo de bacterias celulolíticas y se incubaron a 39 °C hasta la degradación del papel Whatman (10 d). Las bacterias celulolíticas requieren un preservador para la liofilización y el carbón activado cumple esta función; por tanto, en cada vial se adicionó 0.1 g de carbón activado (Hycl) y se incubó a 39 °C por 2 h. Los viales se congelaron en un congelador de rodillo (Labconco® Shell Freezer, USA) hasta alcanzar -38 °C; después en una liofilizadora (Labconco® Freezone 6 L, USA) se liofilizaron 24 h en modo automático (-50 °C y 13.5 Pa de presión).

Inóculos y sustratos

Los inóculos fueron: 1) BRT=bacterias ruminales totales obtenidas del fluido ruminal de una vaca Jersey con cánula ruminal; la vaca pastó en praderas de alfalfa antes de tomar la muestra de fluido ruminal, el cual se centrifugó 3 min a 1157 g y 25 °C para precipitar protozoarios y partículas de fibra. 2) CBC=cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas. En viales serológicos de vidrio (50 mL) con una tira de papel Whatman (3×30 mm) y 0.02 g de celulosa cristalina (Sigma) estériles se depositaron 30 mL de medio de cultivo estéril, bajo flujo constante de CO₂. El medio de cultivo en el vial se inoculó con 0.05 g de liofilizado de CBC, bajo flujo constante de CO₂ y se incubaron 10 d a 39 °C hasta degradar el papel Whatman. 3) Cocultivo=BRT y CBC (50:50); en ambos inóculos se determinó concentración de bacterias totales usando conteo directo en la cámara Petroff-Hauser (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA) y la fórmula: concentración de bacterias=(promedio conteo directo) (factor de

degrade cellulosic matter, 1 mL of inoculated medium was transferred to another sterile tube and incubated at 39 °C until the Whatman paper was degraded (7 d). Four transfers were performed to obtain a culture of cellulolytic bacteria capable of degrading the cellulose that makes up Whatman paper.

In sterile glass serological vials (50 mL) containing a strip of Whatman paper (3×30 mm) and 0.1 g of crystalline cellulose (Sigma), 27 mL of sterile culture medium were deposited under a constant flow of CO₂, and incubated 72 h at 39 °C to verify sterility. The culture medium in the vials were inoculated with 3 mL of the product obtained from the fourth transfer of the cellulolytic bacterial culture and incubated at 39 °C until degradation of the Whatman paper (10 d). Cellulolytic bacteria require a preservative for lyophilization, and activated carbon satisfies this function. Therefore, 0.1 g activated carbon (Hycl) was added to each vial, which was incubated at 39 °C for 2 h. The vials were frozen in a roller freezer (Labconco® Shell Freezer, USA) to a temperature of -38 °C. Then, in a lyophilizer (Labconco® Freezone 6 L, USA), the bacteria were lyophilized 24 h in automatic mode (-50 °C and 13.5 Pa pressure).

Inocula and substrates

Three inocula were used. 1) TRB=total ruminal bacteria obtained from ruminal fluid of a Jersey cow fitted with a ruminal cannula; the cow had grazed on alfalfa pastures before collection of ruminal fluid. The ruminal fluid was centrifuged at 1157 g, 25 °C for 3 min, to precipitate protozoa and fibrous particles. 2) CBC=reactivated cellulolytic bacterial culture. In sterile glass serological vials (50 mL) containing a strip of Whatman paper (3×30 mm) and 0.02 g crystalline cellulose (Sigma), 30 mL of sterile culture medium was deposited under a constant flow of CO₂. The culture medium in the vials was inoculated with 0.05 g of lyophilized CBC under a constant flow of CO₂ and incubated 10 d at 39 °C until the Whatman paper degraded. 3) Co-culture = TRB and CBC (50:50); in both inocula, the concentration of total bacterial was determined by direct count in a Petroff-Hauser chamber (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA) and the formula: bacterial concentration=(average direct count) (dilution factor) 2×10⁷ to equate the concentration of TRB with that of CBC (Ley de-Coss *et al.*, 2013).

The substrates were maize stalks (*Zea mays*), alfalfa with 35 d of growth, Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) with 45 days of growth, and crystalline cellulose (Sigma). The maize stalks, alfalfa and Bermuda grass were ground, sifted through a 1 mm mesh, and finally washed with running water to eliminate microparticles (<25 μm) and taken to constant weight.

dilución) (2×10^7) para igualar la concentración de BRT y CBC (Ley de-Coss *et al.*, 2013).

Los sustratos fueron rastrojo de maíz (*Zea mays*), alfalfa con 35 d de crecimiento, pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) con 45 d de crecimiento y celulosa cristalina (Sigma). El rastrojo, la alfalfa y el pasto bermuda se molieron y pasaron por una criba de 1 mm, se lavaron con agua corriente para eliminar micropartículas ($< 25 \mu\text{m}$) y se llevaron a peso constante.

Degradación *in vitro* de materia seca

Los tubos de 18×150 mm con 0.05 g de un sustrato se esterilizaron 15 min a 121°C y 15 psi. Luego se adicionaron 9 mL de medio de cultivo estéril bajo flujo de CO_2 y se incubaron a 39°C por 72 h para verificar esterilidad. Los tubos se inocularon con 1 mL de BRT, CBC o cocultivo; los medios se incubaron a 39°C por 72 h. Al término de la incubación se midió pH con un potenciómetro (Orion modelo 250A, Brasil; calibración: pH 7 y 4). La capacidad de degradación *in vitro* de la MS (%DEGMS) se calculó como la diferencia entre la materia inicial y la residual después de la fermentación (Getachew *et al.*, 2004).

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Del medio de cultivo con 72 h d de incubación, se mezcló 1 mL y ácido metafosfórico al 25 % (razón 4:1) en un tubo para microcentrífuga (Hettich® EBA 21, Alemania). Los tubos se centrifugaron 18 800 g por 10 min; el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer, USA). La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Claurus 500, USA) equipado con detector de ionización de flama, columna capilar (Elite FFAP, Perkin-Elmer) de $15 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$, usando nitrógeno como gas acarreador con flujo de 4 mL min^{-1} e H_2 y O_2 para generar una flama con flujo de 45 y 450 mL min^{-1} . Las temperaturas del horno, inyector y columna fueron 120, 250 y 250°C y se inyectó $1 \mu\text{L}$ de muestra. Así se obtuvieron tres picos en un tiempo de retención de 2.16, 2.59 y 3.11 para acetato, propionato y butirato (Cobos *et al.*, 2007).

Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3×4 (cinco muestras independientes). Los factores fueron inóculos (BRT, CBC y cocultivo) y sustratos (rastrojo, pasto bermuda, alfalfa y celulosa cristalina). Los datos de %DEGMS, AGV y pH se analizaron usando el procedimiento GLM (SAS Institute Inc., 2011). Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey

In vitro degradation of dry matter

The 18×150 mm tubes with 0.05 g of a substrate were sterilized at 121°C and 15 psi for 15 min. Then, 9 mL of sterile culture medium was added under a flow of CO_2 and incubated at 39°C for 72 h to verify sterility. The tubes inoculated with 1 mL TRB, CBC or co-culture were incubated at 39°C for 72 h. After incubation, pH was measured with a potentiometer (Orion model 250A, Brazil; calibration: pH 7 and 4). Capacity for *in vitro* DM degradation (%DMDEG) was calculated as the difference between initial and residual matter after fermentation (Getachew *et al.*, 2004).

Concentration of volatile fatty acids (VFA)

After 72 h of incubation, 1 mL of the culture medium was mixed with 25 % metaphosphoric acid (ratio 4:1) in a microcentrifuge tube (Hettich™ EBA 21, Germany). The tubes were centrifuged at 18 800 g for 10 min. The supernatant was placed in chromatograph vials (1.5 mL, Perkin Elmer, USA). VFA concentration was determined in a gas chromatograph (Perkin Elmer, model Claurus 500, USA) equipped with a flame ionization detector and a $15 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ capillary column (Elite FFAP, Perkin-Elmer®); nitrogen was used as the carrier gas with a flow of 4 mL min^{-1} and H_2 and O_2 to generate a flame with a flow of 45 and 450 mL min^{-1} . The oven, injector and column temperatures were 120, 250 and 250°C . One μL of sample was injected. In this way, three peaks were obtained at retention times of 2.16, 2.59 and 3.11 for acetate, propionate and butyrate (Cobos *et al.*, 2007).

Statistical design and analysis

The experimental design was completely randomized with a 3×4 factorial arrangement (five independent samples). The factors were inocula (TRB, CBC and co-culture) and substrates (maize stalks, Bermuda grass, alfalfa and crystalline cellulose). The data on %DMDEG, VFA and pH were analyzed with the GLM procedure (SAS Institute Inc., 2011). The averages were fit by least squares for comparison with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The relationships between variables were analyzed with the Pearson correlation ($p \leq 0.05$) (SAS Institute Inc., 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

The reactivated cellulolytic bacterial culture (CBC), total ruminal bacterial (TRB) and the co-culture produced acetate, propionate and butyrate by fermentation of the carbohydrates present in

($p \leq 0.05$). Las variables se relacionaron usando la correlación de Pearson ($p \leq 0.05$) (SAS Institute Inc., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas (CBC), bacterias ruminales totales (BRT) y el cocultivo produjeron acetato, propionato y butirato por la fermentación de los carbohidratos presentes en sustratos celulósicos por actividad heterofermentativa (Cuadro 1). Esta actividad heterofermentativa se presentó debido a las interacciones entre microorganismos ruminales para degradar biomasa celulósica (Zhang *et al.*, 2015) por interdependencia alimentaria y alimentación cruzada (Cobos, 2007). Estos resultados concuerdan con los publicados por Mateo-Sánchez *et al.* (2002), acerca de diferencias heterofermentativas usando aserrín como sustrato con *Bacteroides stercorys* en cultivo mixto con un coccobacilo.

El CBC al fermentar alfalfa y pasto bermuda produjo más acetato ($p \leq 0.05$) que las BRT (Cuadro 1) por la acción de las bacterias celulolíticas que fermentan acetato (Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, CBC

the cellulosic substrates through heterofermentative activity (Table 1). This heterofermentative activity took place because of the interactions among ruminal microorganisms in the degradation of cellulosic biomass (Zhang *et al.*, 2015): alimentary interdependence and cross alimentation (Cobos, 2007). These results agree with those published by Mateo-Sánchez *et al.* (2002) regarding differences in heterofermentation using sawdust as the substrate for *Bacteroides stercorys* in mixed culture with coccobacilli.

CBA produced more acetate ($p \leq 0.05$) than TRB when fermenting with alfalfa and Bermuda grass (Table 1), due to the action of the cellulolytic bacteria, which are fermenters of acetate (Zhang *et al.*, 2015). However, CBC and TRB in crystalline cellulose and maize stalks were not different ($p > 0.05$) since the products of *in vitro* fermentation depend on the type of inoculum and the type of substrate (Weimer *et al.*, 2011).

The three inocula were not different ($p > 0.05$) in VFA production in the substrates alfalfa, Bermuda grass and maize stalks (Table 2) because cellulolytic bacteria affect only the proportion of acetate in the

Cuadro 1. Producción de ácidos grasos volátiles (mM L^{-1}) de un cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas (CBC), de bacterias ruminales totales (BRT) y un cocultivo CBC-BRT (50:50) en diferentes sustratos celulósicos.

Table 1. Volatile fatty acid production (mM L^{-1}) of a reactivated cellulolytic bacterial culture (CBC), total ruminal bacteria (BRT) and a co-culture CBC-BRT (50:50) in different cellulosic substrates.

Sustrato	Inóculo	Acetato mM L^{-1}	Propionato mM L^{-1}	Butirato mM L^{-1}
Alfalfa	BRT	49.43def	15.69bc	7.93ab
	CBC	59.14ab	10.88f	7.08bcd
	Cocultivo	50.23def	14.49cde	7.71abc
Pasto bermuda	BRT	54.34bcd	17.86ab	7.97ab
	CBC	59.70a	12.23def	7.62bc
	Cocultivo	56.06abc	15.78bc	8.72a
Celulosa cristalina	BRT	42.43h	18.65a	5.64f
	CBC	44.01gh	12.30def	5.81ef
	Cocultivo	52.48cde	11.81ef	6.14def
Rastrojo de maíz	BRT	48.44efg	17.42ab	7.51bc
	CBC	53.53cde	11.50f	6.73cde
	Cocultivo	47.24fgh	14.66cd	7.37bc
	EEM	0.75	0.37	0.13

Valores promedio con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); EEM = error estándar del valor promedio. BRT = Bacterias ruminales totales, concentración 5×10^9 bacterias mL^{-1} (se igualó la concentración con CBC); CBC = consorcio de bacterias celulolíticas, concentración 8.7×10^8 bacterias mL^{-1} ; Cocultivo = BRT y CBC (50:50). ♦ Average values with different letters in the same column are statistically different ($p \leq 0.05$); EEM = standard error of the mean. BRT = total ruminal bacteria, concentration 5×10^9 bacteria mL^{-1} (concentration was equaled to that of CBC); CBC = cellulolytic bacterial consortium, concentration 8.7×10^8 bacteria mL^{-1} ; Cocultivo = co-culture of BRT and CBC (50:50).

y BRT en celulosa cristalina y rastrojo de maíz no fueron diferentes ($p > 0.05$) porque, los productos de fermentación *in vitro* dependen del tipo de inóculo y tipo de sustrato (Weimer *et al.*, 2011).

Los tres inóculos no presentaron diferencias ($p > 0.05$) en la producción de AGV en los sustratos alfalfa, pasto bermuda y rastrojo de maíz (Cuadro 2) porque las bacterias celulolíticas sólo afectan la proporción de acetato en la fermentación de sustratos celulósicos (Zhang *et al.*, 2015). Las bacterias celulolíticas requieren pH neutro para su correcto funcionamiento (Barboza *et al.*, 2009; Anrique, 2010) y son sensibles al pH. En pH inferiores a 6.0 se inhiben las bacterias celulolíticas (Chen *et al.*, 2011). En nuestro estudio cuantificó el pH varió de 6.86 a 7.14 (Cuadro 2) por lo cual no influyó en el comportamiento de los inóculos sobre los sustratos evaluados.

Las BRT en los sustratos evaluados presentaron mayor fermentación de propionato ($p \leq 0.05$) que CBC (Cuadro 1) por la presencia de bacterias amilolíticas que fermentan propionato (Anrique, 2010). La producción de butirato de los inóculos en los cuatro sustratos fue menor a 4 mM L^{-1} (Cuadro 1)

fermentation of cellulosic substrates (Zhang *et al.*, 2015). Cellulolytic bacteria require neutral pH to function correctly (Barboza *et al.*, 2009; Anrique, 2010) and are sensitive to pH. In pH below 6.0, cellulolytic bacteria are inhibited (Chen *et al.*, 2011). In our study pH 6.86 to 7.14 (Table 2); therefore pH ranged from did not affect the behavior of the inocula on the evaluated substrates.

The TRB in the evaluated substrates fermented more propionate ($p \leq 0.05$) than CBC (Table 1) because of the presence of amylolytic bacteria that ferment propionate (Anrique, 2010). Butyrate production of the inocula was less than 4 mM L^{-1} in the four substrates (Table 1) because it requires substrates such as fructose or galactose for higher production (Oba, 2011). In our study, structural carbohydrates were fermented.

CBC had the lowest values of *in vitro* %DEGMS in Bermuda grass, maize stalks and crystalline cellulose. In contrast, CBC and the co-culture in alfalfa had higher values ($p \leq 0.05$) than TRB. In crystalline cellulose, maize stalks and Bermuda grass, the co-culture was not different ($p > 0.05$) from TRB

Cuadro 2. Comportamiento en la degradación *in vitro* de sustratos celulósicos inoculados con un cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas (CBC), bacterias ruminales totales (BRT) y cocultivo CBC-BRT (50:50).

Table 2. *In vitro* degradation of cellulosic substrates inoculated with reactivated cellulolytic bacteria (CBC), total ruminal bacteria (BRT) and co-culture CBC-BRT (50:50).

Sustrato	Inóculo	%DEGMS	pH	AGV
Alfalfa	BRT	57.02b	7.00b	73.05abcde
	CBC	61.43a	6.86d	77.11abcd
	Cocultivo	63.17a	6.99b	72.43bcde
Pasto bermuda	BRT	55.13b	6.95bc	80.17ab
	CBC	43.89c	6.89cd	79.55abc
	Cocultivo	55.97b	6.88cd	80.56a
Celulosa cristalina	BRT	43.16c	7.14a	66.71ef
	CBC	35.96d	6.90cd	62.12f
	Cocultivo	45.35c	7.15a	70.43de
Rastrojo de maíz	BRT	62.31a	6.91cd	73.36abcde
	CBC	37.30c	6.91cd	71.75cde
	Cocultivo	58.18a	6.89cd	69.27ef
EEM		1.26	0.01	0.83

Valores promedio con distinta letra en una columna son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$); EEM=error estándar del valor promedio. BRT=Bacterias ruminales totales, concentración 5×10^9 bacterias mL^{-1} (se igualó la concentración con CBC); CBC=consorcio de bacterias celulolíticas, concentración 8.7×10^8 bacterias mL^{-1} ; Cocultivo = BRT y CBC (50:50); %DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 72 h; pH, pH medido a 72 h de incubación; AGV, ácidos grasos volátiles (mM L^{-1}) a las 72 h de incubación. ♦ Average values with different letters in a column are statistically different ($p \leq 0.05$); EEM=standard error of the mean. BRT=total ruminal bacteria, concentration 5×10^9 bacteria mL^{-1} (the concentration was equaled to that of CBC); CBC= cellulolytic bacterial consortium, concentration 8.7×10^8 bacteria mL^{-1} ; Cocultivo=co-culture of BRT and CBC (50:50). %DMDEG, percentage of *in vitro* degradation of dry matter after 72 h; pH, pH measured after 72 h of incubation; AGV, volatile fatty acids (mM L^{-1}) after 72 h of incubation.

porque se requiere sustratos como la fructosa o galactosa para aumentar su producción (Oba, 2011) y en nuestro estudio se fermentaron carbohidratos estructurales.

El CBC presentó los menores valores *in vitro* de la MS %DEGMS en pasto bermuda, rastrojo de maíz y celulosa cristalina; en contraste, el CBC y el cocultivo en alfalfa fueron mayores ($p \leq 0.05$) que BRT. En celulosa cristalina, rastrojo de maíz y pasto bermuda, el cocultivo no presentó diferencias ($p > 0.05$) en la degradación *in vitro* con BRT (Cuadro 2). Estos resultados son mayores a los publicados por Juárez *et al.* (2009) y Grilli *et al.* (2011), quienes reportaron menor degradación *in vitro* en pasto pangola inoculada con bacterias ruminales (Juárez *et al.*, 2009) y alfalfa inoculada con *F. succinogenes* (Grilli *et al.*, 2011). Ello se debe a que el tipo de inóculo, conformación de la población microbiana y especie donadora del inóculo (Mould *et al.*, 2005) son determinantes en la degradación *in vitro* de los sustratos celulósicos.

El pH tuvo una correlación negativa con AGV totales y acetato (Cuadro 3). Al aumentar la producción de AGV el pH se acidificó, lo cual concuerda con lo publicado por Relling y Mattioli (2003) de que por su carácter ácido cuanto mayor es la producción de AGV disminuye el pH ruminal. La producción de AGV totales se correlaciona positivamente con %DEGMS, así al aumentar la producción de AGV totales se incrementó el %DEGMS. Estos resultados concuerdan con Getachew *et al.* (2004), quienes señalan que la correlación entre degradación *in vitro* y la producción de AGV es positiva. La producción

in *in vitro* degradation (Table 2). These results are higher than those published by Juárez *et al.* (2009) and Grilli *et al.* (2011), who reported lower *in vitro* degradation in pangola grass inoculated with ruminal bacteria (Juárez *et al.*, 2009) and alfalfa inoculated with *F. succinogenes* (Grilli *et al.*, 2011). This is due to the fact that the type of inoculum, conformation of the microbial population and donor species of the inoculum (Mould *et al.*, 2005) are determinant in *in vitro* degradation of cellulosic substrates.

pH correlated negatively with total VFA and acetate (Table 3). When VFA production increased, pH became acid. This agrees with Relling and Mattioli (2003) in that, because of its acid feature, the higher the production of VFA, the lower the ruminal pH. Total VFA production correlated positively with %DMDEG, thus, when total VFA production increased, %DMDEG also increased. These results agree with Getachew *et al.* (2004), who point out that the correlation between *in vitro* degradation and VFA production is positive. Production of acetate increases when that of propionate decreases, based on the negative correlation of these variables (Table 3). This is due to the type of microorganisms present during fermentation of cellulosic substrates (Anrique, 2010).

CONCLUSIONS

The culture of reactivated cellulolytic bacteria during fermentation in cellulosic substrates exhibited heterofermentative activity, in which acetate was the main product of fermentation, compared with that

Cuadro 3. Coeficientes de correlación entre las variables de la prueba de degradación *in vitro* de sustratos celulósicos inoculados con un cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas (CBC), bacterias ruminales totales (BRT) y un cocultivo entre CBC-BRT (50:50).

Table 3. Coefficients of correlation between variables of the *in vitro* degradation test with cellulosic substrates inoculated with a culture of reactivated cellulolytic bacteria (CBC), total ruminal bacteria (BRT) or a CBC-BRT co-culture (50:50).

	%DEGMS	pH	Acetato	Propionato	Butirato	AGV
%DEGMS	1	-0.22 [‡]	0.19 [‡]	0.30 [†]	0.59 [†]	0.40 [†]
pH		1	-0.37 [†]	0.26 [‡]	-0.40 [†]	-0.28 [†]
Acetato			1	-0.30 [†]	0.58 [†]	0.86 [†]
Propionato				1	0.28 [†]	0.22 [‡]
Butirato					1	0.81 [†]
AGV						1

[†] Coeficiente significativo ($p \leq 0.05$); [‡] Coeficiente no significativo ($p > 0.05$); %DEGMS, porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca a 72 h; pH, pH medido a 72 h de incubación; AGV, ácidos grasos volátiles (mM L^{-1}) a las 72 h de incubación. [‡] Significant coefficient ($p \leq 0.05$); [†] non-significant coefficient ($p > 0.05$); %DEGMS, percentage of *in vitro* dry matter degradation after 72 h; pH, pH measured after 72 h of incubation; AGV, volatile fatty acids (mM L^{-1}) after 72 h of incubation.

de acetato aumenta cuando disminuye la producción de propionato, con base en la correlación negativa de estas variables (Cuadro 3). Esto se debe al tipo de microorganismos presentes durante la fermentación de los sustratos celulósicos (Anrique, 2010).

CONCLUSIONES

El cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas durante la fermentación de sustratos celulósicos presentó actividad heterofermentativa, y el acetato fue el principal producto de fermentación comparado con bacterias ruminales totales. La adición de un cultivo de bacterias celulolíticas reactivadas en bacterias ruminales no produjo sinergismo en la degradación *in vitro* de la materia seca de sustratos celulósicos, pero si mejoró la producción de acetato.

LITERATURA CITADA

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. 3^{ra} ed. Valdivia, América. pp: 25-36.

Barboza S. P., K. L. Parkey, and I. D. Hume. 2009. Integrative Wildlife Nutrition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, Germany. 342 p.

Cai S., J. Li, F. H. Ze, K. Zhang, Y. Luo, B. Janto, R. Boissy, G. Ehrlich, and X. Dong. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3818-3824.

Cobos M. A. 2007. Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Ferrera-Cerrato, R and A. Alarcon (eds). Trillas. Distrito Federal, México. 268 p.

Cobos M. A. and M. T. Yokoyama. 1995. Rumen Ecology Research Planning. Wallace R. J. and A. Lahlou-Kassi (eds). The International Livestock Research Institute (ILRI). Addis Ababa, Ethiopia. 270 p.

Cobos M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing shrimp Shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:324-330.

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

Dhanoa M. S., J. France, L. A. Crompton, R. M. Mauricio, E. Kebreab, J. A. N. Mills, R. Sanderson, J. Dijkstra, and S. Lopez. 2004. Technical note: a proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the *in vitro* gas production

of total ruminal bacteria. Addition of a culture of reactivated cellulolytic bacteria to ruminal bacteria did not produce synergism in *in vitro* dry matter degradation of cellulosic substrates. It did, however, improve production of acetate.

—End of the English version—

-----*-----

technique using feces as the inoculum. *J. Anim. Sci.* 82:733-746.

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.

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.

Juárez R. A. S., M. A. S. Cerrillo, E. O. Gutiérrez, E. M. T. Romero, J. N. Colín, y H. B. Bernal. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Téc. Pec. Mex.* 47:55-67.

Ley de-Coss A., C. Arce-Espino, M. A. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez y, R. Pinto-Ruiz. 2013. Estudio comparativo entre la cepa de *Pediococcus acidilactici* aislada del rumen de borregos y un consorcio de bacterias ruminales. *Agrociencia* 47:567-578.

Lynd L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl and, I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-577.

Mateo-Sánchez J. M., M. A. Cobos-Peralta, A. Trinidad-Santos, V. Cetina-Alcalá, y J. Vargas-Hernández. 2002. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras del aserrín. *Agrociencia.* 36:523-530.

Min B. R., W. E. Pinchak, R. C. Anderson and M. E. Hume. 2006. *In vitro* bacterial growth and *in vivo* ruminal microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. *J. Anim. Sci.* 84:2873-2882.

Miron J., D. Ben-Ghedalia and M. Morrison. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* 84:1294-1309.

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.

NRC (National Research Council). 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants, Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. Washington, D.C. USA. The National Academics Press. 362 p.

Oba M. 2011. Review: effects of feeding sugar on productivity of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 91:37-46.

- Relling A. E., y G. A. Mattioli. 2003. Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Fac. Ciencias Veterinarias. Argentina. Universidad Nacional de la Plata. 72 p.
- Russell J. B., and J. L. Rychlik. 2001. Factor that alter rumen microbial ecology. *Sci. Ner Series*. 292(5519):1119-1122.
- SAS. Institute Inc. 2011. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. pp: 3154-3339.
- Váradyová Z., M. Baran, and I. Zelenák. 2005. Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and fecal inoculum from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 81-94.
- Vermerris W. 2008. Genetic Improvement of Bioenergy Crops. Vermerris W. (ed). Springer Science+Business Media. New York, USA. 464 p.
- Weimer P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens, and M. B. Hall. 2011. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during *in vitro* ruminal fermentations of mixed rations by monensina-adapted and unadapted microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169:68-78.
- 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.