Agronomía Mesoamericana

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Artículo científico

Volumen 36: Artículo 62973, 2025
e-ISSN 2215-3608, https://doi.org/10.15517/am.2025.62973

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

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

Paulino Sánchez-Santillán[1], Vianey Salas-Cirilo[1], Nicolás Torres-Salado[1], Jerónimo Herrera-Pérez[1]

* 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.

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

Resumen

Introducción. El aislamiento y la 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 efectuaron dos ensayos *in vitro*: a) evaluación de los CBC obtenidos, y b) adición de los CBC a la MR. En ambos se midió la 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 la actividad enzimática celulolítica (AEC) se midieron 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 la AEC no mostraron diferencias entre CBC ($p > 0,05$). En el ensayo 2, se observó 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 ($p > 0,05$); sin embargo, la adición del CBCm aumentó 13,8 y 36,3 % la producción acumulada de biogás y la AEC a 72 h, respectivamente. **Conclusión.** Los CBC obtenidos del pasto Mulato permiten manipular la MR tras una simulación *in vitro* en las condiciones específicas de este estudio.

Palabras clave: biogás, degradación, actividad enzimática, producción de gas, rumen

Abstract

Introduction. The isolation and manipulation of rumen cellulolytic bacterial consortia (CBC) enhance fiber degradation under *in vitro* conditions. **Objective.** To obtain CBC from different substrates and simulate ruminal microbiota (RM) manipulation through *in vitro* gas production test. **Materials and methods.** The study was conducted

© 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 o pccmca@gmail.com

from January to June 2024 at the Autonomous University of Guerrero, Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico. CBC were obtained from rumen fluid using selective culture media with three distinct substrates: ground sawdust (CBCa), Mulatto grass stalk (CBCt), and ground Mulatto grass (CBCm). Two *in vitro* assays were performed: a) evaluation of the CBC obtained, and b) addition of the CBC to RM. Both assays measured partial biogas production at intervals 0 to 24 h, 24 to 48 h, and 48 to 72 h, and cumulative production. Dry matter degradation (DMD) and cellulolytic enzyme activity (CEA) were assessed at 24, 48, and 72 h. Variables were analyzed in a completely randomized design. **Results.** In trial 1, CBCa demonstrated superior cumulative biogas production ($p < 0.05$); DMD at 24 and 72 h was higher for CBCa ($p < 0.05$); DMD at 48 h and CEA showed no significant differences among CBC ($p > 0.05$). In trial 2, the addition of CBC to RM did not significantly alter partial biogas production, DMD at 24, 48, and 72 h, nor CEA at 24 and 48 h ($p > 0.05$). However, the addition of CBCm increased 13.8 and 36.3 % the cumulative biogas production and CEA at 72 h, respectively. **Conclusion.** CBC obtained from Mulatto grass demonstrated potential for RM manipulation under the specific *in vitro* conditions of this 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), ya que la microbiota ruminal sintetiza diversas enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular de las plantas (Gharechahi et al., 2023). 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 relevantes 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 los carbohidratos poliméricos se transforman en compuestos sencillos como ácidos grasos y alcoholes a través de un complejo enzimático celulósico y la excreción de celulasas extracelulares (Carhuapoma-Delacruz et al., 2022). Un consorcio microbiano está formado por comunidades con múltiples poblaciones que coexisten y se comunican intercelularmente mediante el *quorum sensing* (QS) o la expresión de bacteriocinas, con la finalidad de mitigar la 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 son esenciales para formular estrategias de manipulación de la fermentación ruminal orientadas a 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) por medio de 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 celulolíticos 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 con aproximadamente 300 días de rebrote, adquiridas con proveedores de la región. Para la prueba de producción de gas *in vitro* se utilizó pasto Pará (*Brachiaria mutica* Stapf), cosechado con 45 días de rebrote. El porcentaje de materia seca de los sustratos se determinó de acuerdo con el método 930.15 (Association of Analytical Chemists [AOAC], 2016).

Los sustratos se molieron en un molino de grano manual (Estrella, Puebla, México) para disminuir el tamaño de la partícula, y posteriormente en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, New Jersey) con criba de 1 mm. El contenido de nitrógeno de los sustratos se determinó mediante la metodología Kjeldahl según el método 976.05 (AOAC, 2016), y 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 restando a 100 el porcentaje de cenizas (Cuadro 1).

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

Table 1. Chemical composition analysis of substrates used to obtain cellulolytic bacterial consortia and the *in vitro* gas production assessment. 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 × *g* durante 10 min y esterilizado en autoclave [All American® 1941X, USA] durante 15 min a 121 °C y 15 psi), 5 mL de solución mineral I (6 g K_2HPO_4 [Sigma-Aldrich®] 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 [Sigma-Aldrich®] + 2,45 g $MgSO_4$ [Sigma-Aldrich®] + 1,6 g CaCl-$2H_2O$ [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-$9H_2O$ [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 × 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 con sustrato y medio de cultivo se mantuvieron incubados en una incubadora (Ecoshel® 9082) a 39 °C durante 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* × *Bos taurus*; 50 % Pardo Suizo y 50 % Brahman) según registro de 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 × g (Metrix Dynamica® Velocity 14 Centrifugue) y se usó el sobrenadante como inóculo. Para la inoculación y elaboración del medio de cultivo se empleó flujo continuo de CO_2 para mantener condiciones de anaerobiosis. Los tubos inoculados se incubaron a 39 °C durante 72 h; transcurrido este tiempo, 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 celulolíticos ruminales de aserrín (CBCa), pasto Mulato molido (CBCm) y 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 esterilizaron 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 durante 72 h.

Se realizaron dos ensayos *in vitro*. En el primero, se evaluaron los CBC como inóculo, con 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. En el segundo ensayo, se simuló la manipulación de la microbiota ruminal (MR) con los CBC y sus combinaciones, con los siguientes tratamientos i) MR = 10 mL de fluido ruminal fresco, el cual se centrifugó por 3 min a 3000 rpm y se usó como 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, y 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_2 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_2HPO_4 [Sigma-Aldrich®] en 1 L de agua destilada), 5,0 % de solución mineral II (6 g KH_2PO_4 [Sigma-Aldrich®] + 6 g $[NH_4]_2SO_4$ [Merck®] + 12 g NaCl [Sigma-Aldrich®] + 2,45 g $MgSO_4$ [Sigma-Aldrich®] + 1,6 g CaCl-$2H_2O$ [Sigma-Aldrich®] en 1 L de agua destilada), 5,0 % de solución buffer (60 g de Na_2CO_3 [J. T. Baker] en 1 L de agua destilada), 0,1 % de resazurina al 0,1 % (Sigma-Aldrich®) y 4,0 % de solución reductora ([100 mL] L-cisteína [Sigma-Aldrich], 0,1 g; Na2S-$9H_2O$ [Meyer], 0,1 g; NaOH [1N; Meyer], 4 mL).

ISSN 2215-3608 https://doi.org/10.15517/am.2025.62973

Degradación de la materia seca (DMS)

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

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

Actividad enzimática de las celulasas

La actividad enzimática de celulasas se midió usando el método de 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 durante 25 min a 9,710 × 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 aforados 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). A continuación, se incubaron 30 min a 50 °C; posteriormente, 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®) aforados a 1 L con agua destilada], se hirvieron por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente con 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; luego, se hirvieron por 5 min e inmediatamente se colocaron en un recipiente con 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 [Merck®] aforada 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 se llevó a cabo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El programa informático utilizado para el análisis fue InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

Resultados

Ensayo 1

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

presentó diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$); sin embargo, a las 72 h se observó mayor actividad en el CBCa ($p < 0,05$) (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 distintos sustratos. Guerrero, México, 2024.

Table 2. *In vitro* fermentation characteristics of 45-day regrowth Pará grass 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 *in vitro* (%)					
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

Medias con letras distintas (a, b, c) 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. / Means with different letters (a, b, c) 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 0 a 24 h y de 48 a 72 h de incubación, ninguno de los CBC aislados mejoró la producción parcial de biogás ($p > 0,05$); aunque el tratamiento MR-CBCt superó en 27,4 % la producción parcial de biogás de MR-CBCm ($p < 0,05$) de 0 a 24 h. En contraste, MR-CBCm produjo 37,5 % más biogás parcial de 48 a 72 h. La producción parcial de biogás de 24 a 48 h no presentó diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$), con un promedio de 24,4 mL g^{-1} MS. No obstante, la producción acumulada indicó que el tratamiento MR-CBCm aumentó 13,8 % la producción acumulada de biogás a las 72 h respecto a MR ($p < 0,05$; Cuadro 3).

La DMS a las 24, 48 y 72 h de incubación no mostró diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$), con promedios de 49,0, 55,9 y 59,9 %, respectivamente. A las 24 h de incubación, ningún tratamiento mejoró la actividad enzimática celulasa, ya que MR no presentó diferencias con el resto de los tratamientos ($p > 0,05$).

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 exhibió 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 % más actividad enzimática celulasa que MR y MR-CBCt, respectivamente; 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 distintos sustratos en la fermentación *in vitro* de pasto Pará con 45 días de rebrote. Guerrero, México, 2024.

Table 3. *In vitro* fermentation parameters of a simulation on the manipulation of rumen microbiota using inocula of rumen cellulolytic bacterial consortia obtained from different substrates 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 *in vitro* (%)						
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

Medias con letras distintas (a, b, c) 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. / Means with different (a, b, c) 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 carbohidratos, ya que, por la metodología de su implementación, la degradación de la proteína y los lípidos no es cuantificable (Amanzougarene & Fondevila, 2020). Por tanto, la producción de biogás permite inferir el tipo de carbohidratos que se fermentan (Texta Nogueda et al., 2019). El objetivo del primer ensayo fue aislar consorcios bacterianos celulolíticos ruminales (CBC) usando diferentes fuentes de fibra como sustrato.

La producción de biogás indica indirectamente los tipos de carbohidratos que usaron los CBC según su capacidad de fermentación. En el caso del CBCa y CBCm, la producción sugiere que probablemente el CBC está integrado por bacterias con capacidad de degradar carbohidratos estructurales y no estructurales. En cambio, el

CBCt estaría conformado principalmente por bacterias capaces de fermentar carbohidratos estructurales, debido a que su producción parcial de biogás entre las 48 y 72 h fue 82,0 % mayor que entre las 0 y 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 Nogueda et al., 2019). En un estudio en biodigestores con pasto Mulato como sustrato (Hernández-Sánchez et al., 2022), se encontraron valores superiores de producción de biogás que los obtenidos con los inóculos CBCt (123 mL/g de MS) y CBCm (187 mL/g de MS), e inferiores a CBCa (91 mL/g de MS). Las diferencias previas indicadas, 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 involucrados. Por lo tanto, la conformación de las bacterias de los CBC (CBCa, CBCm y CBCt) influye en la eficiencia del uso del pasto Pará con 45 días de rebrote (Torres-Salado et al., 2019).

Se han publicado valores inferiores de DMS en pasto Mulato usando como inóculo un CBC obtenido de aserrín (41,42 %), y superiores cuando se empleó 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 las celulasas. Estas enzimas complejas comprenden enzimas endógenas (endoglucanasa) y exógenas (celobiohidrolasa) que actúan de manera sinérgica (Azhar et al., 2024).

En cuanto a la actividad enzimática de las celulasas, a las 72 h se reportaron valores inferiores en la fermentación de pasto Mulato con un inóculo de 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 observada entre la actividad celulasa y la DMS (Cuadro 2) del pasto Mulato con el CBC aislado del aserrín indica que en el CBC se seleccionaron bacterias capaces de producir en conjunto las celulasas necesarias para degradar los carbohidratos estructurales del pasto Mulato (Isnawati et al., 2024; Kumar et al., 2024).

La comunidad microbiana del rumen está especializada en degradar biomasa lignocelulósica, además de transformar 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* permite determinar el comportamiento de los CBC cuando se adicionan. 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 en MR ($p < 0,05$). En contraste, el resto de los CBC evaluados no presentaron efecto en la producción de biogás parcial ni acumulada con respecto a MR.

Lo anterior indica que no hubo un aumento en la población de bacterias celulolíticas, dado que la fermentación de carbohidratos por estas bacterias produce componentes gaseosos como CO_2 e H_2 que contribuyen a la producción de biogás (Takors et al., 2018), y el tipo de bacterias determina el tipo de carbohidratos que fermentan (Darwin et al., 2018). La producción de biogás acumulado a 72 h de MR (42,38 mL/g de MS) se mejoró en un 21,3 y 23,6 % cuando se adicionó a MR un CBC, respectivamente, obtenidos de un bovino cebuino (51,44 mL/g de MS) y de una búfala de agua (52,37 mL/g de MS) (Torres-Salado et al., 2019), comportamiento similar al tratamiento Mulato de este estudio.

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

Una situación similar en la DMS con la manipulación de la microbiota ruminal usando un CBC obtenido de un bovino cebuino fue reportada por Torres-Salado et al. (2019), quienes indicaron que la DMS a 72 h de la microbiota

ruminal fue de 69,70 %, mientras que al adicionarse el CBC a la MR fue de 70,11 %. Las enzimas celulasas trabajan de forma sinérgica para descomponer los polisacáridos vegetales complejos (Srivastava & Dafale, 2024). Por lo tanto, la actividad enzimática de las celulasas en el presente estudio podría atribuirse a la complejidad de los CBC; sin embargo, la alimentación cruzada 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 de laboratorio mostró que el consorcio obtenido del pasto Mulato solo mejoró la producción de biogás y la actividad enzimática de las celulasas, ya que la degradación de la materia seca no se modificó. En cuanto al aislamiento *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos, el sustrato aserrín molido resultó prometedor, debido a que los consorcios presentaron mejor producción de biogás, degradación de materia seca y producción de enzimas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

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 1935. https://doi.org/10.3390/ani10101935

Association of Analytical Chemists (AOAC). (2016). *Official methods of analysis* (20th 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 ethanologenic 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., Chakrabortty, 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-Acharte, G. S., Valencia-Mamani, N., Gonzales-Huamán, T. J., Guillen-Domínguez, H. M., & Esparza, M. (2022). 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

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, Barnes, 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), 1–8.

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., Ariaeenejad, 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), Artículo 107. https://doi.org/10.56369/tsaes.4127

Isnawati, I., Lisdiana, L., Asri, M. T., & Trimulyono, G. (2024). Biodiversity of cellulolytic bacteria isolated from fermetodege for ruminants. *Biotropia*, *31*(2), Article 2. https://doi.org/10.11598/btb.2024.31.2.1904

Kumar, R., Kumar Vatsa, D., Singh, G., & Baghla, K. (2024). Effect of biological pre-treatment of agricultural waste on biogas production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *12*(8), 68–73. https://doi.org/10.20546/ijcmas.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. de los 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). Fribrinolytic 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_2 and H_2 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 Nogueda, J., Sánchez-Santillán, P., Hernández Sánchez, D., Torres Salado, N., Crosby Galvan, M., Herrera Pérez, J., & Rojas-García, R. A. (2019). Uso de disacáridos y carbón activado para preservar consorcios de bacterias ruminales celulolíticas liofilizadas. *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

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