

CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS *in vitro* DE CONSORCIOS BACTERIANOS CELULOLÍTICOS OBTENIDOS DE DIFERENTES ESPECIES DE RUMIANTES

In vitro FERMENTATIVE CHARACTERISTICS OF BACTERIAL CELLULOLYTIC CONSORTIA OBTAINED FROM DIFFERENT SPECIES RUMINANTS

Gibran Sánchez-García¹, Paulino Sánchez-Santillán^{2§}, Nicolas Torres-Salado², Elías Hernández-Castro¹, Gregorio Sarabia-Ruiz¹, Liliana Aguilar-Marcelino³

¹Universidad Autónoma de Guerrero (UAG). Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Unidad Tuxpan: Km 2.5 Carretera Iguala-Tuxpan, Iguala, Gro. ²UAG, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Km 197 Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero. México. ³ Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agropecuaria y Ganadera-Helminología, Área de Helminología, CENID-Parasitología Veterinaria, Jiutepec, Morelos. México. [§]Autor de correspondencia: (sanchezsantillanp@gmail.com).

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar las características fermentativas *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos de diferentes especies rumiantes. Los consorcios bacterianos celulolíticos (CBC) se obtuvieron del fluido ruminal de bovino, ovino, caprino y búfalo al realizar seis transferencias en un medio de cultivo selectivo con base en celulosa para obtener un CBC con capacidad de degradar celulosa. La prueba consistió en evaluar pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃), conteo de bacterias totales y degradación de materia seca (DMS) en medios de cultivo que contenían 0.1 g de celulosa y 9 mL de medio de cultivo inoculados con un tipo de CBC obtenido a las 24, 48 y 72 h incubados a 39 °C. El análisis estadístico fue un arreglo factorial 4x3 dentro de un diseño completamente al azar, usando origen de CBC y tiempos de fermentación como factores. Los resultados muestran una interacción entre factores y entre niveles de los factores ($p \leq 0.05$) para cada variable evaluada. El CBC_{Caprino} mostró mayor DMS, CBC_{Ovino} mayor pH y conteo de bacterias y CBC_{Búfalo} mayor N-NH₃ ($p \leq 0.05$). En tiempo de fermentación la DMS aumentó y el pH disminuyó conforme incremento el tiempo de incubación ($p \leq 0.05$). El pH del medio inoculado con CBC_{Ovino} no mostró diferencias en cada tiempo de incubación ($p > 0.05$). CBC_{Caprino} mostró mayor DMS a partir de las 48 h de fermentación, respecto al resto de los CBC ($p \leq 0.05$). Se concluye, el consorcio bacteriano celulolítico obtenido de un caprino tiene la mayor capacidad de degradación de celulosa sin afectar las características fermentativas o población bacteriana total.

Palabras clave: bovino, búfalo, caprinos, degradación de celulosa, ovinos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* fermentative characteristics of bacterial cellulolytic consortia obtained from different ruminant species. The bacterial cellulolytic consortia (BCC) were obtained from the bovine, ovine, goat and buffalo ruminal fluid by carrying out six transfers in a selective cellulose-based culture medium to obtain a CBC capable of degrading cellulose. The test consisted in evaluating pH, ammonia nitrogen (N-NH₃), total bacteria count and dry matter degradation (DMS) in culture media

containing 0.1 g of cellulose and 9 mL of culture medium inoculated with a BCC type obtained at 24, 48 and 72 h incubated at 39 ° C. The statistical analysis was a 4x3 factorial arrangement within a completely randomized design, using BCC origin and fermentation times as factors. The results show an interaction between factors and between factor levels ($p \leq 0.05$) for each variable evaluated. The BCC_{Goat} showed higher DMD, BCC_{Ovine} higher pH and bacterial count and BCC_{Buffalo} major N-NH₃ ($p \leq 0.05$). At the time of fermentation, the DMD increased and the pH decreased as the incubation time increased ($p \leq 0.05$). The pH of the medium inoculated with BCC_{Ovine} showed no difference in each incubation time ($p > 0.05$). BCC_{Goat} showed higher DMD after 48 h of fermentation, with respect to the rest of the BCC ($p \leq 0.05$). It is concluded that the cellulolytic bacterial consortium obtained from a goat has the highest cellulose degradation capacity without affecting the fermentative characteristics or total bacterial population.

Index words: bovine, buffalo, goats, cellulose degradation, sheep.

INTRODUCCIÓN

La técnica de producción de gas *in vitro* permite medir la degradación de un sustrato en tiempos determinados y los microorganismos ruminales son usados como inóculo para recrear las condiciones del rumen (Váradyová, Baran y Zelenák, 2005). La eficiencia de la degradación de sustratos celulósicos en rumen se debe a las enzimas producidas por bacterias y hongos. Las bacterias celulolíticas cultivadas en laboratorio del rumen son *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* (Sánchez, 2014). Sin embargo, en la naturaleza los microorganismos coexisten en comunidades diversas y complejas denominadas consorcios que se componen de diferentes especies que interactúan entre sí y su entorno. Así mismo, realizan procesos fisiológicos interdependientes que un sólo organismo no podría efectuar (Torres et al., 2019). Los consorcios producen más de un producto y utilizan uno o varios sustratos como los carbohidratos estructurales y podrían ser una solución viable desde el punto de vista ecológico y económico para degradar la celulosa; ya que, consumen los azúcares solubles liberados por hidrólisis de la celulosa para producir ácidos orgánicos, CO₂ e H₂ (Torres et al., 2019). Así, el objetivo de este estudio fue evaluar las características fermentativas *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos obtenidos de diferentes especies de rumiantes.

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 ubicado en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

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

Consortios bacterianos celulolíticos (CBC): previo al muestreo, el bovino, la búfalo, la cordera y la cabra permanecieron en un periodo de adaptación de 60 días en una pradera de pangola (*Digitaria decumbes*) sin recibir suplemento. Los procesos de inoculación y preparación de medios de cultivo selectivos celulolíticos se realizaron bajo flujo continuo de CO₂ para conservar condiciones de anaerobiosis. Nueve mL de medio de cultivo estéril se agregaron a tubos de ensaye (Pirex[®], México; 18×150 mm) que contenían 0.1 g de celulosa grado técnico (Meyer[®]) y se mantuvieron en una incubadora (Ecoshel 9082, México) a 39°C por 24 h para verificar esterilidad. El fluido ruminal (FR) se obtuvo de las especies rumiantes antes mencionadas mediante una sonda esofágica. Los fluidos ruminales se centrifugaron 3 min a 1157 × g (Metrix Velocity 14, USA). El sobrenadante del FR se recuperó y en condiciones de una campana de bioseguridad (Labconco[®], USA) se utilizó como inóculos. A un tubo (triplicado) con medio celulosa estéril se agregó un mL de un tipo de inóculo y se incubó a 39 °C por 7 d; un mL de este medio inoculado se transfirió a otro tubo con medio y celulosa y se incubó a 39 °C por 7 d, este proceso se repitió seis veces para obtener un consorcio de bacterias celulolíticas (CBC) capaces de degradar la celulosa.

Prueba de producción de gas *in vitro*: en tubos de ensaye (Pirex[®], México; 18×150 mm) se pesaron 0.1 g de celulosa (Meyer[®]) y se adicionaron 9 mL de medio. Los tubos se inocularon con 1 mL de un tipo de consorcio bacteriano celulolítico (bovino, búfalo, caprino y ovino) y se incubaron a 39 °C por 72 h. El pH, el conteo de bacterias, nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y la degradación de la materia seca (DMS) se determinaron a las 24, 48 y 72 h. El pH se midió con un potenciómetro (Hanna[®] HI2211, Italia; calibración: pH 7 y 4). Para la medición de la concentración de bacterias totales se mezcló un mL del medio contenido en la parte media del tubo y se colocó en un tubo de ensayo con 0.25 mL de formaldehído al 10 % (Sigma-Aldrich[®]). La cantidad de bacterias totales se calculó por conteo directo en una cámara Petroff-Hausser, utilizando un microscopio Olympus CX23 (Sánchez et al., 2016).

Para determinar N-NH₃, 1 mL del medio contenido en los tubos se mezcló con 0.25 mL de ácido metafosfórico (Meyer[®]) al 25 % (proporción 4:1) y se centrifugó 25 min a 3500 × g y el sobrenadante se recuperó en viales de 2 mL. Un volumen de 20 µL de este sobrenadante se mezcló con 1 mL de solución fenol [10 mg de Na₂(NO)Fe(CN)₅·H₂O (Meyer[®]) + 10 g de cristales de fenol (Meyer[®]) aforado en 1000 mL de agua destilada] y 1 mL de solución hipoclorito [7.5 g de NaOH (Reasol[®]) + 21.3 g de Na₂HPO₄ (Meyer[®]) + 15 mL de hipoclorito (5 %; Reasol[®]) se aforo a 1000 mL con agua destilada]. La mezcla se incubó 30 min a 37°C en baño maría. Posteriormente, 5 mL de agua destilada se adicionaron para diluir y se agitaron con un vórtex (Genie 2 G-560, USA). La absorbancia se midió a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway[®] 6850, USA) calibrado con un método ($r^2 = 0.99$) de concentración de nitrógeno amoniacal según McCullough (1967). Por último, la degradación *in vitro* de la materia seca (DMS) se calculó al recuperar por filtración en papel Whatman No. 541 el sustrato no degradado, se secó a 60 °C por 72 h en una estufa (Felisa[®] FE-293^a, México) y se pesó para estimar por diferencia el sustrato degradado.

Los resultados de las variables se analizaron con un arreglo factorial 4×3 dentro de un diseño completamente al azar (9 repeticiones independientes por interacción); usando al origen del consorcio bacteriano celulolítico (búfalo, bovino, ovino y caprino) y tiempo de fermentación (24, 48 y 72 h) como factores principales. Los datos se analizaron usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS[®] (2011) y las diferencias de medias se analizaron usando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los factores origen de los consorcios bacterianos celulolíticos y tiempos de fermentación mostraron diferencias entre niveles ($p \leq 0.05$) para cada variable evaluada en el presente estudio. Además, los factores mostraron interacción ($p \leq 0.05$) para cada una de las variables evaluadas. El CBC_{Caprino} mostró la mayor degradación de materia seca (DMS; $p \leq 0.05$); lo que representó 83.4 % mayor DMS que el CBC_{Bovino} y 300 % que los $CBC_{\text{Búfalo}}$ y CBC_{Ovino} (Cuadro 1). La DMS fue incrementando conforme aumento el tiempo de fermentación ($p \leq 0.05$); de modo que, de 24 a 48 h se aumentó la DMS en 7.71 % y 4.22 % de 48 a 72 h (Tabla 1). Cabe destacar, la interacción CBC_{Caprino} a las 72 h presentó la mayor DMS; y que la interacción CBC_{Bovino} a las 72 h no mostró diferencias ($p > 0.05$) con la interacción de CBC_{Caprino} a las 48 h ($p \geq 0.05$); lo que indica, el CBC_{Caprino} tuvo mayor capacidad de degradación de celulosa en menor tiempo que CBC_{Bovino} (Tabla 2). Resultados superiores fueron reportados por Sánchez et al. (2016), quienes reportaron 32.5 % de DMS en celulosa cristalina inoculada con bacterias celulolíticas conservadas con carbón activado; lo que representa 1.4 veces mayor degradación.

El pH del medio de cultivo mostró diferencias para cada CBC ($p \leq 0.05$). Por otro lado, a medida que aumentó el tiempo de incubación, el valor del pH disminuyó (Tabla 1, $p \leq 0.05$). El medio de cultivo de la interacción CBC_{Caprino} a las 72 h presentó el menor valor de pH, comparado con el resto de las interacciones (Tabla 2, $p \leq 0.05$). Sin embargo, estos valores permanecen dentro del rango del pH ruminal, el cual oscila entre 5.5 y 7 (Araujo y Vergara, 2007) por lo que el origen de los CBC ni el tiempo de fermentación alteraría el pH ruminal. Ahora, las bacterias celulíticas requieren pH que no descienda de 6 para que no se inhiba su actividad enzimática (Sánchez y Cobos, 2016) por lo que en el presente estudio el pH no afectó las demás variables evaluadas al oscilar entre 6.46 y 6.89 (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Características fermentativas de los factores inoculo y tiempo de fermentación.

Variabes	pH	N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	[B] (10 ⁸ células mL ⁻¹)	DMS (%)
Inóculo				
CBC_{Bovino}	6.68 ^c	7.44 ^b	5.13 ^b	15.12 ^b
$CBC_{\text{Búfalo}}$	6.77 ^b	8.85 ^a	4.72 ^b	5.91 ^c
CBC_{Caprino}	6.62 ^d	6.98 ^c	5.05 ^b	22.73 ^a
CBC_{Ovino}	6.83 ^a	7.23 ^{bc}	6.65 ^a	7.91 ^c
Tiempo de incubación				
24	6.78 ^a	7.42 ^b	5.54 ^a	6.37 ^c
48	6.71 ^b	7.54 ^b	5.65 ^a	14.08 ^b
72	6.68 ^c	7.91 ^a	4.98 ^b	18.30 ^a
<i>EEM</i>	0.014	0.097	0.120	1.181

Medias con diferente literal por factor en la misma columna indican diferencias estadísticas (Duncan, 0.05), CBC = consorcio bacteriano celulolítico, DMS = degradación de la materia seca, N-NH₃ = nitrógeno amoniacal, [B] = conteo total de bacterias, *EEM* = error estándar de la media, pH = potencial de hidrógeno. Concentraciones iniciales: $CBC_{\text{Bovino}} = 1.83 \times 10^9$ células mL⁻¹, $CBC_{\text{Búfalo}} = 2.16 \times 10^9$ células mL⁻¹, $CBC_{\text{Caprino}} = 2.01 \times 10^9$ células mL⁻¹, $CBC_{\text{Ovino}} = 1.77 \times 10^9$ células mL⁻¹.

La concentración de N-NH₃ del CBC_{Caprino} es inferior al resto de los CBC ($p \leq 0.05$) y se observó un aumento progresivo conforme aumento el tiempo de fermentación (Tabla 1). La interacción CBC_{Ovino} a las 48 h fue menor ($p \leq 0.05$), mientras las interacciones del $CBC_{\text{Búfalo}}$ a las 48 y 72 h fueron mayores (Tabla 2, $p \leq$

0.05). La concentración del N-NH₃ depende de la degradabilidad de las fracciones nitrogenadas (Torres et al., 2019) y la eficiencia microbiana máxima ocurre entre 5 y 8 mg dL⁻¹ (González et al., 2010), por lo que los resultados del presente estudio indican que la concentración de N-NH₃ no influyó en el resto de las variables evaluadas. El CBC_{Ovino} presentó el mayor conteo de bacterias totales ($p \leq 0.05$) y la concentración aumento de las 24 a las 48 y se presentó una disminución a las 72 h (Tabla I).

La interacción CBC_{Ovino} a las 24 y 48 h presentó el mayor conteo de bacterias totales ($p \leq 0.05$), mientras a los mismos tiempos de fermentación del CBC_{Búfalo} cuantificaron el menor conteo ($p \leq 0.05$). Lo anterior, indica mayor proliferación de bacterias celulolíticas a partir de las 24 h porque se fermentan los carbohidratos estructurales (Herrera et al., 2018) y el inóculo usado en el presente estudio fueron CBC.

Tabla 2. Características fermentativas de la interacción entre inóculos y tiempo de fermentación.

Inóculo	Tiempo incubación (h)	pH	N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	[B] (10 ⁸ células mL ⁻¹)	DMS (%)
CBC _{Bovino}	24	6.77 ^{bc}	7.28 ^{cde}	5.03 ^{de}	5.34 ^c
	48	6.70 ^{cd}	7.62 ^{bc}	6.11 ^{bc}	14.48 ^c
	72	6.56 ^e	7.42 ^{cd}	4.25 ^e	25.54 ^b
CBC _{Búfalo}	24	6.77 ^{bc}	8.08 ^b	4.17 ^e	5.23 ^e
	48	6.72 ^{bc}	8.98 ^a	4.40 ^e	7.39 ^{de}
	72	6.81 ^{ab}	9.49 ^a	5.60 ^{cd}	5.12 ^e
CBC _{Caprino}	24	6.77 ^{bc}	7.27 ^{cde}	5.60 ^{cd}	6.31 ^{de}
	48	6.63 ^{de}	6.97 ^{def}	5.10 ^{de}	24.20 ^b
	72	6.46 ^f	6.72 ^{ef}	4.45 ^e	37.70 ^a
CBC _{Ovino}	24	6.80 ^{ab}	7.05 ^{cdef}	7.37 ^a	8.61 ^{de}
	48	6.80 ^{ab}	6.60 ^f	6.97 ^{ab}	10.26 ^{cd}
	72	6.89 ^a	8.03 ^b	5.60 ^{cd}	4.86 ^e
<i>EEM</i>		0.014	0.097	0.120	1.181

Medias con diferente literal en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, 0.05), CBC = consorcio bacteriano celulolítico, DMS = degradación de la materia seca, N-NH₃ = nitrógeno amoniacal, [B] = conteo total de bacterias, EEM = error estándar de la media, pH = potencial de hidrógeno. Concentraciones iniciales: CBC_{Bovino} = 1.83×10⁹ células mL⁻¹, CBC_{Búfalo} = 2.16×10⁹ células mL⁻¹, CBC_{Caprino} = 2.01×10⁹ células mL⁻¹, CBC_{Ovino} = 1.77×10⁹ células mL⁻¹.

CONCLUSIONES

El consorcio bacteriano celulolítico obtenido del caprino presentó la mayor capacidad de degradación de celulosa sin afectar las características fermentativas o población bacteriana total, lo que indica su capacidad para probarlo como probiótico para mejorar la degradación de forrajes en el trópico mexicano, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar dicha capacidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el proyecto No. 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” de Ciencia Básica.

REFERENCIAS

- Araujo, F. O. y Vergara, L. J. (2007). Propiedades físicas y químicas del rumiante. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15(1), 133-140.
- González, G. H., Martínez, R. de la R., Orozco, A. E., Perea, H. N., López, B. M., Holguín, C. L., & Hernández, H. E. C. (2010). *Efecto del tipo de dieta y del grupo racial sobre el comportamiento digestivo en borregos: efecto del nivel de consumo y de la relación forraje, concentrado sobre el comportamiento digestivo en borregos*. Colección Reportes Técnicos de Investigación. 2: 41.
- Herrera, P., Vélez, R. L., Sánchez, S. P., Torres, S. N., Rojas, G. A. y Maldonado, P. M. (2018). Fermentación *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfalos de agua en sustratos fibrosos. *Revista MVZ Córdoba*, 23(3), 6860-6870.
- McCullough, H. (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clínica Chimica Acta*, 17, 297-304.
- Sánchez, S. P. (2014). Aislamiento de una bacteria ruminal celulolítica y su capacidad para mejorar la degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo de México. 94 p.
- Sánchez, S. P. y Cobos, P. M. A. (2016). Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. *Agrociencia*, 50(5), 565-574.
- Sánchez, S. P., Cobos, P. M. A., Hernández, S. D., Alvarado, A. I., Espinosa, V. D. y Herrera, H. J. G. (2016). Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia*, 50(5), 575-582.
- SAS. (2011). *SAS/STAT Software. Versión 9.3*. Cary, NC SAS, USA: Institute INC.
- Torres, S. N., Sánchez, S. P., Rojas, G. A. R., Almaraz, B. I., Herrera, P. J., Reyes, V. I. & Mayren, M. F. J. (2019). Producción de gas *in vitro* y características fermentativas de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfala de agua (*Bubalus bubalis*) y vaca suiz-bu. *Agrociencia*, 53, 145-159.
- Váradyová, Z., Baran, M. and Zelenák, I. (2005). Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and fecal inoculum from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 81-94.

