

## **Degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en especies forrajeras por *Pseudobutyrvibrio ruminis* y *Pseudobutyrvibrio xylanivorans***

### **Degradation and utilization of hemicellulose from species forage by *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans***

Diego Grilli <sup>1,3</sup>, Vanina Egea <sup>2</sup>, Sebastián Paez Lama <sup>2</sup>, Diego Carcaño <sup>1</sup>, Liliانا Allegretti <sup>2</sup>, Miguel Sosa Escudero <sup>3</sup>, Graciela Nora Arenas <sup>4</sup>

Originales: *Recepción*: 01/07/2014- *Aceptación*: 12/08/2015

#### **RESUMEN**

Este estudio fue desarrollado para determinar la degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en diferentes forrajes por dos cepas bacterianas (*P. xylanivorans* 2 y *P. ruminis* 153), aisladas del rumen de caprinos Criollos. El cultivo de las cepas puras fue desarrollado hasta evidenciar la fermentación completa del heno de alfalfa y de diversas forrajeras nativas. La degradación fue definida como la solubilización de las pentosas insolubles en etanol al 80%, mientras que la utilización se definió como la pérdida de las pentosas totales. Los componentes nutricionales medidos en los forrajes evaluados fueron: cutina, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, lignina ácido detergente, hemicelulosa, celulosa, proteína cruda y almidón. *A. lampa* evidenció el máximo valor de degradación y utilización de la hemicelulosa y *M. ephedroides* y *G. decorticans* fueron las forrajeras nativas con el menor valor de degradación, en comparación con el heno de alfalfa. El coeficiente de correlación entre el valor de lignina ácido detergente y el porcentaje de degradación y utilización de la hemicelulosa, sugiere que la lignina afecta la actividad hemicelulolítica de *P. xylanivorans*. Estos resultados proporcionan un marco para intentar modificar la actividad hemicelulolítica del ambiente ruminal, mediante la incorporación de *P. xylanivorans* como cepa probiótica.

#### **Palabras clave**

hemicelulosa • bacterias • rumen • cabras

- 
- 1 Cátedra de Fisiología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad Juan Agustín Maza, Av. Acceso Este Lateral Sur 2245, C. P. 5519, Mendoza, Argentina. diegoqrilli@yahoo.com.ar
  - 2 Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA), Centro Científico y Tecnológico-Mendoza, C. C. 507 (M5502BPB), Mendoza, Argentina.
  - 3 Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo, Casilla de Correo 56, C. P. 5500, Mendoza, Argentina.
  - 4 Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Casilla de Correo 56, C. P. 5500, Mendoza, Argentina.

## ABSTRACT

This study was performed to determine the degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by two strains (*P. xylanivorans* 2 and *P. ruminis* 153) isolated from rumen of Creole goats. Fermentations by pure culture were run to completion by using alfalfa hay and native forages selected by goats grazing. Degradation was defined as the solubilization of 80% ethanol-insoluble pentose, whereas utilization was defined as a loss in total pentose. The nutritional components measured from intact forages were cutin, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, acid detergent lignin, hemicellulose, cellulose, crude protein and starch. *A. lampa* showed the maximum degradation value and utilization of hemicellulose, and *M. ephedroides* and *G. decorticans* were the native forage species with the smallest value of degradation, in comparison with alfalfa hay. The correlation coefficient between acid detergent lignin and percentage of degradation and utilization of hemicellulose, suggests that lignin affects hemicellulolytic activity of *P. xylanivorans*. These results provide a framework to try to modify the activity of ruminal hemicellulolytic environment by incorporating *P. xylanivorans* as probiotic strain.

### Keywords

hemicellulose • bacteria • rumen • goats

## INTRODUCCIÓN

Los animales rumiantes se caracterizan por la posibilidad de degradar los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa, principalmente) presentes en las células vegetales de los forrajes (1).

Las cabras Criollas componen su dieta con un predominio de especies forrajeras arbustivas, las que constituyen una importante oferta de fibra vegetal (2).

La digestibilidad de la materia seca y de la fibra vegetal observada en ciertas razas caprinas adaptadas a zonas áridas y alimentadas con dietas altamente lignificadas, supera la digestibilidad observada en razas europeas y en otros rumiantes domésticos (30). Esto les permite lograr un mejor aprovechamiento de las especies forrajeras que predominan en estos ambientes áridos, indicando una buena adaptación a estas condiciones de producción.

Silanikove (2000) reportó que esta adaptación puede deberse a la

mayor eficiencia en la utilización de la fibra, relacionada con cambios en la fermentación ruminal.

Los procesos de digestión y utilización de los recursos forrajeros por el rumiante están estrechamente relacionados con la presencia y actividad de los microorganismos del rumen (35).

Por lo tanto, el rol de las bacterias y enzimas fibrolíticas (celulolíticas y hemicelulolíticas) implicadas en la fermentación ruminal, adquiere importancia en los sistemas de producción caprina en nuestro país.

Grilli *et al.* (2013) reportaron el aislamiento de dos cepas bacterianas a partir del rumen de cabras Criollas alimentadas con especies forrajeras nativas.

La caracterización bioquímica y genética permitió la designación de estas cepas a las especies *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (25) y *Pseudobutyrvibrio ruminis* (33).

Los diversos biotipos de *Butyrivibrio* sp y las especies bacterianas relacionadas con los butirivibrios representan una proporción significativa de las bacterias cultivables del rumen en los rumiantes domésticos y salvajes alimentados con dietas de baja calidad nutricional (6, 11, 19, 24, 27). Estos microorganismos fermentan una amplia variedad de carbohidratos vegetales que permite a los animales mantener una elevada actividad enzimática ruminal (6, 9, 27, 35).

La acción de estas enzimas probablemente se relacione con la capacidad de estas cepas para fermentar forrajes con abundante contenido de fibra vegetal.

Grilli *et al.* (2014) evaluaron la degradación y utilización del xilano, el principal componente de la hemicelulosa sintética, y demostraron que *P. xylanivorans* 2 posee una importante actividad hemicelulolítica.

Además, se identificó en esta cepa, uno de los genes (XynAPx) que codifican para la enzima xilanasa implicada en la digestión de este sustrato.

El rol funcional de *P. ruminis* en el ecosistema ruminal de las cabras Criollas es aún incierto, ya que en esta cepa solo se observó la fermentación de azúcares simples presentes en el contenido ruminal (20). Estos antecedentes proporcionan un marco para la manipulación de la fermentación ruminal en las cabras Criollas.

La actividad hemicelulolítica en el ambiente ruminal podría ser modificada mediante la incorporación de las cepas bacterianas al ecosistema ruminal de los caprinos Criollos. Para ello son necesarios estudios que determinen la capacidad de *P. xylanivorans* 2 o *P. ruminis* 153 para ser utilizadas como cepas probióticas. Como parte de la caracterización probiótica *in vitro* de estas cepas, se propone determinar la utilización y degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa, uno de los forrajes tradicionales

más estudiados (16), y en las especies forrajes nativas seleccionadas por las cabras Criollas en pastoreo.

Además, se pretende establecer qué componente nutricional presente en los forrajes evaluados, se correlaciona con las variaciones en la capacidad hemicelulolítica de las cepas utilizadas.

## METODOLOGÍA

### Forrajes

Los forrajes utilizados como sustratos para evaluar la degradación y utilización de la hemicelulosa fueron el heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y las especies forrajeras nativas (*Prosopis flexuosa*, *Atriplex lampa*, *Tricomaria usillo*, *Geoffroea decorticans*, *Mimosa ephedroides* y *Capparis atamisquea*), seleccionadas por los caprinos Criollos en pastoreo en el campo natural (2).

Las muestras de los forrajes nativos, recolectados durante el mes de febrero de 2009, estuvieron conformadas por brotes y hojas de *P. flexuosa*, *C. atamisquea* y *A. lampa* (brotación); brotes, hojas y frutos de *M. ephedroides* y *T. usillo* (brotación-floración) y sólo hojas de *G. decorticans* (brotación).

Se muestrearon 10 plantas de cada una de las especies forrajeras en su ambiente natural y fueron almacenadas en bolsas plásticas con cierre hermético (28).

Las muestras de heno de alfalfa fueron hojas y tallos de alfalfa (*M. sativa*), cortada en floración y posteriormente henificada. Estas muestras fueron sometidas a un proceso de secado por calor (70°C, 72 h) y posteriormente reducidas a un tamaño de partícula menor a 1 mm, según las recomendaciones de Cohen y Dehority (1970).

Cada una de las muestras de forrajes procesadas de esta manera fueron utilizadas para la elaboración del medio de cultivo "Forrajes", utilizado para la realización de los ensayos.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon según las recomendaciones de Cohen y Dehority (1970) y Dehority y Scott (1967).

Las técnicas de cultivo anaeróbico utilizadas fueron similares a las descritas por Hungate (21).

### Cepas bacterianas

Los experimentos para evaluar la degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en los forrajes fueron iniciados con el cultivo de las cepas *P. ruminis* 153 y *P. xylanivorans* 2 (20). Las mismas fueron reactivadas en un medio de cultivo sin fluido ruminal (5) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Las cepas reactivadas fueron inoculadas (0,3 mL) en el medio de cultivo "Forrajes", que contenía 0,5% (p/vol) de forraje como la única fuente de energía. Los cultivos se incubaron a 39°C durante 168 h (1 semana) y una tanda de tubos permaneció sin inocular (control).

El nivel del inóculo y el tiempo de incubación se determinaron previamente para permitir la máxima velocidad y la completa digestión de la hemicelulosa presente en cada forraje. Todos los cultivos se realizaron por duplicado.

### Utilización de la hemicelulosa

La utilización de la hemicelulosa fue calculada como la pérdida total de pentosas (xilosas) entre los medios de cultivo inoculados con las cepas y aquellos que permanecieron sin inocular. Para ello, al finalizar el período de incubación, se agregaron 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11 N a los tubos de cultivo.

Los tubos fueron autoclavados durante 1 hora a 15 libras de presión. Este tratamiento con ácido y calor permitió la obtención de la pared celular de las células

vegetales que componen a cada uno de los forrajes evaluados (13).

Posteriormente, cada tubo se diluyó con agua destilada y una alícuota de 5 mL de esta dilución, fue tratada con 2 g (peso húmedo) de una resina intercambiadora de aniones en forma de acetato (Amberlite IRA 400), para eliminar los ácidos urónicos que producen un color de interferencia con el reactivo de orcinol (32).

La resina se separó por filtración y el filtrado resultante se procesó para el análisis de las pentosas. A continuación, se determinó las pentosas totales contenidas en la pared celular vegetal según el método de orcinol (29).

### Degradación de la hemicelulosa

La degradación de la hemicelulosa fue calculada como la cantidad de hemicelulosa convertida desde una forma insoluble en alcohol-acidificado (HIA) a una forma soluble (HSA), por el método de precipitación ácida con etanol (7). Para ello, la totalidad del contenido de cada tubo de cultivo fue transferido a un tubo de centrifuga de 40 mL.

Posteriormente, se añadió 20 mL de una solución de ácido acético al 5% en etanol al 95%, el contenido se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min.

La mezcla se centrifugó a 2.000 x g durante 30 min, el sobrenadante se descartó y el precipitado se decantó en un matraz aforado.

A continuación, se añadió al residuo precipitado 20 mL de una solución de etanol al 80% acidificado. Los contenidos se mezclaron y se centrifugaron durante 20 minutos a 2.000 x g.

La solución sobrenadante se separó y se llevó a un volumen con agua destilada, constituyendo la fracción HSA.

Para hidrolizar la hemicelulosa presente en el residuo precipitado, se añadió 5 mL de  $H_2SO_4$  1 N a cada tubo. Los tubos se autoclavaron durante 1 hora a 15 libras de presión. Posteriormente, el hidrolizado se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se completó el volumen con agua destilada.

El material insoluble se dejó reposar, constituyendo la fracción HIA. Un volumen de 5 mL de ambas fracciones (HSA y HIA) fueron tratadas con 2 g (peso húmedo) de la resina intercambiadora de aniones (Amberlite IRA 400).

La resina se separó por filtración y el filtrado resultante se diluyó según fue necesario para el análisis de las pentosas según el método de orcinol (29).

#### **Determinación de pentosas**

El análisis de las pentosas fue realizado según el método de orcinol reportado por Schneider (1957).

Se mezcló 0,5 mL de la solución filtrada, previamente tratada con la resina, con 0,5 mL del reactivo de orcinol en un tubo de ensayo. A cada tubo se añadió 4 mL de ácido sulfúrico 31,2 N.

Posteriormente, los tubos se sumergieron en un baño de agua hirviendo vigorosamente (100°C) durante exactamente 50 segundos. Este tratamiento con calor y ácido, permitió la eliminación de la celulosa y lignina presente en la pared celular de las células vegetales y la hidrólisis de la hemicelulosa presente en cada una de las muestras de forrajes (13).

La intensidad del color resultante de la reacción entre el reactivo de orcinol y las pentosas resultantes de la hidrólisis de la hemicelulosa, se midió con un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, USA). La posible interferencia de las hexosas presentes en los forrajes se eliminó mediante la lectura de las muestras a dos longitudes de onda: 520 y 660 nm, lo que permitió la corrección

de cualquier color a 660 nm derivados del contenido de hexosas en la muestra (4).

Los valores de degradación y utilización de la hemicelulosa se basaron en duplicados de las fermentaciones con dos repeticiones.

Se realizó un estudio preliminar que involucró dos microorganismos y dos sustratos de diferentes forrajes (alfalfa y forrajeras nativas) para determinar un coeficiente de variación de posible aceptación para los análisis.

Seis repeticiones de cada forraje y de cada microorganismo fueron realizadas por duplicado, y se obtuvo coeficientes de variación entre el 5 y el 10%. Estos fueron similares a los valores obtenidos anteriormente por Dehority (1967), quien estableció un coeficiente de variación del 15% como el límite superior para la aceptación de los datos.

#### **Determinación de la composición nutricional de los forrajes**

El contenido de Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA) fue determinado de acuerdo con los procedimientos descritos por van Soest *et al.* (1991).

Para la determinación de Lignina Detergente Ácida (LDA) y Cutina Detergente Ácida (CDA) se utilizó la metodología descrita por Goering y van Soest (1970).

El procedimiento utilizado para la determinación del contenido de celulosa fue descrito por Crampton y Maynard (1938).

El contenido de hemicelulosa fue calculado a partir de la diferencia entre los valores de FDN y FAD (34).

El contenido de almidón fue determinado de acuerdo con los procedimientos descritos en Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) (3) y para la determinación de Proteína Bruta (PB) se utilizó la metodología propuesta por Kirk (23).

### Análisis estadístico

Los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa presente en los forrajes evaluados fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA), seguido por el procedimiento de Tukey ( $p < 0,05$ ).

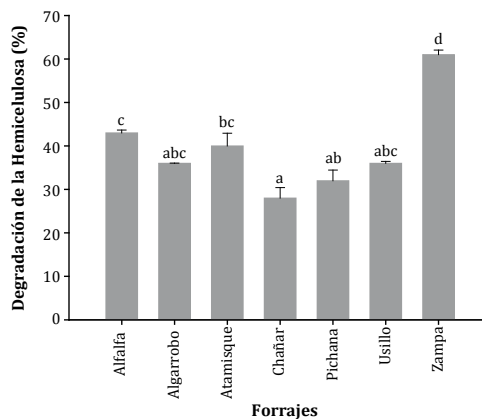
El análisis de correlación entre los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa y la composición nutricional de los forrajes evaluados fue analizado mediante el coeficiente de correlación de Pearson ( $p < 0,05$ ).

Todos los procedimientos estadísticos fueron determinados utilizando el software estadístico InfoStat (14).

### RESULTADOS

Las cepas *P. xylanivorans* 2 y *P. ruminis* 153 fueron evaluadas por su actividad hemicelulolítica. Para ello fue analizada la utilización de las pentosas totales y la degradación de la hemicelulosa desde una forma insoluble en alcohol-acidificado a una forma soluble, mediante el cultivo de las cepas en medios con forrajes intactos, como la única fuente de energía. La cepa *P. ruminis* 153 mostró una escasa evidencia de degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en los diversos forrajes evaluados.

En la figura 1 se observa el porcentaje de degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa y en diversas forrajeras nativas por la cepa *P. xylanivorans* 2.



**Figura 1.** Degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa y en diversas forrajeras nativas por la cepa *P. xylanivorans* 2. Las especies forrajeras nativas analizadas fueron: *Medicago sativa* (alfalfa), *Prosopis flexuosa* (algarrobo), *Capparis atamisquea* (atamisque), *Geofroea decorticans* (chañar), *Mimosa ephedroides* (pichana), *Tricomaria usillo* (usillo) y *Atriplex lampa* (zampa). Letras distintas por encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 1.** Degradation of hemicellulose from alfalfa hay and native forage by *P. xylanivorans* 2. Forage species analyzed were: *Medicago sativa* (alfalfa), *Prosopis flexuosa* (algarrobo), *Capparis atamisquea* (atamisque), *Geofroea decorticans* (chañar), *Mimosa ephedroides* (pichana) *Tricomaria usillo* (usillo) and *Atriplex lampa* (zampa). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

La degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa por *P. xylanivorans* 2 ( $42,80 \pm 0,65$  %) fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la degradación obtenida para las especies forrajeras nativas *G. decorticans* ( $27,50 \pm 2,40$ %) y *M. ephedroides* ( $32,00 \pm 2,45$ %).

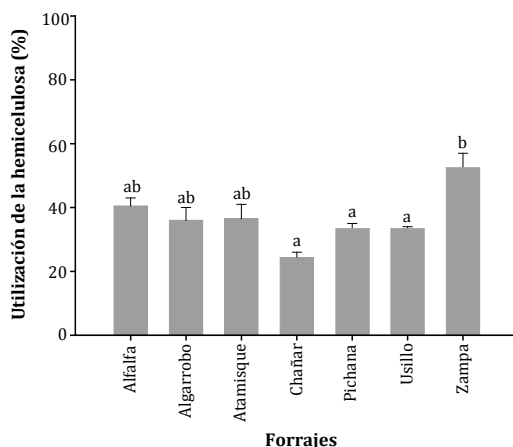
Mientras que la degradación de la hemicelulosa contenida en *A. lampa* ( $61,20 \pm 1,05$ %) fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la degradación obtenida en el heno de alfalfa ( $42,80 \pm 0,65$ %).

El porcentaje de degradación de la hemicelulosa del resto de las forrajeras nativas (*P. flexuosa*:  $36,40 \pm 0,05$ %; *C. atamisquea*:  $39,90 \pm 2,90$ % y *T. usillo*:  $36,40 \pm 0,45$ %) fue

similar a la degradación de la hemicelulosa presente en el heno de alfalfa.

En la figura 2 se observa el porcentaje de utilización de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa y en diversas forrajeras nativas por la cepa *P. xylanivorans* 2.

Los porcentajes de utilización de la hemicelulosa contenida en todas las forrajeras nativas analizadas (*P. flexuosa*:  $36,00 \pm 4,00$ %; *C. atamisquea*:  $36,50 \pm 4,50$ %; *G. decorticans*:  $24,50 \pm 1,50$ %; *M. ephedroides*:  $33,50 \pm 1,50$ %; *T. usillo*:  $33,50 \pm 0,50$ % y *A. lampa*:  $52,50 \pm 4,50$ %) fueron similares a los porcentajes de utilización de la hemicelulosa presente en el heno de alfalfa ( $40,50 \pm 2,50$ %) por la cepa *P. xylanivorans* 2.



**Figura 2.** Utilización de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa y en diversas forrajeras nativas por la cepa *P. xylanivorans* 2. Las especies forrajeras nativas analizadas fueron: *Medicago sativa* (alfalfa), *Prosopis flexuosa* (algarrobo), *Capparis atamisquea* (atamisque), *Geofroea decorticans* (chañar), *Mimosa ephedroides* (pichana), *Tricomaria usillo* (usillo) y *Atriplex lampa* (zampa). Letras distintas por encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figure 2.** Utilization of hemicellulose from alfalfa hay and native forage by *P. xylanivorans* 2. Forage species analyzed were: *Medicago sativa* (alfalfa), *Prosopis flexuosa* (algarrobo), *Capparis atamisquea* (atamisque), *Geofroea decorticans* (chañar), *Mimosa ephedroides* (pichana) *Tricomaria usillo* (usillo) and *Atriplex lampa* (zampa). Different letters above the bars indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de degradación y de utilización de la hemicelulosa en la mayoría de las especies forrajeras digeridas por *P. xylanivorans* 2.

Sin embargo, la especie forrajera *T. usillo* presentó un menor porcentaje de utilización de la hemicelulosa con respecto al porcentaje de degradación de la misma.

Al analizar la degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en las diversas forrajeras nativas, resulta interesante destacar que *P. xylanivorans* 2 obtuvo el mayor porcentaje de degradación y utilización a partir de *A. lampa*. Mientras que el menor porcentaje de degradación de la hemicelulosa fue obtenido en *G. decorticans*. *P. xylanivorans* 2 obtuvo bajos porcentajes de utilización de las pentosas liberadas

a partir de la hemicelulosa contenida en *G. decorticans*, *M. ephedroides* y *T. usillo*.

La correlación entre la composición nutricional de las especies forrajeras analizadas y los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa podrían explicar estas variaciones.

La tabla 1 muestra la composición nutricional de los diferentes componentes de las células vegetales en las diversas especies forrajeras en las que se analizó el porcentaje de degradación y utilización de la hemicelulosa por *P. xylanivorans* 2.

Dentro de los componentes de la pared celular vegetal, el coeficiente de correlación entre el contenido de FND y los porcentajes de degradación ( $R^2 = -0,96$ ,  $p < 0,001$ ) y utilización ( $R^2 = -0,89$ ,  $p < 0,01$ ) de la hemicelulosa, explican las variaciones observadas en la capacidad hemicelulolítica de *P. xylanivorans* 2.

**Tabla 1.** Composición nutricional de los diferentes componentes de las células vegetales de las especies forrajeras analizadas.

**Table 1.** Nutritional composition of the different components of plant cells of forage species analyzed.

| Forrajes             | Componentes celulares |                              |        |         |          |          |                          |            |
|----------------------|-----------------------|------------------------------|--------|---------|----------|----------|--------------------------|------------|
|                      | Cutina (% FND)        | Pared celular vegetal (% MS) |        |         |          |          | Contenido celular (% MS) |            |
|                      |                       | FND                          | FAD    | LAD     | Hemicel. | Celulosa | PB                       | Almidón    |
| <i>M.sativa</i>      | 0,3 ± 0,1*            | 62 ± 2                       | 49 ± 2 | 10 ± 2  | 12 ± 1   | 46 ± 2   | 15 ± 2                   | 3 ± 0,1    |
| <i>P.flexuosa</i>    | 0,4 ± 0,05            | 63 ± 1                       | 38 ± 1 | 8 ± 1   | 24 ± 1   | 31 ± 1   | 10 ± 2                   | 1 ± 0,2    |
| <i>C.atamisquea</i>  | 0,1 ± 0,02            | 63 ± 3                       | 37 ± 1 | 5 ± 1   | 25 ± 3   | 27 ± 3   | 11 ± 1                   | 0,3 ± 0,04 |
| <i>G.decorticans</i> | 0,3 ± 0,06            | 40 ± 1                       | 42 ± 2 | 7 ± 1   | 28 ± 3   | 36 ± 1   | 15 ± 4                   | 0,4 ± 0,04 |
| <i>M.ephedroides</i> | 0,4 ± 0,01            | 68 ± 1                       | 50 ± 4 | 6 ± 1   | 18 ± 5   | 39 ± 3   | 9 ± 3                    | n/d        |
| <i>T.usillo</i>      | 0,3 ± 0,01            | 61 ± 2                       | 45 ± 1 | 5 ± 1   | 16 ± 0,6 | 32 ± 2   | 8 ± 2                    | 0,2 ± 0,05 |
| <i>A.lampa</i>       | 0,1 ± 0,01            | 43 ± 2                       | 25 ± 3 | 1 ± 0,2 | 18 ± 6   | 25 ± 2   | 9 ± 1                    | 0,2 ± 0,02 |

MS: materia seca. FND: fibra neutro detergente. FAD: fibra ácido detergente. LAD: lignina ácido detergente. Hemicel: hemicelulosa. PB: proteína bruta. n/d: no detectable por el método utilizado, debido a una muy baja concentración en la muestra.

\*Valor promedio ± Error Estándar.

DM: dry matter. NDF: neutral detergent fiber. ADF: acid detergent fiber. ADL: acid detergent lignin. Hemicel: hemicellulose. CP: crude protein. n/d: not detectable by the method used, due to a very low concentration in the sample.

\*Media ± Standard Error.



Dentro de los componentes de la fibra vegetal, los coeficientes de correlación entre el contenido de LAD y los porcentajes de degradación ( $R^2 = -0,78, p < 0,05$ ) y utilización ( $R^2 = -0,65, p < 0,05$ ) de la hemicelulosa, sugieren que la concentración de LAD influiría en la degradación y utilización de la hemicelulosa presente en la pared celular de las especies forrajeras evaluadas. No se encontró una correlación estadística entre los componentes no estructurales (cutina) o el contenido de las células vegetales y los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa.

## DISCUSIÓN

La escasa evidencia de degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en los diversos forrajes evaluados por la cepa *P. ruminis* 153 confirma los hallazgos de Dalrymple *et al.* (1999), Kopečný *et al.* (2003) y Grilli *et al.* (2014), quienes reportaron valores poco significativos de utilización y degradación del xilano, por las cepas de *P. ruminis*.

La degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa por *P. xylanivorans* 2 fue similar a la degradación obtenida por las especies bacterianas ruminales *Prevotella ruminicola* y *Lachnospira multiparus* a partir de este mismo forraje (7). Esta última cepa, ha sido reportada por su habilidad para la degradación de la hemicelulosa contenida en estadios avanzados de maduración de la alfalfa (7).

Mientras que *P. ruminicola*, que posee una reconocida actividad hemicelulolítica (10), es capaz de degradar grandes porcentajes de hemicelulosa presente en el heno de alfalfa, pero carece de habilidad para utilizar las pentosas liberadas de la hemicelulosa como consecuencia de esta degradación (7).

La degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa por *P. xylanivorans* 2 fue superior a los porcentajes obtenidos por la mayoría de las bacterias ruminales celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*) reportadas por Cohen y Dehority (1970).

Desde hace un tiempo se reconoce que las bacterias clasificadas como *Butyrivibrio fibrisolvens* incluyen una amplia variedad de biotipos, lo cual fue confirmado por estudios basados en el análisis de las secuencias del gen ADN<sub>r</sub> 16S (36).

Las cepas de *P. xylanivorans* pertenecen al grupo de bacterias similares a los butyrivibrios debido a que comparten diversas características fisiológicas (19, 24, 25).

Sin embargo, se observó una menor degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa por las cepas *B. fibrisolvens* (7), con respecto al valor de degradación obtenido por *P. xylanivorans* 2. Esto confirma la gran capacidad hemicelulolítica reportada en *P. xylanivorans* por Marinšek-Logar *et al.* (2000), quienes clasificaron a esta especie bacteriana como responsable de la mayor actividad hemicelulolítica entre las bacterias del rumen analizadas hasta la actualidad.

La utilización de las pentosas liberadas a partir de la degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa por *P. xylanivorans* 2, fue superior a los porcentajes obtenidos en la mayoría de las bacterias ruminales reportadas por Cohen y Dehority (1970), en condiciones de cultivo similares a las reportadas en este estudio. Según estos autores, las bacterias ruminales celulolíticas (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. flavefaciens*) no evidenciaron utilización de la hemicelulosa contenida en estadios avanzados de maduración de la alfalfa.

Sin embargo, *R. albus* 7 evidenció un porcentaje de utilización de la hemicelulosa inferior al obtenido por *P. xylanivorans* 2. De esta manera, *R. albus* se suma al resto de las bacterias ruminales (*B. fibrisolvens*, *P. ruminicola* y *L. multiparus*) reportadas por Cohen y Dehority (1970), las cuales evidenciaron una menor utilización de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa, con respecto al valor de utilización obtenido por *P. xylanivorans* 2.

*P. xylanivorans* 2 posee una gran capacidad para degradar la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa y una capacidad superior a la de cualquier especie bacteriana ruminal reportada para utilizar las pentosas obtenidas de la hemicelulosa degradada.

Debido a que la degradación de la hemicelulosa precede a la utilización de este sustrato (10), se demostró que *P. xylanivorans* 2 utiliza la totalidad de las pentosas liberadas a partir de la hemicelulosa contenida en la pared celular de la mayoría de las especies forrajeras analizadas, con la excepción de la especie arbustiva *T. usillo*. Un resultado similar fue reportado por Grilli *et al.* (2014), quienes analizaron la utilización de una fuente purificada de hemicelulosa, como sustrato de crecimiento, en *P. xylanivorans* 2. Esto podría indicar que la estructura molecular de la hemicelulosa puede influir en la degradación y utilización de este sustrato por las bacterias ruminales. Sin embargo, son necesarios mayores estudios para confirmar esta presunción.

Al analizar los diferentes componentes de la pared celular vegetal, la correlación encontrada entre el contenido de fibra vegetal (FND) y los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa, explicarían

las variaciones observadas en la capacidad hemicelulolítica de *P. xylanivorans* 2.

Dentro de los componentes de la fibra vegetal, la correlación entre el contenido de LAD en la pared celular de las diferentes especies forrajeras y los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa, sugieren que la lignina impediría la degradación y utilización de la hemicelulosa presente en la pared celular de las especies forrajeras evaluadas.

Resultados similares fueron obtenidos por Dehority y Johnson (1961) al relacionar el contenido de lignina en diversos forrajes y la digestibilidad de la celulosa.

Los trabajos reportados por Grenet y Besle (1991) y Jung y Engels (2001), indican que la lignina inhibe la hidrólisis y utilización de los carbohidratos estructurales de la pared celular vegetal y actúa como una barrera entre la celulosa y hemicelulosa y las bacterias fibrolíticas, impidiendo que éstas utilicen eficientemente estos polisacáridos para su crecimiento.

Además, las paredes celulares lignificadas no son lo suficientemente porosas para permitir la libre difusión de las enzimas fibrolíticas (17), interfiriendo con la acción de estas enzimas bacterianas.

La falta de correlación entre los componentes no estructurales (cutina) o el contenido de las células vegetales y los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa, permite inferir que la disponibilidad de sustratos fermentativos como la hemicelulosa, celulosa, almidón o proteína no limita la capacidad de *P. xylanivorans* 2 en degradar y luego utilizar la hemicelulosa contenida en las especies forrajeras analizadas.

## CONCLUSIONES

*P. xylanivorans* 2 posee una gran capacidad para degradar la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa y dicha capacidad es superior a la informada en bacterias celulolíticas y en especies de butirivibrios relacionadas.

La utilización de las pentosas liberadas a partir de la degradación de la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa fue similar a la utilización de la hemicelulosa presente en todas las forrajeras nativas analizadas y fue superior al valor de utilización informado en la mayoría de las bacterias ruminales.

Los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en *A. lampa* fueron superiores a los valores reportados en el heno de alfalfa. Además, se demostró que *P. xylanivorans* 2 no tiene la capacidad de utilizar la totalidad de las pentosas liberadas a partir de la degradación de la hemicelulosa contenida en *T. usillo*.

El contenido de lignina presente en la pared celular de los forrajes analizados explican las diferencias en los porcentajes de degradación y utilización de la hemicelulosa por la cepa *P. xylanivorans* 2.

El carácter *in vitro* de estos resultados, si bien incrementa el conocimiento del aprovechamiento de los nutrientes contenidos en las forrajeras nativas por la microbiota ruminal de los caprinos Criollos, impide su potencial utilización en la situación real de producción caprina ya que requiere de mayor información que establezcan las interacciones microbianas en el ecosistema ruminal. Sin embargo, los resultados proporcionan un marco para intentar la manipulación de la fermentación ruminal en estas cabras.

La actividad hemicelulolítica del ambiente ruminal podría ser modificada mediante la incorporación de la cepa *P. xylanivorans* 2 como probiótico. Para ello, continúan siendo necesarios mayores estudios que determinen la capacidad de *P. xylanivorans* 2 para ser utilizada como cepa probiótica y su utilización como una herramienta en las estrategias de manipulación de la fermentación ruminal, orientadas a mejorar la eficiencia de la producción de carne caprina en los sistemas áridos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akin, D. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron Jour*. 81(1): 17-25.
2. Allegretti, L.; Sartor, C., Paez, S.; Egea, V.; Fucili, M.; Passera, C. 2012. Effect of physiological state of Criollo goats on the botanical composition of their diet in NE Mendoza, Argentina. *Small Ruminant Res.* 103: 152-157.
3. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 2000. 17<sup>th</sup> ed. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD. USA.
4. Brown, A. 1947. Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Archives of Biochemistry*. 11: 269-278.
5. Caldwell, D.; Bryant, M. 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl Microbiol.* 14: 794-801.
6. Cheng, K.; Mcallistert, A.; Mathiesens, D.; Blix, A; Orpin, C.; Costertonj, W. 1993. Seasonal changes in the adherent microflora of the rumen in high-arctic Svalbard reindeer. *Can J Microbiol.* 39: 101-108.

7. Cohen, J.; Dehority, B. 1970. Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. *Appl Microbiol.* 20(3): 362-368.
8. Crampton, E.; Maynard, L. 1938. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. *The Journal of Nutrition.* 15(4): 383-395.
9. Dalrymple, B.; Swadling, Y.; Layton, I.; Gobius, K.; Xue, G. 1999. Distribution and evolution of the xylanase genes *xynA* and *xynB* and their homologues in strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3660-3667.
10. Dehority, B. 1967. Rate of isolated hemicellulose degradation and utilization by pure cultures of rumen bacteria. *Appl Microbiol.* 15(5): 987-993.
11. Dehority, B. 2003. *Rumen Microbiology*. Ed. Nottingham University Press. Nottingham. UK.
12. Dehority, B.; Johnson, R. 1961. Effect of particle size upon the *in vitro* cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. *J Dairy Sci.* 44(12): 2242-2249.
13. Dehority, B.; Scott, H. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. *J Dairy Sci.* 50(7): 1136-1141.
14. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. 2011. *InfoStat* versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
15. Goering, H.; van Soest, P. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agric. Handbook*. N° 379, Washington. USA.
16. Grandón, N. G.; Alarcón, Y.; Moreno, M. V.; Arolfo, V.; Orodizzi, A.; Basigalup, D. H.; Gieco, J. O.; Bruno, C. 2013. Genetic diversity among alfalfa genotypes (*Medicago sativa* L.) of non-dormant cultivars using SSR markers and agronomic traits. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 45(2): 181-195.
17. Grenet, E.; Barry P. 1991. Microbial degradation of normal maize and bm3 maize in the rumen observed by scanning electron microscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 54(2): 199-210.
18. Grenet, E.; Besle, J. 1991. Microbes and fibre digestion. In: Jouany, J. (Ed.) *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. French National Institute for Agricultural Research. France. 109-129.
19. Grilli, D.; Cerón, M.; Paez Lama, S.; Egea, V.; Schnittger, L.; Cravero, S.; Sosa Escudero, M.; Allegretti, L.; Arenas, G.N. 2013. Isolation of *Pseudobutyrvibrio ruminis* and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* from rumen of Creole goats fed native forage diet. *Folia Microbiol.* 58(5): 367-373.
20. Grilli, D.; Kopečný, J.; Mrázek, J.; Marinšek-Logar, R.; Paez Lama, S.; Sosa Escudero, M.; Arenas, G.N. 2014. Identification of GH10 xylanases in strains 2 and Mz5 of *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*. *Folia Microbiol.* 59(6): 507-514.
21. Hungate, R. 1966. *The rumen and its microbes*. Ed. Academic Press Inc., New York, USA.
22. Jung, H.; Engels, F. 2001. Alfalfa stem tissues: rate and extent of cell-wall thinning during ruminal degradation. *Neth J Agr Sci.* 49: 3-13.
23. Kirk, P.L. 1950. Kjeldahl Method for Total Nitrogen. *Anal Chem.* 22(2): 354-358.
24. Kobayashi, Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim Sci J.* 77(4): 375-385.
25. Kopečný, J.; Zorec, M.; Mrázek, J.; Kobayashi, Y.; Marinšek-Logar, R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate producing bacteria from the rumen. *Int J Sys Bacteriol.* 53: 1-9.
26. Marinšek-Logar, R.; Zorec, M.; Nekrep, F. 2000. Isolation and characterization of *Butyrivibrio*-like rumen bacteria possessing high xylanolytic activity. *Reprod Nutr Dev.* 40: 191-192.
27. Orpin, C.; Mathisen, S.; Greenwood, Y.; Blix, A. 1985. Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Appl Environ Microbiol.* 50: 144-151.
28. Ruiz, A.J. 2012. Influencia de los contenidos de compuestos secundarios en especies forrajeras nativas en diferentes estados fenológicos sobre la selección y preferencia de cabras criollas en el NE de Lavalle, Mendoza. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina. 30 p.

29. Schneider, W. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol.* 3: 680-684.
30. Silanikove, N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Res.* 35: 181-193.
31. Silanikove, N.; Brosh, A. 1989. Lignocellulose degradation and subsequent metabolism of lignin fermentation products by the desert black Bedouin goat fed on wheat straw as a single component diet. *Brit J Nutr.* 62: 509-520.
32. Thomas, R.; Lynch, D. 1961. A method for the quantitative estimation of pentoses in soil. *Soil Sci.* 91: 312-316.
33. van Gylswyk, N.; Hippe, H.; Rainey, F. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype. *Int J Sys Bacteriol.* 46: 559-563.
34. van Soest, P.; Robertson, J.; Lewis, B. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
35. Wallace, R. 1994. Ruminal microbiology biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. *J Anim Sci.* 72(11): 2992-3003.
36. Willems, A.; Amat-Marco, M.; Collins, M. 1996. Phylogenetic analysis of *Butyrvibrio* strains reveals three distinct groups of species within the *Clostridium* subphylum of the Gram-positive bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 195-199.