

CRECIMIENTO DE BACTERIAS RUMINALES EN UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PASTA DE *Jatropha curcas* L. SIN DETOXIFICAR

RUMEN BACTERIA GROWTH IN A CULTURE MEDIUM OF *Jatropha curcas* L. PULP WITHOUT DETOXIFICATION

Alejandro Ley-de Coss¹, Willians de León-de León², Cándido E. Guerra-Medina^{3*},
Consepción Arce-Espino¹, Rene Pinto-Ruiz⁴

¹Cuerpo Académico de Ganadería Tropical Sustentable de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH). Entronque carretera costera S/N, Huehuetán, Chiapas, México. CP. 36670. Fax: 01 (964) 62 70128. ²Programa Maestría en Ciencias de Producción Agropecuaria Tropical de la UNACH. ³Centro Universitario de la Costa Sur, División de Desarrollo Regional, Universidad de Guadalajara, Autlán de Navarro, Jalisco, México. (enrique.guerra@cucsur.udg.mx). ⁴Cuerpo Académico en Agroforestería Pecuaria de la Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V de la UNACH, Villaflores, Chiapas, México.

RESUMEN

La pasta de *Jatropha curcas* L. tiene hasta 60 % de proteína cruda; pero no se usa como alimento para rumiantes por su contenido de ésteres de forbol y otros compuestos tóxicos. Estos se han extraído y cuantificado con métodos químicos, físicos y biológicos y los resultados son variables. Además los estudios relacionados con el uso de este sustrato por las bacterias ruminales son limitados. El objetivo este estudio fue evaluar la actividad fermentativa de un consorcio de bacterias seleccionadas en medio de cultivo con pasta de *J. curcas*, sin detoxificar. Como sustrato se prepararon medios de cultivo con 0.2 g de la pasta, se inocularon con líquido ruminal fresco (LRF) y se incubaron 10 d a 38 ± 0.05 °C. Los tratamientos fueron (fuentes de inóculo): T1, líquido ruminal fresco (LRF) y; T2, bacterias ruminales utilizadoras de pasta de *J. curcas* (BRUpj). El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Las variables fueron concentración total de bacterias, ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal, pH del medio y degradación *in vitro* de la materia seca (DivMS) a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. En la población de bacterias totales, la DivMS y el pH entre los tratamientos evaluados no hubo diferencias ($p > 0.05$). La concentración de ácido acético fue mayor en T1 ($p \leq 0.05$) a las 3, 6 y 12 h, y la de NH_4 fue mayor ($p \leq 0.05$) en T2 en todos los tiempos. Las bacterias en LRF y BRUpj mostraron capacidad para degradar la pasta de *J. curcas*, sin detoxificar.

ABSTRACT

The pulp of *Jatropha curcas* L. contains up to 60 % of crude protein; still, it is not used as ruminant feed due to its content of phorbol esters and other toxic compounds. These compounds have been extracted and quantified with chemical, physical and biological methods with variable outcomes. Furthermore, studies related to the use of this substrate by rumen bacteria are limited. The objective of this study was evaluate the fermentation activity of a bacteria consortium selected in a *J. curcas* culture pulp medium, without detoxification. As substrate, the culture media was prepared with 0.2 g of *J. curcas* pulp, inoculated with fresh rumen fluid (FRF) and incubated at 38.5 °C for 10 d. The treatments were (sources of inoculum): T1, fresh ruminal fluid (FRF); and T2, rumen bacteria utilizing *J. curcas* pulp (BRUpj). The experimental design was completely randomized with four replications. The variables were: total bacterial concentration, volatile fatty acids, ammonium nitrogen, pH of the medium and dry matter *in vitro* degradation (DMivD) at 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h of incubation. In the total bacterial population the DMivD and pH between treatments showed no statistical difference ($p > 0.05$). Acetic acid concentration was higher in T1 ($p \leq 0.05$) at 3, 6 and 12 h, and NH_4 was higher ($p \leq 0.05$) in T2 at all times. Bacteria in FRF and in BRUpj showed ability to degrade the *J. curcas* pulp without detoxification.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2015. Aprobado: octubre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 50: 1001-1011. 2016.

Key words: Ruminants, rumen microbiology, *Jatropha curcas*.

Palabras clave: Rumiantes, microbiología ruminal, *Jatropha curcas*.

INTRODUCCIÓN

Especies de plantas como la *Ricinus communis* L., *Elaeis guineensis* Jacq. y *Jatropha curcas* se han evaluado para extraer aceite. De la extracción industrial del aceite de la semilla de *J. curcas* se obtiene como subproducto una pasta que contiene más de 30 % de proteína cruda (PC) (Liberalino *et al.*, 1988). Esta pasta se podría usar como fuente de proteína para rumiantes. Pero la pasta contiene ésteres de forbol y otros factores antinutricionales como ricina y ricinina (Macedo *et al.*, 2011), inhibidores de tripsina, ácido fítico, lectina y saponinas. Procesos para inactivar estas sustancias (Saetae y Suntornsuk, 2011) son: el calentamiento a 160 °C por 30 min; la extracción con etanol, metanol y éter de petróleo; el tratamiento con NaHCO₃, y fermentación de la pasta por hongos como *Bjerkandera adusta*, *Cunninghamella echinulata* o *Phelebia rufa*, y bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*. Esos métodos alcanzan eficiencias de 75 a 100 % (Runumi *et al.*, 2015), pero son costosos y el uso de compuestos químicos puede dejar residuos en el producto final (Saetae y Suntornsuk, 2010 y 2011), por lo cual se debe buscar alternativas más eficientes.

El rumen contiene especies bacterianas con capacidad de adaptación y modificación genética (Dehority, 2003). Alrededor de 22 especies predominantes están identificados (Krause y Russell, 1996); éstas permiten a los rumiantes usar materiales vegetales y subproductos agroindustriales que generan ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana (Van Soest, 1994). Según Cobos *et al.* (2011), esta estimación sólo representa una proporción pequeña de la población total en el rumen. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue desarrollar *in vitro* un consorcio de bacterias ruminales con capacidad para degradar la pasta de *J. curcas* sin detoxificar, y que degrade *in vitro* los ésteres de forbol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV de la Universidad Autónoma de Chiapas, en entronque carretera

INTRODUCTION

Plant species like *Ricinus communis* L., *Elaeis guineensis* Jacq. and *Jatropha curcas* have been studied for oil extraction. From the industrial extraction of *J. curcas* oil seed a pulp is obtained as a by-product, which crude protein content (CP) is greater than 30 % (Liberalino *et al.*, 1988). This pulp could be used as a protein source for ruminants. But the pulp contains phorbol esters and other anti-nutritional factors such as ricine and ricinine (Macedo *et al.*, 2011), trypsin inhibitors, phytic acid, lectine and saponins. Processes to inactivate these substances (Saetae and Suntornsuk, 2011) are: heating at 160 °C for 30 min; extraction with ethanol, methanol and petroleum ether; treatment with NaHCO₃, fermenting the pulp with yeasts such as *Bjerkandera adusta*, *Cunninghamella echinulata* or *Phelebia rufa* and bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*. These methods achieve efficiencies of 75 % up to 100 % (Runumi *et al.*, 2015), but they are costly and the use of chemicals can leave residues in the final product (Saetae and Suntornsuk, 2010 and 2011). Therefore, it is necessary to seek more efficient alternatives.

The rumen contains bacterial strains with the ability to adapt and undergo genetic modifications. (Dehority, 2003). About 22 predominant species are identified (Krause and Russell, 1996); these bacteria allow ruminants to use plant material and agro industry byproducts that generate volatile fatty acids (VFA) and microbial proteins (Van Soest, 1994). According to Cobos *et al.* (2011), this estimation represents only a small proportion of the total bacterial population in the rumen. Therefore, the objective of this study is to develop *in vitro*, a consortium of rumen bacteria with ability to break down *J. curcas's* pulp without detoxification, which can degrade *in vitro* phorbol esters.

MATERIALS AND METHODS

Study area

This study was carried out at the Animal Biotechnology Laboratory, Faculty of Agricultural Sciences, Campus IV of the Universidad Autónoma de Chiapas, in the junction of coastal highway and Huehuetán, Chiapas (14° 54' 29" N, 92° 15' 38" O, 50 m altitude, rainfall of 2326 mm per year, average annual

costera y Pueblo de Huehuetán, Chiapas (14° 54' 29" N, 92° 15' 38" O, 50 m de altitud, precipitación pluvial de 2326 mm anuales, temperatura promedio anual de 28 °C y clima cálido húmedo con lluvias en verano).

Medio de cultivo

Cien mililitros del medio de cultivo anaerobio (MCA) contenían 47.9 mL de agua destilada, 30.0 mL de líquido ruminal clarificado (filtrado en una gasa triple y centrifugado a 20 817 g por 15 min, a 4 °C y esterilizado a 121 °C por 15 min a 15 psi en autoclave; Felisa, FE-397, México), 5 mL de solución mineral I (6 g K_2HPO_4 1000 mL⁻¹), 5 mL de solución mineral II (6 g K_2HPO_4 , 6 g $(NH_4)_2SO_4$, 12 g NaCl, 2.45 g $MgSO_4$ y 1.6 g $CaCl_2 \cdot H_2O$ en 1000 mL de solución final), 5 mL de Na_2CO_3 en solución 8 % (8 g de Na_2CO_3 en 100 mL de agua destilada), 5 mL de acetato de sodio al 1.5 % (1.5 g acetato de sodio en 100 mL de agua destilada), 2 mL solución de sulfido-cisteína (2.5 g L-cisteína disuelta en 15 mL de NaOH 2 N+2.5 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ en 100 mL de H_2O), 0.1 mL de solución de resazurina al 0.1% (0.1 mL de resazurina en volumen final de 100 mL calentada hasta que el indicador pierde su coloración), 0.2 g de tripticasa-peptona y 0.10 g de extracto de levadura (Ley de Coss *et al.*, 2011, 2013).

Aislamiento de BRUpj

La capacidad de adaptación y viabilidad del consorcio de bacterias del rumen se evaluó en el medio de cultivo con pasta de *J. curcas* (primer aislamiento). Para esto, en viales de cultivo de 250 mL se depositaron 150 mL del MCA y 3.0 g de pasta de *J. curcas* desengrasada sin detoxificar. Todo el procedimiento se realizó bajo flujo de CO_2 , y se adicionaron 50 mL de LRF de bovino macho extraído con sonda esofágica. El medio se mantuvo 10 d a 38 ± 0.05 °C. Luego, a 10 tubos (13×100 mm PYREX®, México) con 4.5 mL de MCA se adicionó 0.1 g de la pasta, se inoculó con 0.5 mL del cultivo de bacterias que se mantuvieron activas en el primer aislamiento y se mantuvieron 7 d a 38 ± 0.05 °C, el gas producido se liberó cada 24 h. Luego, 0.5 mL de este cultivo se transfirieron a tubos de 13×100 mm (PYREX®, México) con 4.5 mL del MCA nuevo estéril, con las mismas características, y se incubaron 24 h. El cultivo se transfirió a viales con 50 mL de medio de cultivo para crecimiento de bacterias ruminales utilizadoras de pasta de *J. curcas* (BRUpj), y se mantuvieron 48 h a 38 ± 0.05 °C. Este cultivo fue el inóculo de posibles BRUpj (T2).

Degradación *in vitro* de la MS (DivMS)

Pasta (0.2 g) de *J. curcas* en tubos de ensayo (18×150 mm; PYREX®, México) se esterilizó por 15 min a 121 °C, se agregaron

temperature of 28 °C and humid warm climate with summer rains).

Culture medium

One hundred milliliters of anaerobic culture medium (ACM) containing: 47.9 mL of distilled water, 30 mL of clarified rumen fluid (filtrated in a triple gauze and centrifuged at 20 817 g for 15 min at 4 °C and sterilized at 121 °C for 15 min at 15 psi in an autoclave; Felisa, FE-397, Mexico), 5 mL of mineral solution I (6 g K_2HPO_4 1000 ML⁻¹), 5 mL of mineral solution II (6 g K_2HPO_4 , 6 g $(NH_4)_2SO_4$, 12 g NaCl, 2.45 g $MgSO_4$ and 1.6 g $CaCl_2 \cdot H_2O$ in a 1000 mL of final solution), 5 mL of 8 % Na_2CO_3 solution (8 g of Na_2CO_3 in 100 mL of distilled water), 5 mL of sodium acetate 1.5 % (1.5 g sodium acetate in 100 mL of distilled water), 2 mL of sulfide-cysteine solution (2.5 g L-cysteine dissolved in 15 mL of 2N NaOH+2.5 g of $Na_2S \cdot 9H_2O$ dissolved in 100 mL H_2O), 0.1 mL 0.1 % resazurin (0.1 mL of resazurin in 100 mL final volume of heated until the indicator loses its color), 0.2 g of peptone trypticase and 0.10 g yeast extract (Ley de Coss *et al.*, 2011, 2013).

BRUpj Isolation

The adaptation capacity and viability of the bacterial consortium from the rumen bacteria were evaluated in a culture medium with *J. curcas* pulp (first isolation). In 250 mL culture vials, containing 150 mL of ACM and 3 g of degreased *J. curcas* pulp without detoxification, 50 mL of FRF extracted from male bovines through a tube in the esophagus were added. The whole procedure was performed under CO_2 flow. The medium was kept 10 d at 38 ± 0.05 °C. Then, in 10 tubes (13×100 mm PYREX®, Mexico) with 4.5 mL of ACM, 0.1 g of the pulp were added. These were inoculated with 0.5 mL of the bacteria that survived the first isolation and were kept for 7 days at 38 ± 0.05 °C. Produced gas was released every 24 h; afterwards 0.5 mL of this culture were transferred to 13×100 mm tubes (PYREX®, Mexico) containing 4.5 mL of new sterile ACM with the same characteristics and then incubated for 24 h. The culture was transferred to vials containing 50 mL of culture medium for rumen bacteria utilizing pulp of *J. curcas* (BRUpj) and kept at 38 ± 0.05 °C. This culture was used as the inoculum of potential BRUpj (T2).

Dry matter *in vitro* degradation (DMivD)

Test tubes (18×150 mm; PYREX®, Mexico) containing 0.2 g of *J. curcas* pulp were sterilized for 15 min at 121 °C, 9 mL of culture media were added afterwards. The procedure took

9 mL del medio de cultivo bajo flujo de CO₂, de acuerdo con la técnica reportada por Cobos y Yokoyama (1995) y se mantuvo a 38±0.05 °C por 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, después de inocularse con 1.0 mL de los inóculos (T1: LFR obtenido de un bovino con cánula ruminal; T2: BRUpj obtenido del proceso de aislamiento). En cada periodo de incubación se determinó la concentración del substrato no degradado. Después de cada periodo el pH se midió con un potenciómetro (OACTON, 43294, Singapur). En cada tratamiento se tomaron los valores promedio y se ajustaron a valores logarítmicos para obtener los promedios para prueba con datos ajustados (Häubi, 2004). Los resultados se calcularon con Microsoft Excel.

Recuento de bacterias totales (BT)

Con una pipeta tipo Pasteur, 0.5 mL de medio de cultivo se extrajo de cada tratamiento al finalizar cada periodo de incubación (3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h), por capilaridad se depositaron en una cámara Petroff-Hausser (Hausser #3900, Electron Microscopy Sciences, EE.UU.), con un área de 0.0025 mm² y profundidad de 0.02 mm. Para el recuento se usó un microscopio de contraste de fases (Biológico BX51, Olympus, EE.UU.), a una magnificación 1000X (Ley de Coss *et al.*, 2013). La cuenta bacteriana se calculó con la fórmula: cantidad de bacterias=(promedio) (factor de dilución, 2×10⁷). Además, la tasa de generación se determinó para conocer el tipo de crecimiento entre los inóculos (LRF *vs.* BRUpj) con la fórmula: $N=N_0 2^n$ (1), donde N : número final de células, N_0 : número inicial de células y n : número de generaciones durante el periodo de crecimiento exponencial. Por tanto, el tiempo de generación (tg) de la población bacteriana se calculó como t/n , donde t es tiempo y se determina con los datos de la fase de crecimiento exponencial, n se calculó con la transformación logarítmica de la ecuación 1: $n=3.3 [\log N - \log N_0]$ (Madigan *et al.*, 2009).

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Para determinar la concentración de AGV, nuevos MCA inoculados con LRF y BRUpj se mantuvieron por triplicado a 38±0.05 °C; luego a 2.0 mL de medio de cultivo se adicionaron 0.5 mL de ácido metafosfórico al 25 %; la mezcla se colocó en viales de plástico y se centrifugó a 17 664 g por 10 min, se agitó en un vórtex (Science MED, MX-S, EE.UU.) y se almacenaron a -10 °C. Para el análisis, 2 mL de la muestra descongelada, a 25 °C y centrifugada a 34 622 g, por 20 min, se depositaron en viales para cromatografía. El contenido de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases (Perkin-ElmerTM, Claurus 500; EE.UU.) con automuestreador y columna capilar (ELITE-FFAP de 15 m, Perkin-ElmerTM), detector

place under a CO₂ flow, following the technique reported by Cobos and Yokoyama (1995). The test tubes were incubated at 38±0.05 °C for 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h after inoculation with 1.0 mL of inoculum (T1: FRF obtained from a bivine with a ruminal cannula; T2: RBUpj obtained from the isolation process). During each incubation period the non-degraded substrate concentration was measured. After each period the pH was measured with a potentiometer (OACTON, 43294, Singapore). In each treatment the mean values were obtained and adjusted to logarithmic values in order to obtain the average for the test with set values (Häubi, 2004). The results were calculated with Microsoft Excel software.

Total bacterial count (TB)

With a Pasteur pipette, 0.5 mL of culture medium were removed from each treatment after the corresponding incubation period (3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h). They were by capillarity placed in a Petroff-Hausser counting chamber (Hausser #3900, Electron Microscopy Sciences, USA) with a 0.0025 mm² area and 0.02 mm depth. For the counting, a phase contrast microscope was used (Biological BX51, Olympus, USA), with a 1000X magnification (Ley de Coss *et al.*, 2013). The bacterial count was calculated using the formula: amount of bacteria=(mean) (dilution factor, 2×10⁷). In addition, the generation rate was determined in order to establish the type of growth among inoculums (FRF *vs.* RBUpj) using the formula: $N=N_0 2^n$ (1), where N : final number of cells, N_0 : initial number of cells and n : number of generations during the exponential growth period. Therefore, the generation time (gt) of the bacterial population was calculated as t/n , where t is time and it is established by the data from the exponential growth phase, n was calculated from the logarithmic transformation of equation 1: $n=3.3 [\log N - \log N_0]$ (Madigan *et al.*, 2009).

Concentration of volatile fatty acids (VFA)

In order to determine the VFA concentration, new ACM inoculated with FRF and RBUpj were kept (by triplicate) at 38.5 °C. Then, 2 mL of culture media, we added to 0.5 mL of 25 % metaphosphoric acid. The mixture was placed in plastic vials and centrifuged at 17 664 g for 10 min, were then stirred in a vortex (MED Science, MX-S, USA) and stored at 10 °C. For the analysis, 2 mL of the thawed sample, at 25 °C and centrifuged at 34 622 g for 20 minutes were deposited in vials for chromatography. The VFA content was determined in a gas chromatograph (Perkin-ElmerTM, Claurus 500; USA) with auto-sampler and capillarity column (ELITE-FFAP 15 m, Perkin-ElmerTM), flame ionization detector (FID), N₂ carrier gas at 60 psi, H₂ and O₂ were used to

de ionización de flama (FID), gas N₂ acarreador a 60 psi, H₂ y O₂ para generar la flama con un flujo de 45 y 450 mL min⁻¹, de acuerdo con el método descrito por Cobos *et al.* (2011).

Concentración de nitrógeno amoniacal

Dos mL de los medios para medir DivMS, en triplicado, se centrifugaron a 1000 g por 10 min, y 1.5 mL del sobrenadante se mezclaron con 0.375 mL de ácido metafosfórico (proporción 4:1), se mantuvieron en refrigeración y luego se centrifugaron a 13 000 g por 25 min. El sobrenadante se recuperó en viales de 2 mL y se almacenaron en congelación a -10 °C hasta su valoración; 20 µL de este sobrenadante se mezclaron con 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de sodio. Las muestras se mantuvieron a 37 °C por 30 min en baño maría, se adicionaron 5 mL de agua destilada, para diluir las muestras, se agitaron con un vortex (Science MED MX-S EE.UU.) y la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin-ElmerTM, Lambda-40; EE.UU.) calibrado con un método ($r^2=0.99$) de concentración de nitrógeno amoniacal según McCullough (1967).

Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones, los datos de la degradación de MS, concentración de AGV, concentración de nitrógeno amoniacal y pH en los medios de cultivo se analizaron con el procedimiento GLM. La concentración de bacterias totales se analizó con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (SAS, 2009). Los valores promedio se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Degradación *in vitro* de la MS

La DivMS de la pasta fue mayor ($p \leq 0.05$) en T1 (68.66 %) que en T2 (58.00 %) sólo a las 72 h (Cuadro 1). En ambos tratamientos hubo degradación del sustrato desde la hora 3 de incubación. Esto indica que las bacterias se adaptaron al medio y degradaron la pasta sin detoxificar. Kasuya *et al.* (2013) indican que DivMS de la pasta de *J. curcas* sin detoxificar fue 54.9 % y aumentó a 77.9 % cuando se modificó con el hongo *Pleurotus ostreatus* por 45 d; además, la concentración de ésteres de forbol en la pasta disminuyó 99 %. Martínez *et al.* (2005) reportan que la degradación *in vitro* de la proteína cruda de la pasta de *J. curcas*, mezclada con enzimas, para simular la digestibilidad en no

generate the flame with a 45 and 450 mL min⁻¹ flow, according to the method described by Cobos *et al.* (2011).

Ammonium nitrogen concentration

Two mL of the culture media were used to measure DMivD (by triplicate), were centrifuged at 1000 g for 10 min, 1.5 mL of the supernatant were then mixed with 0.375 mL of metaphosphoric acid (4:1). These were kept refrigerated and then centrifuged at 13 000 g for 25 min. The supernatant was then recovered in 2 mL vials and stored at -10 °C until their evaluation; 20 µL of this supernatant were mixed with 1 mL of phenol and 1 mL of sodium hypochlorite. The samples were incubated at 37 °C during 30 min in a water bath. 5 mL of distilled water were then added to dilute the samples and homogenized with a vortex (Science MED MX-S USA). The absorbance was measured at 630 nm in a UV-VIS spectrophotometer (Perkin-ElmerTM, Lambda-40, USA) calibrated with a method ($r^2=0.99$) for ammonium nitrogen concentration according to McCullough (1967).

Design and statistical analysis

The experimental design was completely random with four replications. Data of DM degradation, VFA, ammonium nitrogen concentration and pH of the culture media were analyzed using an GLM procedure, while the total bacteria concentration was analyzed by the Wilcoxon signed-rank test (SAS, 2009). Mean values were compared with the Tukey test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

DM *in vitro* degradation

The DMivD of the pulp was higher ($p \leq 0.05$) in T1 (68.66 %) than in T2 (58.00 %) only after 72 h (Table 1). In both treatments, degradation of the substrate took place from the 3rd hour of incubation on. This indicates that the bacteria adapted to the culture media and degraded *J. curcas* pulp without detoxification. Kasuya *et al.* (2013) indicate that DMivD of the *J. curcas* pulp without detoxification was 54.9 % and increased to 77.9 % when modified with the *Pleurotus ostreatus* fungus for 45 d; besides, the concentration of phorbol esters in the pulp decreased 99 %. Martínez *et al.* (2005) report that the *in vitro* degradation of crude *J. curcas* pulp protein mixed with enzymes to simulate non-ruminant digestibility

Cuadro 1. Degradación *in vitro* de la materia seca de pasta de *Jatropha curcas* y pH del medio de cultivo.**Table 1. Dry matter *in vitro* degradation of *Jatropha curcas* pulp and pH of culture media.**

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)						
	3	6	12	24	48	72	96
	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (%)						
T1	48.66	49.66	61.33	62.33	69.33	68.66a	69.66
T2	38.66	42.00	50.33	56.33	57.00	58.00b	60.33
EEM	19.83	38.16	45.83	36.33	30.66	18.16	38.33
	pH						
T1	5.62	5.82	5.65	5.46	5.62	5.69a	6.04
T2	5.80	5.66	5.71	5.59	5.44	5.45b	5.51
EEM	0.013	0.0059	0.029	0.059	0.009	0.0103	0.069

T1: inóculo de líquido ruminal fresco; T2: inóculo de bacterias ruminales utilizadoras de pasta de *J. curcas*. a b Promedios con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media ❖ T1: fresh ruminal innoculum fluid; T2: inoculum of rumen bacteria utilizing *J. curcas* pulp. a b Means with different letter in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean.

rumiantes fue 78.6 % e incrementó a 86 % cuando se calentó previamente. En nuestro estudio no se evaluó la degradación de los ésteres de forbol, por lo que no se puede asegurar que las bacterias lo degradaran. La degradación de los ésteres de forbol por *Pleurotus ostreatus*, *B. adusta*, *Ganoderma resinaceum* y *P. rufa* está documentado (Dias *et al.*, 2014; De Barros *et al.*, 2011). La degradación de los ésteres de forbol ocurre por actividad sinérgica entre las enzimas que catalizan la despolimerización de la lignina (actividad lignocelulósica de xilanasas, celulasas extracelulares y manganeso peroxidasa). El periodo de degradación de los ésteres de forbol es 15 a 30 d (Dias *et al.*, 2014; Najjar *et al.*, 2014). Esta actividad enzimática la presentan bacterias del rumen (Hazlewood y Teather, 1988; Dehority, 2003; Cobos *et al.*, 2011), pero el tiempo de incubación debe ser mayor a 15 d para observar su efecto.

El pH en T1 fue mayor ($p \leq 0.05$) que en T2 a las 72 h, sin diferencias entre los tratamientos ($p > 0.05$) en las demás horas (Cuadro 1). En ambos tratamientos el pH fue menor a 6.0, lo cual indica que las bacterias, que producen AGV o ácidos orgánicos, estuvieron activas (Scandolo *et al.*, 2007) y se adaptaron al medio ácido. Dehority (2003) indica que el pH es modificado por los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación; sin embargo, la actividad bacteriana se afecta cuando el pH del medio es menor

was 78.6 % and increased to 86 % when pre-heated. In our study the phorbol esters degradation was not evaluated, so it is not possible to assure that the bacteria will degrade it. The degradation of phorbol esters by *Pleurotus ostreatus*, *B. adusta*, *Ganoderma resinaceum* and *P. rufa* fungi has been documented (Dias *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2011). Phorbol esters degradation occurs due to the synergetic action of the enzymes that catalyze the depolymerization of lignin (xylanases lignocellulosic activity, extracellular cellulases and manganese peroxidase). The phorbol esters degradation period is 15 to 30 d (Dias *et al.*, 2014; Najjar *et al.*, 2014). This enzymatic activity is present in the rumen bacteria (Hazlewood and Teather, 1988; Dehority, 2003; Cobos *et al.*, 2011); but the incubation period must be more of than 15 d in order to observe its effect.

The pH in T1 was higher ($p \leq 0.05$) than in T2 at 72 h, without difference between treatments ($p > 0.05$) in the other hours (Table 1). In both treatments pH was lower than 6.0 which indicate that bacteria producing VFA or organic acids, were active (Scandolo *et al.*, 2007) and adapted to the acid medium. Dehority (2003) indicate that the pH is modified by the organic acids produced during fermentation; nevertheless, bacterial activity is affected when the medium pH is lower than 6.0, mainly that of those bacteria using structural

de 6.0, principalmente la de las bacterias que usan carbohidratos estructurales (Reynolds *et al.*, 1993). El pH en sistemas abiertos, como el rumen, puede ser menor a 6.0 por la acumulación de ácido láctico y esto ocurre cuando la dieta es rica en carbohidratos que se fermentan fácilmente, o es deficiente en fibra (Owens, 1998). Sin embargo en estudios *in vitro*, que son sistemas cerrados, la acumulación de los ácidos orgánicos en el medio afecta más el pH porque no hay flujo hacia otro sistema, lo que pudo ocasionar el pH menor de 6.0 en nuestro estudio. Martínez *et al.* (2006) señalan que el contenido de almidón en la pasta de *J. curcas* desgrasada es 112 g kg⁻¹ MS, que es bajo respecto al contenido del grano de maíz. Al respecto, Alfaro *et al.* (2009) reportan un contenido de almidón de 16 híbridos de maíz amarillo, entre 650 y 756 g kg⁻¹ MS (711 g kg⁻¹ MS en promedio).

Recuento de bacterias totales

La cuenta inicial de bacterias inoculadas (LRF y BRUpj) a los medios fue 10⁴ mL⁻¹ de medio de cultivo, lo cual se obtuvo en la prueba para medir desde DivMS de la pasta. La cuenta de bacterias totales a las 24 y 48 h fue mayor ($p \leq 0.05$) en T1 que en T2, pero a las 96 h fue mayor ($p \leq 0.05$) en T2 (4.06) (Cuadro 2). La cuenta de bacterias totales no aumentó durante el periodo de incubación y fue menor a la reportada en el rumen (10¹⁰ a 10¹² bacteria mL⁻¹) por Dehority (2003). El pH menor a 6.0 en ambos tratamientos pudo afectar el crecimiento, ya que en *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus* reducen su crecimiento cuando el pH del medio es menor a 6.2 (Reynolds *et al.*, 1993; Dehority, 2003).

Aunque se observó heterofermentación de las bacterias de LRF y BRUpj, el crecimiento exponencial fue 3.0 a 3.5 h⁻¹. Esto es lento, comparado con 1.5 h⁻¹ obtenido por Kunene *et al.* (2000) y Ley de Coss *et al.* (2013), quienes usaron un medio a base de D-(+)-glucosa y condiciones similares de cultivo; además, la tasa de generación fue 1.36 y 1.09 h con LRF y BRUpj, respectivamente. Lo anterior también es lento comparado con bacterias del rumen, cuya tasa de generación es de 15 a 30 min. El crecimiento exponencial y la tasa de generación pudieron afectarse por el pH menor de 6.0 y la concentración inicial baja de bacterias inoculadas al medio (10⁴). La población de bacterias disminuyó desde las 72 h en T1 y en T2 aumentó a

carbohidratos (Reynolds *et al.*, 1993). The pH in open systems, such as the rumen, may be less than 6.0 due to lactic acid accumulation. This occurs when the diet is rich in carbohydrates (which are easily fermented) or fiber deficient (Owens, 1998). Nevertheless in *in vitro* studies, which are closed systems, the accumulation of organic acids in the media affects the pH because there is no flow to another system, which could cause the lower than 6 pH value obtained in our study. Martínez *et al.* (2006) point out that the starch content in *J. curcas* defatted pulp is 112 g kg⁻¹ DM, which is low compared to the content in corn. Thereon, Alfaro *et al.* (2009) report that starch content of 16 yellow corn hybrids ranges between 650 and 756 g kg⁻¹ DM (711 g kg⁻¹ mean DM).

Total bacterial count

The initial count of inoculated bacteria (FRF and RBUpj) to the medium was of 10⁴ mL⁻¹ of culture medium, which was obtained in the test to measure the DMivD of the pulp. The account of total bacteria at 24 h and 48 h was higher ($p \leq 0.05$) in T1 than in T2, but was higher at 96 h ($p \leq 0.05$) in T2 (4.06) (Table 2). The total bacterial count did not increase during the incubation period, and was lower than that reported in the rumen (10¹⁰ to 10¹² bacteria mL⁻¹) by Dehority (2003). The lower than 6.0 pH value in both treatments may affect growth, since in *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* reduce their growing rate when their media pH is lower than 6.2 (Reynolds *et al.*, 1993; Dehority, 2003).

Although hetero-fermentation of the FRF and RBUpj bacteria was observed, the exponential growth was 3 to 3.5 h⁻¹. This is slow when compared to 1.5 h⁻¹ obtained by Kunene *et al.* (2000) and Ley de Coss *et al.* (2013). They used a medium based on D-(+)-glucose and similar crop conditions; in addition, generation rate was 1.36 and 1.09 h with FRF and RBUpj, respectively. This is also slow compared to rumen bacteria, whose generation rate is between 15 and 30 min. The exponential growth and the generation rate could have been affected by the lower than 6 pH and the low initial concentration of bacteria in the inoculum (10⁴). The population of bacteria decreased from 72 h at T1 and increased in T2 at 96 h, indicating that the RBUpj consortium adapted better to the environment.

Cuadro 2. Concentración de bacterias totales ($\times 10^4$) en las fermentaciones *in vitro* de la materia seca de la pasta de *Jatropha curcas*.**Table 2. Total bacteria concentration ($\times 10^4$) in *in vitro* fermentation of dry matter of *Jatropha curcas* pulp.**

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)						
	3	6	12	24	48	72	96
T1	5.00	8.33	5.60	6.20a	4.66a	2.20	1.60b
T2	5.20	9.86	3.40	3.60b	3.00b	3.53	4.06a
EEM	1.92	4.97	2.20	4.8	8.6	1.04	9.86

T1: inóculo de LRF; T2: inóculo de BRUpj. a b Promedios con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media ♦ T1: inoculum of FRF; T2: RBUpj inoculum. a b Means with different letter in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean.

las 96 h; esto indica que el consorcio de BRUpj se adaptó mejor al medio.

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de ácido propiónico, butírico y AGV totales no fue diferente ($p > 0.05$) en las horas de muestreo (Cuadro 3). La concentración de ácido acético fue mayor ($p \leq 0.05$) en T1 a las 3, 6 y 12 h de incubación. La proporción normal de AGV producidos en el rumen con dietas óptimas que contienen menos de 40 % de carbohidratos solubles es: 60 a 65 % acético, 25 % propiónico, y 10 a 15 % butírico (Cobos, 2007). La proporción de AGV calculada en nuestro estudio indica que la concentración de ácido acético fue menor al valor normal, y la proporción de propiónico y butírico es similar a la del rumen en condiciones normales de alimentación (Dehority, 2003). Esto indica que en ambos tratamientos hubo actividad heterofermentativa.

Concentración de nitrógeno amoniacal

La concentración de NH_4 de las fermentaciones *in vitro* fue mayor ($p \leq 0.05$) en T2, en todos los tiempos de incubación (Cuadro 4). Esto indica que el consorcio de bacterias desarrollado en el medio selectivo con pasta de *J. curcas*, se adaptó mejor a sus condiciones y mostró actividad proteolítica mayor por el sinergismo que pudiera existir. En algunos casos hasta 90 % de la variación en la actividad proteolítica entre cepas se asoció con el sustrato disponible (Cotta

Volatile fatty acids concentration (VFA)

The concentration of propionic acid, butyric acid and total VFA had no difference ($p > 0.05$) during the sampling hours (Table 3). The acetic acid concentration was higher ($p \leq 0.05$) in T1 at 3, 6 and 12 h of incubation. The normal VFA proportion produced in the rumen with optimal diets that contain less than 40 % soluble carbohydrates is: 60 to 65 % acetic, 25 % propionic and 10 to 15 % butyric (Cobos, 2007). The proportion of VFA calculated in our research indicate that the acetic acid concentration was lower than the normal value, and the proportion of propionic acid and butyric acid is similar to that of a rumen under normal feeding conditions (Dehority, 2003). This indicates that in both treatments there was heterofermentative activity.

Ammonium nitrogen concentration

The concentration of NH_4 in *in vitro* fermentations was higher ($p \leq 0.05$) in T2 at all incubation periods (Table 4). This indicates that the bacteria consortium developed in the selective medium with *J. curcas* pulp was better adapted to the conditions and showed higher proteolytic activity given by the synergy that may exist. In some cases up to 90 % of the variation in the proteolytic activity between strains was associated with the available substrate (Cotta and Hespell, 1986); besides, cooperation between species has shown more activity. Wallace (1985) observed that

Cuadro 3. Concentración ácidos grasos volátiles (mMol L⁻¹) en las fermentaciones *in vitro* de la materia seca de la pasta de *Jatropha curcas*.**Table 3. Volatile fatty acids concentration (mMol L⁻¹) in the *in vitro* fermentations of the dry matter of *Jatropha curcas*'s pulp.**

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)						
	3	6	12	24	48	72	96
Acético							
T1	52.91a	55.30a	57.80a	55.42	57.92	60.54	58.07
T2	48.37b	48.40b	48.43b	48.46	43.13	45.62	45.65
EEM	2.33	2.47	2.61	40.85	78.95	112.26	91.00
Propiónico							
T1	22.38	22.40	22.40	22.88	21.35	21.36	21.37
T2	27.24	31.72	31.66	31.74	31.75	28.20	28.21
EEM	19.58	31.67	31.66	29.63	31.51	48.23	48.25
Butírico							
T1	9.99	10.02	10.04	10.21	10.34	9.73	9.74
T2	10.67	10.63	10.47	10.53	10.57	10.63	10.68
EEM	0.09	1.03	1.29	1.44	1.91	1.62	1.64
AGV total							
T1	85.30	87.71	90.25	88.51	89.50	91.73	89.30
T2	86.18	90.75	90.97	90.73	85.46	84.46	84.55
EEM	34.22	42.85	43.99	67.90	70.03	31.22	16.76

T1: inóculo de líquido ruminal fresco; T2: inóculo de bacterias ruminales utilizadoras de pasta de *J. curcas*. a b Promedios con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media ♦ T1: fresh ruminal inoculum fluid; T2: inoculum of rumen bacteria utilizing *J. curcas* pulp. a b Means with different letter in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean.

y Hespell, 1986); además, la cooperación entre especies ha mostrado actividad mayor. Wallace (1985) observó que *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium* y *Streptococcus bovis* crecieron mejor en pares cuando el medio de cultivo tenía caseína como única fuente de nitrógeno; esta respuesta indicó que bacterias con actividad proteolítica pueden cooperar a su incremento. Según Dehority (2003), las especies bacterianas ruminales con actividad proteolítica mayor son *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *S. ruminantium*, *B. fibrisolvens* y *S. bovis*; donde los productos primarios son aminoácidos y péptidos, y *P. ruminicola* es la productora mayor de NH₃.

CONCLUSIONES

Las bacterias en el líquido ruminal fresco crecen y mantienen actividad fermentativa en sustrato de pasta de *J. curcas* sin detoxificar. Las bacterias del

Butyrivibrio fibrisolvens, *Selenomonas ruminantium* and *Streptococcus bovis* grew better in pairs when the culture medium had casein as the sole nitrogen source. This response indicated that bacteria with proteolytic activity can cooperate to its increase. According to Dehority (2003), the rumen bacterial species with greater proteolytic activity are: *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *S. ruminantium*, *B. fibrisolvens* and *S. bovis*; where the primary products are amino acids and peptides, and *P. ruminicola* is the greatest producer of NH₃.

CONCLUSIONS

Bacteria present in fresh ruminal fluid grow and maintain fermentative activity in a substrate containing *J. curcas* pulp without detoxification. Rumen bacteria retain their metabolic activity in a medium with *J. curcas* as substrate.

Cuadro 4. Concentración ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) de nitrógeno amoniacal (NH_4) en las fermentaciones *in vitro* de la materia seca de la pasta de *Jatropha curcas*.
Table 4. Concentration ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) of ammonium nitrogen (NH_4) on *in vitro* fermentations of dry matter of *Jatropha curcas* pulp.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)						
	3	6	12	24	48	72	96
1	48.84b	53.23b	73.28b	73.32b	72.42b	65.55b	66.59b
2	82.67a	87.68a	127.03a	127.04a	127.05a	111.03a	107.03a
EEM	127.89	41.73	158.27	158.31	147.70	474.16	152.03

T1: inóculo de líquido ruminal fresco; T2: inóculo de bacterias ruminales utilizadoras de pasta de *J. curcas*. a b Promedios con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). EEM: error estándar de la media ♦ T1: fresh ruminal inoculum fluid; T2: inoculum of rumen bacteria utilizing *J. curcas* pulp. a b Means with different letter in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$); EEM: standard error of the mean.

rumen mantienen su actividad metabólica en un medio con *J. curcas* como sustrato.

Estudios *in vitro* para evaluar la degradación de los ésteres de forbol en la pasta de *J. curcas* sin detoxificar deben realizarse por su potencial como fuente de proteína en dietas para rumiantes.

In vitro studies to evaluate the degradation of phorbol esters in *J. curcas* pulp without detoxification should be conducted given its potential use as a protein source for ruminants.

—End of the english version—

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto intitulado “Estimación e impacto ambiental de la captura de carbono en plantaciones de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en el Estado de Chiapas” donde se apoyó el desarrollo de este trabajo de investigación que se encuentra dentro de los lineamientos de Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales (CONACYT/PDCPN2013-01/216526).

LITERATURA CITADA

- Alfaro, Y., V. Segovia, P. Monasterio, y R. Silva. 2009. Evaluación del rendimiento, sus componentes y la calidad del grano en híbridos simples de maíz amarillo. UDO Agrícola. 9: 728-742.
- Cobos, M. A., A. Ley de Coss, N. D. Ramírez, S. S. González, and R. Ferrera-Cerrato. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. Res. Vet. Sci. 90: 26-30.
- Cobos, M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato R., y A. Alarcón (eds). Microbiología Agrícola. Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico y Planta-Microorganismo. Ed. Trillas, México D.F. pp: 498-516.
- Cobos, M. A., and M. I. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* variedad *Ruminantium*: colonization *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds). Rumen Ecology Research Planning. Ed. The International Livestock Research Institute. Addis Abeba. pp: 151-161.
- Cotta, M. A., and R. B. Hespell. 1986. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. Appl. Environ. Microbiol. 52: 51-58.
- De Barros, C. R. M., L. M. M. Ferreira, F. M. Nunes, R. M. F. Bezerra, A. A. Dias, C. V. Guedes, J. W. Cone, G. S. M. Marques, and M. A. M. Rodrigues. 2011. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. Eng. Life Sci. 11: 107-110.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Rumen Bacteria – History, Methods of *in vitro* Cultivation and Discussion of mixed culture fermentation. Nottingham University Press. pp: 157-176.
- Dias, M. N., J. M. Rodriguez, S. P. Albino, D. T. Pereira, and M. C. K. Megumi. 2014. *Jatropha* seed cake supplementation for improved fungal growth and later use as animal feed. Afr. J. Microbiol. Res. 8: 3457-3462.
- Hazlewood, G. P., and R. M. Teather. 1988. The genetics of rumen bacteria. In: Hobson, P. N. (eds). The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science. UK. pp: 323-34.

- Häubi, S. C. U. 2004. Teoría Ácido Básico de Stewart: Aplicaciones Prácticas de una Nueva Teoría de la Regulación del pH en los Sistemas Biológicos. Ed. Cigome. México. pp: 14-19.
- Kasuya, M. M. C., L. J. M. Rodríguez, P. L. P. Silva, S. J. Soares, M. H. Cuquetto, and R. M. Teixeira. 2013. Bio-detoxification of *Jatropha* seed cake and its use in animal feed. In: Biodiesel-feedstocks, production and applications. INTECH (Eds). 11: 309-330.
- Krause, D. O., and J. S. Russell, 1996. How many ruminal bacteria are there? J. Dairy Sci. 79: 1467-1475.
- Kunene, N. F., I. Geornaras, A. von Holy, and J. W. Hasting. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1084-1092.
- Ley de Coss, A., M. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, y E. Guerra-Medina. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y valuación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. Rev. Científ. FCV-LUZ. XXI: 43-49.
- Ley de Coss, A., C. Arce-Espino, M. Cobos-Peralta, D. Hernández-Sánchez, y R. Pinto-Ruiz. 2013. Estudio comparativo entre la cepa de *Pediococcus acidilactici* aislada del rumen de borregos y un consorcio de bacteria ruminales. Agrociencia 47: 567-578.
- Liberalino, A. A. A., E. A. Bambirra, T. Morales-Santos, and E. C. Viera. 1988. *Jatropha curcas* L. seeds chemical analysis and toxicity. Arq. Biol. Tecnol. 31: 539-550.
- Macedo, A. L., R. S. Santos, L. Pantoja, and A. S. Santos. 2011. Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. Braz. J. Chem. Eng. 28: 9-15.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, y D. P. Clark. 2009. Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano. In: Brock, Biología de los Microorganismos. 10a Edición. Ed. Pearson, Prentice Hall, España. pp: 109-148.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. Clinica Chimica Acta 17: 297-304.
- Martínez, H. J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila, and K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. Food Chem. 96: 80-89.
- Najjar, A., N. Abdullah, W. Z. Saad, S. Ahmad, E. Oskoueian, and Y. Gherbawy. 2014. Removal of phorbol esters present in *Jatropha curcas* kernel by fungal isolates. Int. J. Agric. Biol., 16: 871-878.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. J. Anim. Sci. 76: 275-286.
- Reynolds, W. K., C. M. Hunt, T. Moen, and J. A. Loesche. 1993. Comparison of corn and barley with and without ruminal buffer in supplements fed in wheat straw based diets to beef steers. J. Anim. Sci. 71: 1326-1334.
- Runumi, G., K. N. Uptal, and K. T. Ajay. 2015. Methods of detoxification of *Jatropha curcas* L. seed cake for it use as protein supplement in animal feed. An overview. Indian J. Nat. Prod. Resour. 6: 176-182.
- Saetae, D., and W. Suntornsuk. 2010. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. J. Microbiol. 20: 319-324.
- Saetae, D., and W. Suntornsuk. 2011. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. Int. J. Mol. Sci. 12: 66-77.
- SAS Institute, Inc. 2009. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. On line: <http://support.sas.com/documentation/onlinedoc> (Consulta: Julio 2015).
- Scandolo, D., M. Noro, H. Böhmwald, P. A. Contreras, and F. Wittwer. 2007. Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. Arch. Med. Vet. 39: 141-146.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Ithaca, NY. USA. Cornell University Press. 463 p.
- Wallace, R. J. 1985. Synergism between different species of proteolytic rumen bacteria. Current Microbiol. 12: 59-64.