



## Obtención de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales y su simulación *in vitro* de manipulación de la microbiota ruminal\*

### Isolation of rumen cellulolytic bacterial consortia and their *in vitro* simulation of rumen microbiota manipulation

Paulino Sánchez-Santillán<sup>1</sup>, Vianey Salas-Cirilo<sup>1</sup>, Nicolás Torres-Salado<sup>1</sup>, Jerónimo Herrera-Pérez<sup>1</sup>

\* Recepción: 5 de diciembre, 2024. Aceptación: 21 de marzo, 2025. Esta investigación formó parte del trabajo de tesis de la segunda autora en la Universidad Autónoma de Guerrero.

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2. Cuajinicuilapa, Guerrero, México. [sanchezsantillan@gmail.com](mailto:sanchezsantillan@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0001-8639-1476>); [vianeyasalascirilo@gmail.com](mailto:vianeyasalascirilo@gmail.com) (<https://orcid.org/0009-0006-7181-2980>); [nivigas@yahoo.com.mx](mailto:nivigas@yahoo.com.mx) (<https://orcid.org/0000-0002-3439-1228>); [mvzjero@hotmail.com](mailto:mvzjero@hotmail.com) (<https://orcid.org/0000-0002-0337-8266>; autor para correspondencia).

## Resumen

**Introducción.** El aislamiento y manipulación de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales (CBC) mejoran la degradación de fibra en condiciones *in vitro*. **Objetivo.** Obtener CBC a partir de diferentes sustratos y simular la manipulación de la microbiota ruminal (MR) mediante una prueba de producción de gas *in vitro*. **Materiales y métodos.** El experimento se llevó a cabo de enero a junio de 2024 en la Universidad Autónoma de Guerrero, Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Los CBC se obtuvieron de fluido ruminal en medios de cultivo selectivos usando aserrín molido (CBCa), tallo de pasto Mulato (CBCt) y pasto Mulato molido (CBCm) como sustrato. Se hicieron dos ensayos *in vitro*: a) Evaluación de CBC obtenidos y, b) Adición de los CBC a MR. En ambos se midió producción parcial de biogás de 0 a 24 h, 24 a 48 h y 48 a 72 h, así como la producción acumulada. La degradación de materia seca (DMS) y actividad enzimática celulolítica (AEC) se midió a 24, 48 y 72 h. Las variables se analizaron en un diseño completamente al azar. **Resultados.** En el ensayo 1, el CBCa produjo mayor biogás acumulado ( $p < 0,05$ ); la DMS a 24 y 72 h fue mayor para los CBCa ( $p < 0,05$ ); la DMS a 48 h y AEC no mostraron diferencias entre CBC ( $p > 0,05$ ). En el ensayo 2 mostraron que la adición de los CBC a la MR no modificó la producción parcial de biogás, la DMS a 24, 48 y 72 h, ni la AEC a 24 y 48 h ( $p > 0,05$ ); pero la adición del CBCm aumentó 13,8 y 36,3 % la producción acumulada de biogás y AEC a 72 h. **Conclusión.** Los CBC obtenidos del pasto mulato permiten manipular la MR tras una simulación *in vitro* en las condiciones específicas del presente estudio.

**Palabras clave:** Biogás, degradación, actividad enzimática, producción de gas, rumen

## Abstract

**Introduction.** Isolation and manipulation of rumen cellulolytic bacterial consortia (CBC) improve fiber degradation under *in vitro* conditions. **Objective.** To obtain CBC from different substrates and to simulate the manipulation of ruminal microbiota (RM) by means of an *in vitro* gas production test. **Objective.** Obtain CBC from different substrates and simulate the manipulation of ruminal microbiota (RM) by *in vitro* gas production test.



© 2025 Agronomía Mesoamericana es desarrollada en la Universidad de Costa Rica bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional. Para más información escriba a [pccmca@ucr.ac.cr](mailto:pccmca@ucr.ac.cr) o [pccmca@gmail.com](mailto:pccmca@gmail.com)

**Materials and methods.** The experiment was conducted from January to June 2024 at the Autonomous University of Guerrero, Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico. CBC were obtained from rumen fluid in selective culture media using ground sawdust (CBCa), Mulatto grass stalk (CBCt) and ground Mulatto grass (CBCm) as substrate. Two *in vitro* assays were performed: a) Evaluation of obtained CBCs and, b) Addition of CBCs to MR. In both, partial biogas production was measured from 0 to 24 h, 24 to 48 h and 48 to 72 h, as well as cumulative production. Dry matter degradation (DMD) and cellulolytic enzyme activity (CEA) were measured at 24, 48 and 72 h. The variables were analyzed in a design based on the design of the CBCs. The variables were analyzed in a completely randomized design. **Results.** In trial 1, CBCa produced higher cumulative biogas ( $p<0.05$ ); DMD at 24 and 72 h was higher for CBCa ( $p<0.05$ ); DMD at 48 h and AEC showed no difference between CBCs ( $p>0.05$ ). In trial 2 they showed that the addition of CBCs to the RM did not modify the partial biogas production, the DMS at 24, 48 and 72 h, nor the CEA at 24 and 48 h ( $p>0.05$ ); but the addition of CBCm increased 13.8 and 36.3 % the cumulative biogas production and CEA at 72 h. **Conclusion.** The CBCs obtained from the mulatto grass allow manipulation of the RM after *in vitro* simulation under the specific conditions of the present study.

**Keywords:** biogas, degradation, enzyme activity, gas production, rumen.

## Introducción

El rumen es un sistema de fermentación natural donde se degrada biomasa como la lignocelulósica (Liang et al., 2024). Entre los microorganismos del rumen, las bacterias desempeñan papeles importantes en la degradación biológica de la fibra vegetal debido a su gran biomasa y alta actividad. Asimismo, las interacciones nutritivas entre bacterias fibrolíticas y no fibrolíticas son importantes para mantener y promover la actividad fibrolítica, principalmente en términos de alimentación cruzada de metabolitos (Culp & Goodman, 2023).

Las bacterias celulolíticas producen enzimas que hidrolizan celulosa a partir de plantas fibrosas, de modo que pasa de carbohidratos poliméricos a compuestos sencillos como los ácidos grasos y alcoholes a través de un complejo enzimático celulósico y por la excreción de celulasas extracelulares (Carhuapoma-Delacruz et al., 2021). Un consorcio microbiano son comunidades con múltiples poblaciones microbianas que coexisten entre ellos; que se comunican intercelular con el *quorum sensing* (QS) o expresión de bacteriocinas con la finalidad de mitigar competencia entre cepas o coordinar la expresión genética (Duncker et al., 2021). La cooperación o sintrofia es un principio fundamental para mantener al consorcio estable (Zhang et al., 2018).

Los consorcios bacterianos celulolíticos pueden ser utilizados como probióticos para mejorar la degradación de celulosa y hemicelulosa (Torres-Salado et al., 2019); ya que su abundancia y actividad enzimática es esencial para la formulación de estrategias de manipulación de la fermentación ruminal para mejorar la degradación de la fibra. El objetivo fue obtener CBC a partir de diferentes sustratos y simular la manipulación de la microbiota ruminal (MR) mediante una prueba de producción de gas *in vitro*.

## Materiales y métodos

### Lugar de estudio

El presente 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. La universidad se ubica en el km 197 de la carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, Cuajinicuilapa, Guerrero, México. El experimento se desarrolló de enero a junio de 2024.

## Sustratos

Los sustratos usados para la obtención de consorcios bacterianos celulíticos fueron aserrín molido de pino (*Pinus canariensis*), pasto Mulato (*Brachiaria híbrido* cv. CIAT 36087) y tallo de pasto Mulato entero (1 cm); este se obtuvo de pacas que tenían 300 d de rebrote aproximadamente, ya que se adquirieron con proveedores de la región. Para la prueba de producción de gas *in vitro* se utilizó el pasto Pará (*Brachiaria mutica* Stapf), el cual se cosechó con 45 días de rebrote. A los sustratos se determinó el porcentaje de materia seca de acuerdo con el método 930.15 (Association of Analytical Chemists [AOAC], 2016).

Estos se molieron en un molino de grano manual (Estrella, Puebla, México) para disminuir el tamaño de la partícula, posteriormente en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, New Jersey) con criba de 1 mm. A los sustratos se determinó el contenido de nitrógeno mediante la metodología Kjeldahl según el método 976.05 (AOAC, 2016), el resultado se multiplicó por el factor 6.25 para determinar proteína cruda, contenido de cenizas (Ce) según el método 942.05 (AOAC, 2016), fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) (Van Soest et al., 1991). La materia orgánica (MO) se estimó al restarle a 100 el porcentaje de cenizas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Análisis químico de los sustratos usados para la obtención de consorcios bacterianos celulíticos y de la prueba de producción de gas *in vitro*. Guerrero, México, 2024.

**Table 1.** Chemical analysis of the substrates used to obtain cellulolytic bacterial consortia and the *in vitro* gas production test. Guerrero, México, 2024.

| Sustratos          | MS (%) | MO (%) | PC (%) | FDN (%) | FDA (%) | Ce (%) |
|--------------------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
| Aserrín molido     | 95,8   | 97,1   | 1,7    | 92,6    | 77,6    | 2,9    |
| Pasto Pará 45 días | 24,5   | 87,8   | 8,5    | 85,9    | 51,8    | 12,2   |
| Pasto Mulato       | 96,7   | 93,0   | 3,5    | 69,6    | 39,3    | 7,0    |
| Tallo de Mulato    | 96,2   | 96,4   | 1,2    | 92,2    | 63,0    | 3,6    |

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PC: proteína cruda; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; Ce: cenizas. / MS: dry matter; MO: organic matter; PC: crude protein; FDN: neutral detergent fiber; FDA: acid detergent fiber; Ce: ash.

## Medio de cultivo

El medio contenía 30 mL de fluido ruminal clarificado [fluido ruminal fresco de una vaca de la raza Suiz-bu centrifugado a  $12,857 \times g$  durante 10 min y esterilizado en autoclave (All American® 1941X, USA) a 15 min a 121 °C y 15 psi], 5 mL de solución mineral I [6 g  $K_2HPO_4$  (SigmaAldrich®) en 1 L 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 (SigmaAldrich®) + 2,45 g  $MgSO_4$  (Sigma-Aldrich®) + 1,6 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Sigma-Aldrich®) en 1 L de agua destilada], 0,1 mL de resazurina a 0,1 % (SigmaAldrich®), 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 (SigmaAldrich®) en 15 mL de 2N NaOH (Meyer®) + 2,5 g de  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (Merck®) aforado a 100 mL de agua destilada], 5 mL de solución  $Na_2CO_3$  (Merck®) a 8 % y 52,6 mL de agua destilada. El medio se esterilizó durante 15 min a 121 °C y 15 psi (Sánchez-Santillán et al., 2020).

### Obtención de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales

En tubos de ensayo (15 x 150 mm) se agregaron 0,1 g de aserrín molido estéril, 1 cm de tallo de pasto Mulato estéril o 0,1 g de pasto Mulato molido estéril y 8 mL de medio de cultivo estéril. Los tubos de ensayo con sustrato y medio de cultivo se mantuvieron incubados en una incubadora (Ecoshel® 9082) a 39 °C por 24 h para comprobar esterilidad. Posteriormente, se inocularon con 2 mL de fluido ruminal obtenido de una vaca fistulada de la raza Suiz-bu (*Bos indicus* x *Bos taurus*; 50 % Pardo Suizo y 50 % Brahman) según la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Suiz-Bú de Registro (<http://www.asociacionsuiz-bu.com.mx/>).

El fluido se centrifugó 3 min a 9710 x g (Metrix Dynamica® Velocity 14 Centrifuge) y se usó el sobrenadante como inóculo. Para la inoculación y elaboración del medio de cultivo se usó flujo de CO<sub>2</sub> continuo para mantener condiciones de anaerobiosis. Los tubos inoculados se incubaron a 39 °C por 72 h; transcurridas las 72 h, se transfirieron 2 mL a otro tubo de ensayo con el mismo tipo de sustrato; este proceso se repitió diez veces para obtener los consorcios bacterianos celulíticos ruminales de aserrín (CBCa), pasto Mulato molido (CBCm) y de tallo de pasto Mulato (CBCt).

### Producción de inóculo de los consorcios bacterianos celulolíticos ruminales

En viales serológicos (120 mL) se colocaron 80 mL de medio de cultivo, se esterizaron a 121 °C y 15 psi durante 15 min y se incubaron a 39 °C por 24 h para verificar esterilidad. Posteriormente, se inocularon con 5 mL de un tipo de CBC (CBCa, CBCm o CBCt) y se incubaron a 39 °C por 72 h. Se realizaron 2 ensayos *in vitro*: a) Primero se evaluaron los CBC como inóculo teniendo los siguientes tratamientos i) CBCa = 10 mL de CBC obtenido de aserrín molido como sustrato; ii) CBCm = 10 mL de CBC obtenido de pasto Mulato molido como sustrato; y iii) CBCt = 10 mL de CBC obtenido de tallo de pasto Mulato como sustrato.

Luego, se simuló la manipulación de la microbiota ruminal (MR) con los CBC y sus combinaciones teniendo los siguientes tratamientos i) MR = 10 mL de fluido ruminal fresco, el cual se centrifugó 3 min a 3000 rpm y se usó como el inóculo de la microbiota ruminal; ii) MR-CBCa = 10 mL de MR y 5 mL de CBCa; iii) MR-CBCm = 10 mL de MR y 5 mL de CBCm; iv) MR-CBCt = 10 mL de MR y 5 mL de CBCt.

### Técnica de producción de gas *in vitro*

En viales serológicos de 120 mL se agregaron 0,5 g de pasto Pará de 45 días de rebrote y 40 mL de medio de cultivo anaerobio, todo ello bajo flujo de CO<sub>2</sub> para mantener las condiciones de anaerobiosis. Los viales se inocularon con 10 mL de un tipo de tratamiento en cada ensayo y se incubaron (Ecoshel® 9082) a 39 °C por 72 h. La producción de biogás se midió mediante 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. Se usaron tres viales blancos como factor de corrección en la producción de biogás para cada hora medida (Hernández-Morales et al., 2018).

El medio contenía: 45,9 % de agua destilada, 30 % de líquido ruminal clarificado, 5,0 % de solución mineral I [6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (SigmaAldrich®) en 1 L de agua destilada], 5,0 % de solución mineral II [6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SigmaAldrich®) + 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck®) + 12 g NaCl (SigmaAldrich®) + 2,45 g MgSO<sub>4</sub> (SigmaAldrich®) + 1,6 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (SigmaAldrich®) en 1 L de agua destilada], 5,0 % de solución buffer [60 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (J. T. Baker) en 1 L de agua destilada], 0,1 % de resazurina al 0,1 % (SigmaAldrich®) y 4,0 % de solución reductora [(100 mL) L-cisteína (SigmaAldrich) 0,1 g; Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (Meyer), 0,1 g; NaOH (1N; Meyer), 4 mL].

## Degradación de la materia seca (DMS)

En filtros de poli seda (10 cm diámetro) a peso contante se filtró la muestra residual del biodigestor a las 24, 48 y 72 h (3 repeticiones por tratamiento y tiempo de incubación). Los filtros con muestra se secaron a 60 °C por 72 h en una estufa. La DMS se calculó con la ecuación 1 (Sánchez-Santillán et al., 2015).

$$\text{DMS (\%)} = (\text{muestra inicial} - \text{muestra residual} / \text{muestra inicial}) * 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

## Actividad enzimática celulasas

La actividad enzimática celulasas se midió usando el método azúcares reductores descrito por Miller (1959). Se tomaron 2 mL del medio de cultivo del vial inoculado a las 24, 48 y 72 h y se colocaron en viales Eppendorf. Estos se centrifugaron por 25 min a 9,710 x g y 4 °C, el sobrenadante se recuperó y usó como extracto enzimático (EE). El sustrato fue carboximetilcelulosa (CMC; Sigma Aldrich®) a 0,5 % (2,5 g de carboximetilcelulosa aforado a 500 mL con amortiguador de citratos 50 mM y pH 4,8 [10,507 g ácido cítrico (Meyer®) aforado a 1 L con amortiguador de citratos 50 mM y pH 4,8].

La mezcla de reacción de cada muestra contenía 0,9 mL de CMC 0,5 % y 0,1 mL de EE (se realizó por duplicado cada muestra). A continuación, se incubaron 30 min a 50 °C; posterior, se agregaron 1,5 mL de solución DNS [14 g NaOH (Meyer®) + 5,9 g de metabisulfito de Na (Meyer®) + 29 g tartrato de Na y K (Meyer®) + 1 g de ácido dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich®) + 5,8 mL de fenol líquido (Golden Bell Reactivos®) aforado a 1 L con agua destilada] y se hirvió por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente de agua helada.

Para cada muestra se preparó un blanco con 0,9 mL de CMC 0,5 %, se incubó 30 min a 50 °C, se agregaron 1,5 mL de solución DNS y 0,1 mL de EE; se hirvió por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente de agua helada. Las muestras y los blancos se midieron a una absorbancia de 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway® 6850, Reino Unido). Una unidad se definió como la cantidad de enzimas que libera 1 µmol / min de glucosa. La curva estándar se preparó con una solución glucosa 10 mM [0,18 g de dextrosa (Merk®) aforado con 100 mL de amortiguador de citratos 50 mM y pH 4,8].

## Análisis estadístico

Las variables de producción parcial y acumulado de biogás, degradación de materia seca y actividad enzimática de las celulasas *in vitro* se analizaron en un diseño completamente al azar. La comparación de medias fue con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). El software que se usó para el análisis fue InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

## Resultados

### Ensayo 1

El CBCa produjo la mayor producción de biogás de las 0 a 24 h; la producción de biogás de 24 a 48 h fue del CBCt y de las 48 a 72 h, el CBCa y CBCt produjeron el mayor biogás ( $p < 0,05$ ) con un promedio de 21,5 mL / g MS. Referente a la DMS, a las 24 h, los CBCa y CBCt mostraron mayor degradación ( $p < 0,05$ ) con un promedio de 25,9 %; mientras que a las 48 h no hubo diferencias entre tratamientos ( $p > 0,05$ ) y a las 72 h el CBCa mostró la mayor DMS. La actividad enzimática celulasas a las 24 y 48 h no presentó diferencias entre tratamientos ( $p > 0,05$ ); pero, a 72 h CBCa mostró mayor actividad ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Características fermentativas *in vitro* de pasto Pará con 45 días de rebrote inoculado con tres inóculos de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales procedentes de distinto sustrato. Guerrero, México, 2024.

**Table 2.** *In vitro* fermentative characteristics of Pará grass with 45 days of regrowth inoculated with three inocula of rumen cellulolytic bacterial consortia from different substrates. Guerrero, Mexico, 2024.

| Variables                                       | Tipo de inóculo |         |         | Valor p | EEM  |
|-------------------------------------------------|-----------------|---------|---------|---------|------|
|                                                 | CBCa            | CBCm    | CBCt    |         |      |
| Producción de biogás (mL/g MS)                  |                 |         |         |         |      |
| 0 a 24 h                                        | 42,6 a          | 12,0 b  | 12,3 b  | 0,0256  | 5,3  |
| 24 a 48 h                                       | 8,67 b          | 2,0 c   | 13,3 a  | <0.0001 | 1,7  |
| 48 a 72 h                                       | 22,7 a          | 12,0 b  | 21,3 a  | 0.0009  | 1,8  |
| Acumulado                                       | 73,9 a          | 26,0 b  | 62,0    | 0.0012  | 7,6  |
| Degradación de materia seca <i>in vitro</i> (%) |                 |         |         |         |      |
| 24 h                                            | 25,0 a          | 20,2 b  | 26,8 a  | 0,0003  | 1,0  |
| 48 h                                            | 28,4            | 28,7    | 27,6    | 0,3538  | 0,3  |
| 72 h                                            | 54,9 a          | 29,6 c  | 34,0 b  | <0.0001 | 3,9  |
| Actividad enzimática celulasa (mU/mL)           |                 |         |         |         |      |
| 24 h                                            | 207,6           | 199,3   | 205,5   | 0,4509  | 2,6  |
| 48 h                                            | 203,6           | 204,2   | 243,0   | 0,5726  | 16,0 |
| 72 h                                            | 537,6 a         | 201,2 b | 208,2 b | <0.0001 | 55,9 |

a,b,c Medias con letras distintas entre filas difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). EEM: error estándar de la media; CBCa: Consorcio bacteriano celulolítico obtenido de aserrín; CBCm: Consorcio bacteriano celulolítico obtenido de pasto mulato molido; CBCt: Consorcio bacteriano celulolítico obtenido de tallo de pasto mulato / a,b,c Means with different letters between rows differ significantly ( $p < 0.05$ ). EEM: standard error of the mean; CBCa: Cellulolytic bacterial consortium obtained from sawdust; CBCm: Cellulolytic bacterial consortium obtained from ground mulatto grass; CBCt: Cellulolytic bacterial consortium obtained from mulatto grass stems.

## Ensayo 2

Los tratamientos mostraron que de las 0 a 24 y de 48 a 72 h de incubación ninguno de los CBC aislados mejoraron la producción parcial de biogás ( $p > 0,05$ ); aunque el tratamiento MR-CBCt mejoró 27,4 % la producción parcial de biogás que MR-CBCm ( $p < 0,05$ ) de las 0 a 24 h; en contraste, MR-CBCm produjo 37,5 % más biogás parcial a las 48 a 72 h. La producción parcial de biogás de las 24 a 48 h no presentó diferencia entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), con un promedio de 24,4 mL g<sup>-1</sup> MS. Sin embargo, la producción acumulada indicó que el tratamiento MR-CBCm aumento 13,8 % la producción acumulada de biogás a las 72 h que MR ( $p < 0,05$ ; Cuadro 3).

La DMS a las 24, 48 y 72 h de incubación no mostraron diferencias entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), de modo que promediaron una DMS de 49,0, 55,9 y 59,9 %, respectivamente. Los tratamientos a las 24 h de incubación mostraron que ninguno mejoró la actividad enzimática celulasa. Esto porque MR no presentó diferencias con el resto de los tratamientos ( $p > 0,05$ ).

Sin embargo, MR-CBCm produjo 23,1 % más actividad enzimática celulasa que MR-CBCa y MR-CBCt ( $p < 0,05$ ). A las 48 h de incubación, la actividad enzimática celulasa no presentó diferencias entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), con un promedio de 205,4 mU/mL. A las 72 h, MR-CBCm presentó 36,3 y 20,2 % mayor actividad enzimática celulasa que MR y MR-CBCt; además MR-CBCt produjo 13,4 % más actividad enzimática celulasa que MR ( $p < 0,05$ ; Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Características fermentativas *in vitro* de una simulación sobre la manipulación de la microbiota ruminal usando inóculos de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales obtenidos de diferente sustrato en la fermentación *in vitro* de pasto Pará con 45 días de rebrote. Guerrero, México, 2024.

**Table 3.** *In vitro* fermentative characteristics of a simulation on the manipulation of rumen microbiota using inocula of rumen cellulolytic bacterial consortia obtained from different substrate in the *in vitro* fermentation of Pará grass with 45 days of regrowth. Guerrero, Mexico, 2024.

| Variables                                       | Tipo de inóculo |          |         |          | Valor p | EEM |
|-------------------------------------------------|-----------------|----------|---------|----------|---------|-----|
|                                                 | MR              | MR-CBCa  | MR-CBCm | MR-CBCt  |         |     |
| Producción de biogás (mL/g MS)                  |                 |          |         |          |         |     |
| 0 a 24 h                                        | 86,6 ab         | 96,6 ab  | 80,2 b  | 102,2 a  | 0,0057  | 2,9 |
| 24 a 48 h                                       | 21,3            | 26,9     | 22,1    | 27,3     | 0,0696  | 0,9 |
| 48 a 72 h                                       | 17,3 ab         | 18,7 ab  | 22,0 a  | 16,0 b   | 0,0249  | 0,8 |
| Acumulado                                       | 129,9 b         | 136,8 ab | 147,8 a | 137,8 ab | 0,0179  | 2,3 |
| Degradación de materia seca <i>in vitro</i> (%) |                 |          |         |          |         |     |
| 24 h                                            | 49,0            | 49,1     | 48,0    | 50,0     | 0,2737  | 0,3 |
| 48 h                                            | 53,5            | 55,2     | 56,3    | 58,5     | 0,0925  | 0,8 |
| 72 h                                            | 60,8            | 59,9     | 59,7    | 59,1     | 0,1142  | 0,3 |
| Actividad enzimática celulasa (mU/mL)           |                 |          |         |          |         |     |
| 24 h                                            | 269,7 ab        | 242,5 bc | 286,5 a | 222,9 c  | 0,0009  | 8,0 |
| 48 h                                            | 204,8           | 202,0    | 205,3   | 209,3    | 0,4507  | 1,5 |
| 72 h                                            | 189,3 c         | 193,4 c  | 258,0 a | 214,7 b  | <0.0001 | 8,4 |

a,b,c Medias con letras distintas entre filas difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). MR: microbiota ruminal; CBCa: Consorcio bacteriano celulolítico obtenido de aserrín; CBCm: Consorcio bacteriano celulolítico obtenido de pasto mulato molido; CBCt: Consorcio bacteriano celulolítico obtenido de tallo de pasto mulato; EEM: error estándar de la media. / a,b,c Means with different letters between rows differ significantly ( $p < 0.05$ ). MR: rumen microbiota; CBCa: Cellulolytic bacterial consortium obtained from sawdust; CBCm: Cellulolytic bacterial consortium obtained from ground mulatto grass; CBCt: Cellulolytic bacterial consortium obtained from mulatto grass stems; EEM: standard error of the mean.

## Discusión

El biogás que se cuantifica con la técnica de producción de gas se debe a la fermentación de los carbohidratos, ya que por la metodología de su implementación, la degradación de la proteína y lípidos no es cuantificable (Amanzougarene & Fondevila, 2020). De modo que, la producción de biogás permite saber el tipo de carbohidratos que se fermentan (Texta et al., 2019). El objetivo del primer ensayo fue aislar consorcios bacterianos celulolíticos ruminales (CBC) usando como sustrato diferentes fuentes de fibra, por lo que la producción de biogás indica indirectamente el tipo de carbohidratos que usaron los CBC según su capacidad de fermentación.

En el caso del CBCa y CBCm, la producción de biogás indica que probablemente el CBC está integrado por bacterias con capacidad de degradar carbohidratos estructurales y no estructurales. En el caso del CBCt, está integrado primordialmente de bacterias con capacidad de fermentar carbohidratos estructurales, ya que la producción parcial de biogás de 48 a 72 h fue 82,0 % mayor que de las 0 a 24 h.

Lo anterior se asume porque los carbohidratos no estructurales se fermentan en las primeras 24 h, y posteriormente se fermentan los carbohidratos estructurales (Texta et al., 2019). Valores superiores de producción de gas a los inóculos CBCt (123 mL/g de MS) y CBCm (187 mL/g de MS), e inferiores a CBCa (91 mL/g de MS) fueron encontrados en biodigestores que tenían pasto mulato como sustrato (Hernández-Sánchez et al., 2022).

Las diferencias entre los tratamientos del presente estudio y del autor que se usó para comparar los resultados se atribuyen al origen y densidad de la población de los microorganismos y la eficiencia de uso del sustrato por los microorganismos (Torres-Salado et al., 2019).

La DMS indica la degradación de los nutrientes del sustrato, el tiempo de degradación y el tipo de microorganismos que lo degradan. De modo que la conformación de las bacterias de los CBC (CBCa, CBCm y CBCt) influyen en la eficiencia del uso del pasto Pará con 45 d de rebrote (Torres-Salado et al., 2019).

Valores inferiores en DMS de pasto Mulato se publicaron usando como inóculo un CBC obtenido de aserrín (41,42 %), pero superiores cuando se usó un CBC de pasto molido (59,88 %) y tallo (49,11 %) (Hernández-Sánchez et al., 2022). Los sustratos celulósicos como el pasto Mulato se degradan por acción de una mezcla de enzimas hidrolíticas como celulasas. Estas enzimas complejas comprenden enzimas endógenas (endoglucanasa) y exógenas (celobiohidrolasa) que actúan sinérgicamente (Azhar et al., 2024).

En la actividad enzimática celulasas se reportaron valores inferiores a las 72 h en la fermentación de pasto Mulato con un inóculo de un CBC obtenido de aserrín (215,2 mU/mL) y superiores en CBC obtenido de pasto Mulato molido (317,9 mU / mL) (Hernández-Sánchez et al., 2022). La relación que hay entre la actividad celulosa y la DMS (Cuadro 2) del pasto Mulato con el CBC aislado del aserrín, indica que en el CBC se seleccionaron bacterias para que en conjunto produjeran las celulasas necesarias para degradar los carbohidratos estructurales del pasto Mulato (Isnawati et al., 2024; Kamusoko & Mukumba, 2024).

La comunidad microbiana del rumen está especializada en degradar biomasa lignocelulósica; además degradar sustratos fibrosos complejos en sacáridos fermentables (Palmonari et al., 2024). La simulación de la manipulación de la microbiota ruminal en la técnica de producción de gas *in vitro* es determinar el comportamiento de los CBC cuando se adicionan. De modo que, la adición de CBCm a la MR (MR-CBCm) mejoró la eficiencia de la fermentación de los carbohidratos estructurales y no estructurales; ya que los valores de producción acumulada de biogás fueron mayores en MR-CBCm que MR ( $p < 0,05$ ). En contraste, el resto de los CBC evaluados no presentaron efecto en la producción de biogás parcial y acumulada con respecto a MR.

Esto indica que no se presentó un aumento de la población de las bacterias celulolíticas, dado que la fermentación de carbohidratos por estas bacterias produce componentes gaseosos como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, que contribuyen a la producción de biogás (Takors et al., 2018) y según el tipo de bacterias es el tipo de carbohidratos que fermentan (Darwin & Cord-Ruwisch, 2018). La producción de biogás acumulado a 72 h de MR (42,38 mL/g de MS) se logró mejorar en un 21,3 y 23,6 % cuando adicionaron a MR un CBC obtenido de un bovino cebuino (51,44 mL/g de MS) o de un CBC obtenido de una búfala de agua (52,37 mL/g de MS) (Torres-Salado et al., 2019); comportamiento similar del tratamiento mulato del presente estudio.

Actualmente, se considera que los consorcios microbianos son más efectivos para la degradación de material celulósico (Kamusoko & Mukumba, 2024). Además, agregar consorcio microbiano específico con capacidades lignocelulolíticas es una táctica prometedora para mejorar la degradación de la lignocelulosa (Basak et al., 2025). Sin embargo, en el presente estudio, la microbiota ruminal celulolítica no se modificó con la adición de los CBC aislados que pudieran mejorar la DMS. Así mismo, la microbiota ruminal tiene la capacidad de restaurar su estructura poblacional cuando se los somete a diferentes perturbaciones (Palmonari et al., 2024).

Situación similar en la DMS con la manipulación de microbiota ruminal usando CBC obtenido de un bovino cebuino reportaron Torres-Salado et al. (2019), estos autores indicaron que la DMS a 72 h de la microbiota ruminal fue de 69,70 %, mientras que cuando se adicionó a la MR el CBC fue de 70,11 %. Las enzimas celulasas trabajan de forma sinérgica para descomponer los polisacáridos vegetales complejos (Srivastava & Dafale, 2024). Por lo que la actividad enzimática de las celulasas del presente estudio se asume a la complejidad de los CBC; pero la alimentación cruzada que se presentó entre MR y MR-mulato fue eficiente en la producción de celulasas para el uso de productos finales específicos (Palmonari et al., 2024).

## Conclusiones

La simulación de la manipulación de la microbiota ruminal con los consorcios bacterianos celulolíticos a nivel laboratorio mostró que el obtenido del pasto Mulato mejoró solo la producción de biogás y la actividad enzimática celulasas, porque la degradación de la materia seca no se modificó. A nivel de aislamiento *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos, el sustrato aserrín molido es prometedor, ya que los consorcios tuvieron mejor producción de biogás, degradación de materia seca y producción de enzimas.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses con el presente estudio y manuscrito.

## Referencias

- Amanzougarene, Z., & Fondevila, M. (2020). Fitting of the *in vitro* gas production technique to the study of high concentrate diets. *Animals*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ani10101935>
- Association of Analytical Chemists. (2016). *Official methods of analysis* (20<sup>th</sup> ed.). AOAC International
- Azhar, S., Aihetasham, A., Chaudhary, A., Hussain, Z., Abdul Rehman, R., Abbas, G., Alharbi, S. A., Ansari, M. J., & Qamer, S. (2024). Cellulolytic and ethanogenic evaluation of heterotermes indicola's gut-associated bacterial isolates. *ACS Omega*, 9(10), 12084-12100. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10030>
- Basak, B., Kumar, R., Tanpure, R. S., Mishra, A., Tripathy, S. K., Chakraborty, S., Roh, H.-S., Yadav, K. K., Chung, W., & Jeon, B.-H. (2025). Roles of engineered lignocellulolytic microbiota in bioaugmenting lignocellulose biomethanation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 207, Article 114913. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114913>
- Carhuapoma-Delacruz, V., Auqui-Achante, G. S., Valencia-Mamani, N., Gonzales-Huamán, T. J., Guillen-Domínguez, H. M., & Esparza, M. (2021). Bacterias fibrolíticas aisladas de rumen de alpaca, ovino y vacuno con capacidad biodegradadora de celulosa. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 32, 1-7. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32094>
- Contextoganadero. (2022). ¿Ha escuchado hablar de la raza bovina Suiz-Bú y su importancia en zonas tropicales?. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/ha-escuchado-hablar-de-la-raza-bovina-suiz-bu-y-su-importancia-en-zonas> (consultado 20 nov. 2024).
- Culp, E. J., & Goodman, A. L. (2023). Cross-feeding in the gut microbiome: ecology and mechanisms. *Cell Host & Microbe*, 31(4), 485-499. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.016>
- Darwin, B. A., & Cord-Ruwisch, R. (2018). *In vitro* rumen fermentation of soluble and non-soluble polymeric carbohydrates in relation to ruminal acidosis. *Annals of Microbiology*, 68(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1307-x>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *Infostat* (Versión 2020) [software]. Centro de Transferencia InfoStat. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=15>
- Duncker, K. E., Holmes, Z. A., & You, L. (2021). Engineered microbial consortia: Strategies and applications. *Microbial Cell Factories*, 20(1), Article 211. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01699-9>

- Gharechahi, J., Vahidi, M. F., Sharifi, G., Ariaenejad, S., Ding, X.-Z., Han, J.-L., & Salekdeh, G. H. (2023). Lignocellulose degradation by rumen bacterial communities: New insights from metagenome analyses. *Environmental Research*, 229, Article 115925. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115925>
- Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A. R., Reyes-Vázquez, I., & Mendoza-Núñez, M. A. (2018). Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 105-120. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4332>
- Hernández-Sánchez, D., Herrera-Pérez, J., López Garrido, S. J., Torres-Salado, N., & Sánchez-Santillán, P. (2022). Producción de biogás y características fermentativas *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales obtenidos de diferentes fibras. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(3), Article 107. <https://doi.org/10.56369/tsaes.4127>
- Isnawati, I., Lisdiana, L., Asri, M. T., & Trimulyono, G. (2024). Biodiversity of cellulolytic bacteria isolated from fermentodege for ruminants. *BIOTROPIA*, 31(2), Article 2. <https://doi.org/10.11598/btb.2024.31.2.1904>
- Kamusoko, R., & Mukumba, P. (2024). Effect of biological pre-treatment with cellulolytic bacteria consortium on biogas production from crop residues. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 12(8), 68-73. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2023.1208.008>
- Liang, J., Zhang, R., Chang, J., Chen, L., Nabi, M., Zhang, H., Zhang, G., & Zhang, P. (2024). Rumen microbes, enzymes, metabolisms, and application in lignocellulosic waste conversion—A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 71, Article 108308. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108308>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Palmonari, A., Federiconi, A., & Formigoni, A. (2024). Animal board invited review: The effect of diet on rumen microbial composition in dairy cows. *animal*, 18(10), Article 101319. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101319>
- Sánchez-Santillán, P., Herrera-Pérez, J., Torres-Salado, N., Almaraz-Buendía, I., Reyes-Vázquez, I., Rojas-García, A. R., Gómez-Trinidad, M., Contreras-Ramírez, E. O., Maldonado-Peralta, M. Á., & Magadan-Olmedo, F. (2020). Chemical composition, and *in vitro* fermentation of ripe mango silage with molasses. *Agroforestry Systems*, 94(4), 1511-1519. <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00442-z>
- Sánchez-Santillán, P., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L., Santellano-Estrada, E., & Alarcón-Zúñiga, B. (2015). Fibrinolytic activity and gas production by *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius*—EUM1 in bagasse cane. *Revista MVZ Córdoba*, 20(supl), 4907-4916. <https://doi.org/10.21897/rmvz.6>
- Srivastava, S., & Dafale, N. A. (2024). Tailored microbial consortium producing hydrolytic enzyme cocktail for maximum saccharification of wheat straw. *Bioresource Technology*, 399, Article 130560. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130560>
- Takors, R., Kopf, M., Mampel, J., Bluemke, W., Blombach, B., Eikmanns, B., Bengelsdorf, F. R., Weuster-Botz, D., & Dürre, P. (2018). Using gas mixtures of CO, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as microbial substrates: The do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. *Microbial Biotechnology*, 11(4), 606-625. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13270>

- Texta, J. N., Sánchez-Santillán, P., Hernández, D. S., Torres, N. S., Crosby, M. G., Rojas-García, R. A., Herrera, J. P., & Maldonado-Peralta, M. (2019). Use of disaccharides and activated carbon to preserve cellulolytic ruminal bacterial consortiums lyophilized. *Revista MVZ Córdoba*, 24(3), 7305-7313. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1412>
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Rojas-García, R. A., Almaraz-Buendía, I., Herrera-Pérez, J., Reyes-Vázquez, I., & Mayren-Mendoza, F. J. (2019). *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Suiz-bu cow. *Agrociencia*, 53(2), 145-159.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., & Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 833-847. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>

Manuscrito aceptado