

Bacterias fibrolíticas aisladas de rumen de alpaca, ovino y vacuno con capacidad biodegradadora de celulosa

Fibrolytic bacteria isolated from the rumen of alpaca, sheep and cattle with cellulose biodegrading capacity

Víctor Carhuapoma-Delacruz^{1*} , Gissel Shian Auqui-Achante¹ , Nicasio Valencia-Mamani² 
Teresa Jesús Gonzales-Huamán³ , Héctor Marcelo Guillen-Domínguez⁴  y Mario Esparza⁵ 

¹Centro de Investigación Científica Multidisciplinaria de Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica, Perú.

²Laboratorio de Salud Animal, Centro de Investigación Científica Multidisciplinaria de Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica, Perú.

³Escuela Profesional Ambiental y Sanitaria, Centro de Investigación Científica Multidisciplinaria de Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica, Perú.

⁴Escuela Profesional Zootecnia, Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica, Perú.

⁵Laboratorio GENERBIM, Facultad de Medicina Humana, Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú

Correo Electrónico: yachayruacc@hotmail.com

RESUMEN

Las bacterias ruminales celulolíticas se utilizan en la alimentación de rumiantes por su capacidad biodegradable de forrajes fibrosos. Sin embargo, existen escasos estudios en alpaca, ovino y vacuno si constituyen fuentes de microorganismos degradadores de celulosa para aplicaciones en biotecnología alimentaria. En esta investigación se aisló y evaluó el potencial degradador *in vitro* de la celulosa de las bacterias ruminales celulíticas de alpaca, ovino y vacuno. Se recolectaron muestras de líquido ruminal de ocho especímenes de alpaca, vacuno y ovino del matadero municipal de la localidad de Huancavelica – Perú, ubicado a 3820 metros sobre el nivel del mar en Perú. Las muestras ruminales fueron cultivadas en medios con carboximetilcelulosa, enriquecidos con caldo infusión cerebro corazón en condiciones aeróbicas y anaeróbicas hasta lograr desarrollo de colonias bacterianas. Luego se realizó la caracterización microbiológica, bioquímica y análisis de producción de celulasas de cada aislado bacteriano usando el método de coloración de rojo Congo y se evaluó el diámetro de los halos (mayor a 10-14 milímetros (mm)) de degradabilidad de celulosa. Se encontró bacterias celulolíticas *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* con alta capacidad de degradabilidad de celulosa (halo mayor a 14 mm). Este hallazgo indica que los líquidos ruminales de alpaca, vacuno y ovino son excelentes fuentes de bacterias productoras de celulasas con alta capacidad degradadora de celulosa.

Palabras clave: Alpaca; biotecnología; bacterias; celulasas; celulosa

ABSTRACT

Cellulolytic ruminal bacteria are used in ruminant feeding due to their biodegradable capacity in fibrous forages. However, there are few studies in alpaca, sheep and cattle whether they constitute sources of cellulose degrading microorganisms for applications in food biotechnology. In this research, the *in vitro* degradation potential of cellulose of alpaca, sheep and cattle cellulite ruminal bacteria was isolated and evaluated. Ruminal fluid samples were collected from eight alpacas, cattle and sheep specimens from the Municipal slaughterhouse in the town of Huancavelica - Peru, located at 3820 meters above sea level in Peru. Ruminal samples were cultured in media with carboxymethylcellulose, enriched with brain heart infusion broth under aerobic and anaerobic conditions until the development of bacterial colonies was achieved. Then the microbiological, biochemical characterization and cellulase production analysis of each bacterial isolate was performed using the Congo red staining method and the diameter of the halos (greater than 10-14 millimeters (mm)) of cellulose degradability was evaluated. Cellulolytic bacteria *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes* with high capacity for cellulose degradability (halo greater than 14 mm) were found. This finding indicates that alpaca, cattle and sheep ruminal fluids are excellent sources of cellulase-producing bacteria with high cellulose degrading capacity.

Key words: Alpaca; biotechnology; bacteria; cellulases; cellulose

INTRODUCCIÓN

En el Perú, el faenado de alpaca (*Vicugna pacos*), ovino (*Ovis orientalis aries*) y bovino (*Bos taurus*) en los mataderos municipales se ha incrementado por el crecimiento poblacional del consumidor, y producen cerca de 3.500 kilogramos (kg) de contenidos ruminales semanales, siendo depositados en los basureros municipales, aguas residuales y pocas veces tratados [1, 16, 27], implicando la proliferación de olores putrefactos, presencia de moscas (*Musca domestica*); ocasionado la contaminación ambiental en toda sus dimensiones, constituyéndose en una amenaza para la salud pública y un problema global para el ecosistema [2, 11].

Estudios preliminares reportan que, en los contenidos ruminales de vacuno están presentes bacterias celulolíticas entre el 1 y 5 % de la flora ruminal [28], siendo los *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes succinogenes* y *Fibrobacter succinogenes elongata* especializados en degradar la celulosa a partir de plantas fibrosas originando los hidratos de carbono poliméricos a compuestos sencillos como los ácidos grasos y alcoholes a través de un complejo enzimático celulolítico y por la excreción de celulasas extracelulares [7, 17, 20].

Hasta la actualidad, las bondades benéficas presentadas por estas bacterias celulolíticas no son aprovechadas para producir inóculos de bacterias ruminales en la alimentación de rumiantes debido a sus complejas propiedades metabólicas para el crecimiento y aislamiento óptimo *in vitro* [13, 18], añadiéndose a ello escasos reportes de su potencial degradador de la celulosa en condiciones de laboratorio.

Por todo lo antes expuesto, el objetivo de la presente investigación consistió en aislar y evaluar el potencial degradador *in vitro* de la celulosa por las bacterias ruminales celulolíticas de alpaca, ovino y vacuno, para producir biomasa de cepas puras biodegradadoras de celulosa y aprovechar el líquido ruminal como activo biológico fuente de bacterias y enzimas para la nutrición de rumiantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección material biológico

Se recolectaron 8 muestras de líquido ruminal fresco en envases estériles de 50 mililitros (mL) según especie animal (alpaca, ovino y vacuno), teniendo a la alpaca como especie comparativa principal de investigación, haciendo un total 24 muestras, sin distinción de edades y sexo, del matadero municipal de Huancavelica – Perú, siendo rotuladas y trasladadas en un contenedor térmico (Termo porta vacuna, Mod.KST, Marca Thermos, China), con hielo biológico al laboratorio de Salud Animal, área de Microbiología de la Universidad Nacional de Huancavelica – Perú, para su estudio microbiológico; previo a ello se tramitaron autorizaciones para el ingreso y recogida de muestras del matadero, a través de la Municipalidad Provincial de Huancavelica-Perú.

Cultivo y aislamiento de bacterias ruminales

Los líquidos ruminales de cada especie animal (alpaca, ovino y vacuno) fueron filtrados con el fin de retener los materiales flotantes, a partir de ello se tomaron 2 mL de líquidos ruminales de manera independiente por especie animal. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10:1 a 10:5 en agua peptonada buferada al 0,1 % [10], y fueron cultivadas por agotamiento en

agar carboximetilcelulosa (CMC) añadiéndose aserrín al 1 % y suplementadas con sangre desfibrinada de alpaca al 5 %, para la obtención de cepas anaerobias de *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* e incubados 37°C durante 48 horas (h) en condiciones de anaerobiosis colocándose los cultivos en Garra de Gaspar, adicionándose Sachet de Anaerocult® C como inhibidor de oxígeno y para los aerobios de *Fibrobacter succinogenes succinogenes*, *Fibrobacter succinogenes elongata*, incubados 37°C durante 48 h en condiciones aeróbicas, repitiéndose los cultivos 3 veces hasta presenciar colonias separadas que poseen alto grado de morfologías similares en una extensión realizada [12].

Identificación de bacterias ruminales

La identificación *R. flavefaciens*, *R. albus*, *F. succinogenes succinogenes* y *F. succinogenes elongata*, se realizaron mediante sus características macroscópicas (forma, color, borde, elevación y consistencia), microscópica (grupo y tinción Gram) y pruebas bioquímicas de Triple Sugar Iron Agar (TSI), Agar Lisina- Hierro (LIA), Agar citrato de Simmons (SIMON), Sulfide Indole Motility (SIM), Voges-Proskauer y Catalasa [22].

Capacidad degradativa de bacterias ruminales

Para evaluar la capacidad de la actividad celulítica cualitativo, las cepas de *R. flavefaciens*, *R. albus*, *F. succinogenes succinogenes* y *F. succinogenes elongata*, fueron seleccionadas las cepas que fueron positivas en los cultivos primarios, a partir de ellos fueron cultivados de manera independiente por repique en medios de Agar selectivo de CMC, suplementados con aserrín al 1 % e incubados a 37°C por 72 h y siendo coloreadas todas las bacterias crecidas con reactivo rojo Congo al 0,1 %, dejándose en reposo a 30 minutos y lavados con solución de NaCl a 1 molar (M) a chorreo y luego fueron cubiertos con ácido acético al 2 % por 10 segundos, con el fin de apreciar la eficiencia de la capacidad degradativa de la celulosa y apariciones de halos desarrollados [24].

La evaluación cuantitativa de la capacidad degradativa de las bacterias se consideró según la cantidad y el diámetro de los halos de degradabilidad de celulosa desarrollados en el cultivo, desarrollándose la medición matemática de la disposición de diámetro de la zona clara dividido entre el diámetro de la colonia [34], mediante el uso de Vernier Digital (Calibre digital electrónico IP54 de acero inoxidable-China) y categorizadas a escalas valorativas: Baja degradabilidad (halos \leq 10 milímetros (mm)), moderada degradabilidad (halos 11↔13 mm), alta degradabilidad (\geq 14 mm) en referencia a lo disertado de Russell y col. [22], considerándose los grupos: Bacterias aeróbicas: CR alpaca: [N = 36 halos; *F. succinogenes* (n = 24 halos), *F. succinogenes elongata* (n = 12 halos)]; CR ovino: [N = 32 halos; *F. succinogenes* (n = 8 halos), *F. succinogenes elongata* (n = 24 halos)]; CR vacuno: [N = 40 halos; *F. succinogenes* (n = 28 halos), *F. succinogenes elongata* (n = 12 halos)] y bacterias anaeróbicas: CR alpaca: [N = 28 halos; *R. flavefaciens* (n = 16 halos), *R. albus* (n = 12 halos)]; CR ovino: [N = 20 halos; *R. flavefaciens* (n = 12 halos), *R. albus* (n = 8 halos)]; CR vacuno: [N = 12 halos; *R. flavefaciens* (n = 4 halos), *R. albus* (n = 8 halos)].

Análisis estadístico

La investigación fue de tipo descriptivo, observacional, prospectivo-transversal, los datos fueron procesados mediante

paquete estadístico SPSS Vers. 20.0 [31] e interpretados mediante comparación de frecuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 24 muestras (líquido ruminales) estudiadas, se obtuvieron presencia de bacteria aeróbica de *F. succinogenes* 87,5 % en vacunos y 75,0 % en alpaca, mientras que, *F. succinogenes elongata* presentaron en 50,0 %; 87,5 % en alpaca y ovino: así mismo se encontraron alta prevalencia de bacteria anaeróbica de *R. flavefaciens* (75 %) en alpaca y ovino y *R. albus* (37,5 %) en líquido ruminal de alpaca (TABLAS I y II, FIG.1).

TABLA I
Frecuencia de bacterias aeróbicas celulolíticas ruminales en alpaca, ovino y vacuno (N = 24)

Grupos de estudios	Número de muestras	<i>Fibrobacter succinogenes</i>		<i>Fibrobacter succinogenes elongata</i>					
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo				
		Fr.	%	Fr.	%				
LRA	8	6	75	2	25	4	50	4	50
LRO	8	3	37,5	5	62,5	7	87,5	1	12,5
LRV	8	7	87,5	1	12,5	3	37,5	5	62,5

Fr. = frecuencia; LRA = líquido ruminal de alpaca; LRO = líquido ruminal de ovino; LRV = líquido ruminal de vacuno

TABLA II
Frecuencia de bacterias celulolíticas ruminales anaerobias de alpaca, ovino y vacuno (n=24)

Grupos de estudios	Número de muestras	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>		<i>Ruminococcus albus</i>					
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo				
		Fr.	%	Fr.	%				
LRA	8	6	75	2	25	3	37,5	5	62,5
LRO	8	6	75	2	25	2	25	6	75
LRV	8	1	12,5	7	87,5	2	25	6	75

Fr. = frecuencia; LRA = líquido ruminal de alpaca; LRO = líquido ruminal de ovino; LRV = líquido ruminal de vacuno

Las cepas de *F. succinogenes* provenientes de muestras de alpaca y ovino presentaron alta capacidad degradativa celulolíticas (70,8 y 50,0 %) y *F. succinogenes elongata* en vacuno y alpaca (50,0 y 43,8 %), igualmente se encontró alta capacidad degradativa en *R. flavefaciens* provenientes de alpaca y ovino (62,2 y 50,0 %) y *R. albus* provenientes de alpaca (66,7 %) siendo inferiores en cepas de otras especies de estudio (TABLAS III y IV; FIG. 2).



FIGURA 1. Bacterias aisladas de tres líquidos ruminales: alpaca (1), vacuno (2) y ovino (3), en medio BHI

TABLA III
Capacidad degradativa de bacterias celulolíticas ruminales aeróbicas en alpaca
(N = 36 halos), ovino (N = 32 halos) y vacuno (N = 40 halos)

Grupos de estudios	Total de Halos	<i>Fibrobacter succinogenes</i>						Total de Halos	<i>Fibrobacter succinogenes elongata</i>					
		Bajo		Moderado		Alto			Bajo		Moderado		Alto	
		Frec	%	Frec	%	Frec	%		Frec	%	Frec	%	Frec	%
LRA	24	3	12,5	4	16,7	17	70,8	12	4	25	1	6,3	7	43,8
LRO	8	0	0	4	50	4	50	24	2	7,1	11	39,3	11	39,3
LRV	28	4	14,3	20	71,4	4	14,3	12	1	8,3	5	41,7	6	50

Frec.= frecuencia; LRA = liquido ruminal de alpaca; LRO = liquido ruminal de ovino; LRV = liquido ruminal de vacuno

TABLA IV
Capacidad degradativa de bacterias celulolíticas ruminales aeróbicas en alpaca
(N = 28 halos), ovino (N = 20 halos) y vacuno (N = 12 halos)

Grupos de estudios	Total de Halos	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>						Total de Halos	<i>Ruminococcus albus</i>					
		Bajo		Moderado		Alto			Bajo		Moderado		Alto	
		Frec	%	Frec	%	Frec	%		Frec	%	Frec	%	Frec	%
LRA	16	1	4,2	5	33,3	10	62,5	12	0	0,0	4	33,3	8	66,7
LRO	12	1	8,3	5	41,7	6	50,0	8	7	87,5	0,0	0,0	1	12,5
LRV	4	1	12,5	3	37,5	0	0,0	8	0	0,0	6	75,0	2	25,0

Frec.= frecuencia; LRA = liquido ruminal de alpaca; LRO = liquido ruminal de ovino; LRV = liquido ruminal de vacuno

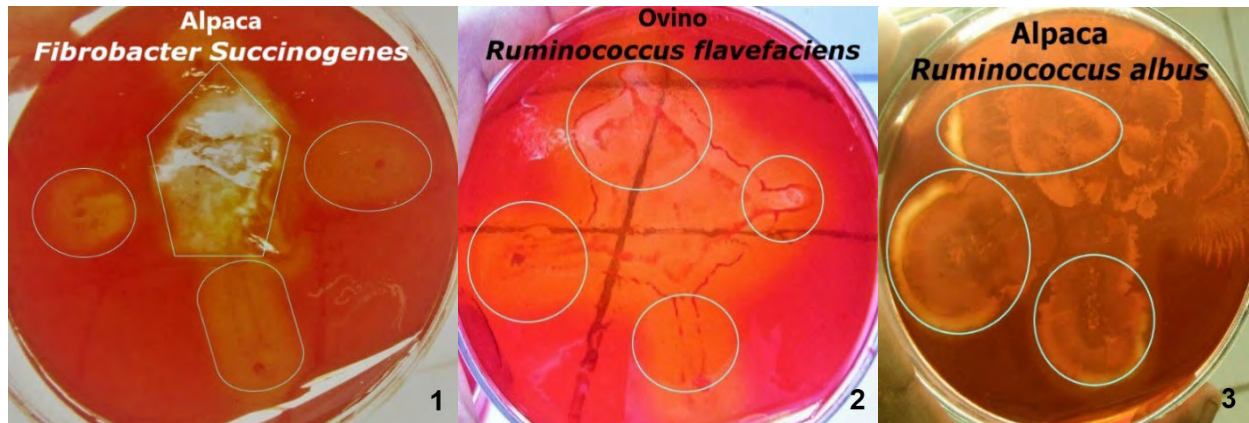


FIGURA 2. Producción de celulasas por bacterias ruminales de alpaca (1), ovino (2) y alpaca (3)

Los resultados demuestran alta frecuencia de bacterias aeróbicas de *F. succinogenes*, *F. succinogenes elongata* en los líquidos ruminal de alpaca, vacuno y ovino, observándose en el líquido ruminal de alpaca mayor biomasa, similar comportamiento encontrado en bacterias anaeróbicas como *R. flavefaciens* en líquidos ruminales de alpaca y ovino, mientras que el *R. albus* se apreció con mayor incidencia en el líquido ruminal de alpaca.

Las prevalencias altas de bacterias celulolíticas ruminales encontradas en líquidos ruminales de alpaca, vacuno y ovino en el estudio estarían relacionadas a la presencia de genes rRNA 16S, que resultan codificar enzimas esenciales para hidrolizar la pared celular de las plantas fibrosas [4, 18], resultando ser como precursores para el masivo desarrollo de microorganismos ruminales [6, 8, 26].

Por otro lado, el consumo de alimentos con altos contenidos de carbohidratos estructurales (fibrosos) resultan ser fuentes de bacterias celulolíticas tal como suelen ocurrir en vacunos, ovinos [14], y siendo la alpaca camélido rumiante de presentar fisiología metabólica especializada de segregar mucosa glandular que permite la secreción de tamponadores que contribuyen con la saliva en la mantención de un pH favorable para la acción de microorganismos celulolíticos como las bacterias de *F. succinogenes*, *F. succinogenes elongata*, *R. flavefaciens* y *R. albus* [28].

En un estudio realizado por Guerrero [5], se identificaron cepas de *R. flavefaciens*, *R. albus*, *F. succinogenes succinogenes* y *F. succinogenes elongata* en contenidos ruminales de bovinos, y Aihemaiti y col. [3] aislaron 84 cepas celulolíticas del líquido ruminal de ovejas, vacas y camellos (*Camelus bactrianus* Linnaeus), de los cuales encontraron 37 cepas Gram negativas y 3 cepas Gram positivas, con predominancias de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*, *Microbacterium*, *Paracoccus* y *Pseudomonas*, mientras que Arcos y col. [1] encontraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) en crecimiento microbiano de *F. succinogenes* en vacunos de engorde; así mismo, Ramírez-Malavé [32], logró cuantificar bacterias celulolíticas ruminales con una correlación positiva (0,826; $P = 0,000$) provenientes de vacunos de pastoreo a través de la técnica de recuento de células en placa. Los resultados encontrados en el estudio resultan ser similares a algunos reportados en los párrafos anteriores y difieren con los otros, pero existen escasos estudios orientados a líquidos ruminales en alpacas.

La excelente capacidad degradativa de celulosa demostrada por las bacterias celulolíticas provenientes de alpaca confirman que están presentes los 3 genes β -1,4-glucanasas (celulasas), que son precursores para la degradación eficaz de la celulosa natural y la generación de enzimas potencialmente para metabolizar (hemi) celulosa [9, 12], así mismo se hace entender que, las bacterias aisladas del líquido ruminal de alpaca suelen ser más especializadas para degradar eficientemente la celulosa, posiblemente a la presencia de mayor número de genes de β -1,4-glucanasas y a su hábitat en un estilo de pastoreo completo con diversidad de pastos como alimento exclusivo, por lo que el rumen de la alpaca puede albergar una flora microbiana distinta de la de otros rumiantes debido a su dieta de componentes de fibra, ya que la dieta puede resultar un factor determinante.

Otro estudio demostró que las bacterias celulolíticas de rumiantes y no rumiantes tienen limitaciones para la digestión de celulosa por efectos de interacciones de matriz entre biopolímeros de pared celular, baja superficie del sustrato y la penetración limitada de microbios celulolíticos inmóviles [15], pero estas bacterias son altamente adaptativas por ser organismos mesófilos más activos [20, 29], por lo que, las bacterias encontradas en el estudio modificaron genéticamente sus limitaciones digestivas, atribuyéndose ser eficientes en la digestión de celulosa *in vitro* [21, 30], los carbohidratos vegetales resultaron fuente de energía para rumiantes [26], como se han apreciado en el estudio.

En un estudio reciente, realizado por Srivastava y col. [25] demostraron que, las bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas del rumen de camello suelen ser excelentes bioprocesadoras celulósicas a partir de residuos agrícolas para la obtención de biocombustibles; y Mateo y col. [14] afirman, que en un cultivo de bacterias ruminales degradadoras de aserrín, un incremento en su degradación *in vitro*, del 21 y 59,7 %. Arcos y col. [2] encontraron

a *F. succinogenes* aislados de bovinos en pastoreo con mayor capacidad degradativa de pared celular de *Bouteloua repens* (Navajita rastrera) que la cepa de referencia *F. succinogenes* ATCC 19169 (13,77 vs. 7,94 %).

Así mismo, Ossa y col. [19] ratificaron que, las cepas de *R. flavefaciens* nativos (bovinos en pastoreo) presentan mayor degradación de pared celular que la cepa de referencia *R. flavefaciens* ATCC 19208 (11,09 – 12,87 % vs. 6,83 %), mientras que Sánchez y Cobos [23] demostraron actividad heterofermentativa celulósicas con baja capacidad de degradación de MS. Ramírez-Malavé [32] reporta alta degradabilidad cinética de materia seca (MS) y proteína cruda (PC) ($P > 0,05$), a efectos de contenidos ruminales en caprinos criollos alimentados con dietas integrales de forrajera moringa; (*Moringa oleifera* Lam). Por otra parte, estudio realizado en Ecuador, Loja y Ashqui [33] obtuvo mejores coeficientes de digestibilidad *in situ* de la MS del maní forrajero ("*Arachis pintoi*") a diferentes edades de corte en bovinos, estos reportes coinciden con los resultados encontrados en el presente estudio, haciendo hincapié que los animales en pastoreo suelen presentar bacterias celulolíticas con alto potencial degradador de la celulosa al digerir biodiversidad de forrajes fibrosos; por entonces, sería valioso producir inóculos de bacterias ruminales que permitan la incorporación exitosa en alimentos fibrosos en la alimentación de los rumiantes.

CONCLUSIONES

Los líquidos ruminales de alpaca, vacuno y ovino mostraron ser excelentes fuentes de bacterias celulolíticas (*R. flavefaciens*, *R. albus*, *F. succinogenes succinogenes* y *F. succinogenes elongata*) y con alta capacidad degradadora de celulosa; demostrando ser más eficiente el contenido ruminal y cepas de alpaca para aplicaciones biotecnológicas (tales como: biofermentadores, biodegradadores, catalizadores biológicos) en camélidos sudamericanos y otros rumiantes.

AGRADECIMIENTOS

Al Administrador Ejecutivo del Laboratorio Central de Investigación de la Universidad Nacional de Huancavelica y al Administrador del matadero Municipal de Huancavelica, Perú; por brindar la colaboración y las facilidades.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de la investigación hacen referencia de no tener ningún tipo de interés particular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARCOS, M. L.; FAISURY-DIAZ, O.; TITO, E. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. **Cien. Tecnol. Agrop.** 5(1): 60-63. 2004.
- [2] ARCOS, M.; OSSA, F.; DÍAZ, T. Aislamiento, conservación y evaluación de la cinética de crecimiento y actividad celulolítica de aislados de *Fibrobacter succinogenes* de bovinos en pastoreo de gramíneas tropicales. **Cien. Tecnol. Agrop.** 3(2): 77-78. 2001.
- [3] AIHEMAITI, M; ZHEN, F; LI, Y; AIBAIDOU, G; YIMIT, W. Isolation and identification of rumen bacteria for cellulolytic

- enzyme production. **Act. Microbiol. Sinica.** 53(5): 470-477. 2013.
- [4] CAI, S.; LI, J.; HU, F. Z.; ZHANG, K.; LUO, Y.; JANTO, B.; BOISSY, R.; EHRlich, G.; DONG, X. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.** 76(12): 3818–3824. 2010.
- [5] GUERRERO-CALLE, A. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca-Ecuador. Tesis de Grado. 90 pp. 2011.
- [6] GUERREIRO, O.; ALVES, S.P.; COSTA, M.; DUARTE, M.F.; JERÓNIMO, E.; BESSA, R. Effects of Increasing Doses of Condensed Tannins Extract from *Cistus ladanifer* L. *In Vitro* Ruminant Fermentation and Biohydrogenation. **Anim.** 11(3): 761. 2021.
- [7] HANDIQUE, G.; PHUKAN, A.; BHATTACHARYYA, B.; BARUAH, A.; RAHMAN, S.W.; BARUAH, R. Caracterización de bacterias que degradan la celulosa del intestino larvario del escarabajo blanco *Lepidiota mansueta* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Bioquim. Insect. Physiol.** 94: e21370. 2017.
- [8] HUANG, S.; SHENG, P.; ZHANG, H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **Int. J. Mol. Sci.** 13(3): 2563-2577. 2012.
- [9] KOECK, D.E.; PECHTL, A.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Genomics of cellulolytic bacteria. **Current Opinion Biotechnol.** 29: 171–183. 2014.
- [10] LI, R. C.; NIX, D.E.; SCHENTAG, J. J. New turbidimetric assay for quantitation of viable bacterial densities. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37(2): 371–374. 1993.
- [11] LEI, Z.; ZHANG, K.; LI, C.; JIAO, T.; WU, J.; WEI, Y.; TIAN, K.; LI, C.; TANG, D.; DAVIS, D. I.; CASPER, D. P.; JIANG, H.; WANG, X.; WANG, J. Ruminant metagenomic analyses of goat data reveals potential functional microbiota by supplementation with essential oil-cobalt complexes. **BMC Microbiol.** 19(1): 30. 2019.
- [12] LONDOÑO, A.F.; FERNÁNDEZ-CORREA, J.A.; MOLINA-GUZMAN, L.P.; POLANCO-ECHEVERRY, D.; GUTIÉRREZ-BUILES, L.A. Cuantificación de Bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del Rumen de Ganado Bovino: Comparación de tres técnicas. **Hech. Microbiol.** 2(1): 51-59. 2012.
- [13] LOAIZA-CENTENO, D. Bacterias celulolíticas con características probióticas del intestino de termitas y su evaluación como potenciales degradadoras de totora (*Schoenoplectus tatora*). Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. Tesis de Grado. 109 pp. 2017.
- [14] MATEO, J.; COBOS, M.; TRINIDAD, A.; CETINA-ALCALÁ, V.; VARGAS-HERNÁNDEZ, J. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras del aserrín. **Agrocien.** 36:523-530. 2002.
- [15] MEDIE, F.M.; DAVIES, G.J.; DRANCOURT, M.; HENRISSAT, B. Los análisis del genoma destacan las diferentes funciones biológicas de las células. **Nat. Rev. Microbiol.** 10: 227-234. 2012.
- [16] MORALES-GÁLVEZ, T.R.; GONZALES-BALDEON, A. Uso del contenido ruminal (alimento no digerido) de vacuno en la ración y su influencia en el incremento de peso en cuyes, en el valle de Huaura. Universidad Nacional de José Faustino Sánchez Carrión. Huacho, Perú. Tesis de Grado. 102 pp. 2014.
- [17] MITSUMORI, M. Isolation of Cellulolytic Bacteria from the Rumen. **Methods Mol. Biol.** 1796: 57-65. 2018.
- [18] NYONYO, T.; SHINKAI, T.; MITSUMORI, M. Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen. **FEMS Microbiol. Ecol.** 88(3): 528–537. 2014.
- [19] OSSA, F.; ARCOS, M.; RODRIGUEZ, J.; DIAZ, T. Identificación molecular de bacterias celulolíticas ruminales y degradación de la pared celular de *Bouteloua repens* por aislados nativos de *Ruminococcus flavefaciens*. **Rev. Corpoica.** 3(2): 29-30. 2001.
- [20] REN, Z.; YAO, R.; LIU, Q.; DENG, Y.; SHEN, L.; DENG, H.; ZUO, Z.; WANG, Y.; DENG, J.; CUI, H.; HU, Y.; MA, X.; FANG, J. Effects of antibacterial peptides on rumen fermentation function and rumen microorganisms in goats. **PLoS One.** 14(8): e0221815. 2019.
- [21] RUSSELL, J. B.; MUCK, R. E.; WEIMER, P. J. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. **FEMS Microbiol. Ecol.** 67(2): 183–197. 2009.
- [22] TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** 43(4) 777-780. 1982.
- [23] SÁNCHEZ-SANTILLÁN, P.; COBOS-PERALTA, M.A. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. **Agrocien.** 50(5): 565-574. 2016.
- [24] SUARDÍAZ, J.; CRUZ, C.; COLINA, A. Capítulo 13. Exploración del metabolismo de las lipoproteínas. **Laboratorio Clínico.** Editorial Ciencias Médicas. La Habana. Pp. 23-34. 2004.
- [25] SRIVASTAVA, S.; DAFALE, N.A.; JAKHESARA, S.J.; JOSHI, C.G.; PATIL, N.V.; PUROHIT, H.J. Unraveling the camel rumen microbiome through metaculturomics approach for agriculture waste hydrolytic potential. **Arch. Microbiol.** 203(1): 107-123. 2021.
- [26] TOLVE, R.; GALGANO, F.; CONDELLI, N.; CELA, N.; LUCINI, L.; CARUSO, M.C. Modelo de optimización de las condiciones de encapsulación de fenólicos para el bioenriquecimiento en ácidos grasos de productos alimenticios de origen animal. **Alimentos.** 10(4): 881. 2021.
- [27] VARGAS, J.E.; ANDRÉS, S.; LÓPEZ-FERRERAS, L.; SNELLING, T.J.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; LÓPEZ, S. Dietary supplemental plant oils reduce methanogenesis from anaerobic microbial fermentation in the rumen. **Sci. Report.** 10(1): 1613. 2020.
- [28] VASTA, V.; DAGHIO, M.; CAPPUCCI, A.; BUCCIONI, A.; SERRA, A.; VITI, C.; MELE, M. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid

- biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. **J. Dairy Sci.** 102(5): 3781–3804. 2019.
- [29] VEERESH, J.; JIN, CH.W. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renew. Sustainable Energy Rev.** 33: 188-203. 2014.
- [30] WANG, M.; WANG, R.; ZHANG, X.; UNGERFELD, E.M.; LONG, D.; MAO, H.; JIAO, J.; BEAUCHEMIN, K.A.; TAN, Z. Molecular hydrogen generated by elemental magnesium supplementation alters rumen fermentation and microbiota in goats. **British J. Nutr.** 118(6): 401-410. 2017.
- [31] ZARCO-LAVEAGA, J.R. IBM SPSS Statistics Base 20. Copyright IBM Corporation. 312 pp. 2011.
- [32] RAMÍREZ-MALAVÉ, C. Degradabilidad ruminal en caprinos criollos alimentados con dietas integrales cuya base forrajera es la moringa; *Moringa oleífera* Lam. Universidad Estatal Península de Santa Elena. La Libertad, Ecuador. Tesis de Grado. 77 pp. 2019.
- [33] LOJA-ARPI, D.; ASHQUI-RAMÍREZ, J. Valorización de la degradación ruminal y digestibilidad *in vitro* del maní forrajero (*Arachis Pintoi*). Universidad Estatal Amazónica. Puyo, Ecuador. Tesis de Grado. 51 pp. 2019.
- [34] SONIA, N.M.O; KUSNADI, J. Isolation and Partial Characterization of Cellulase Enzyme from Isolate Os-16 Cellulolytic Bacteria Origin Bromo-Tengger Desert. **J. Pangan dan Agro.** 3(4): 11-19. 2015.