

# **UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

## **División de Ciencia Animal Departamento de Producción Animal**



**Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV's) *in vitro* en un sustrato (alfalfa-maíz) con la utilización de biopelícula de microorganismos ruminales.**

**Por:**

**ANTONIO DE JESUS HIDALGO MAZA.**

**TESIS**

**Presentando como Requisito Parcial para Obtener el Título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

**Diciembre del 2012**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**  
**“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL**

**Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV's) *in vitro* en un sustrato (alfalfa-  
maíz) con la utilización de biopelícula de microorganismos ruminales.**

**Presentada por:**

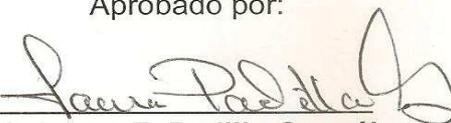
**ANTONIO DE JESUS HIDALGO MAZA**

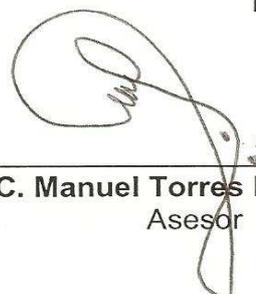
**TESIS**

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito  
Parcial para Obtener el Título de:

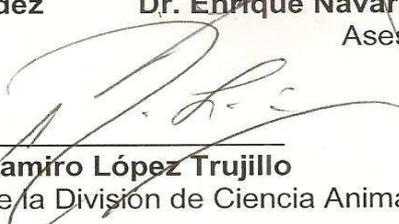
**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

Aprobado por:

  
M.C. Laura E. Padilla González  
Asesor Principal

  
M.C. Manuel Torres Hernández  
Asesor

  
Dr. Enrique Navarro Guerrero  
Asesor

  
Dr. Ramiro López Trujillo  
Coordinador de la División de Ciencia Animal

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO**

**DICIEMBRE DEL 2012**



**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**

**“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL**

**Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV's) *in vitro* en un sustrato (alfalfa-  
maíz) con la utilización de biopelícula de microorganismos ruminales.**

**Presentada por:**

**ANTONIO DE JESUS HIDALGO MAZA**

**TESIS**

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito  
Parcial para Obtener el Título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

Aprobado por:

---

**M.C. Laura E. Padilla González**  
Asesor Principal

---

**M.C. Manuel Torres Hernández**  
Asesor

---

**Dr. Enrique Navarro Guerrero**  
Asesor

---

**Dr. Ramiro López Trujillo**  
Coordinador de la División de Ciencia Animal

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO**

**DICIEMBRE DEL 2012**

## AGRADECIMIENTO

### *A DIOS.*

Por haberme dado la vida, salud y conocimiento para lograr la meta planeada. Gracias por todo lo bueno y malo por que hasta de las caídas he podido aprender, confiando en que todo se solucionara confiando en ti, por las alegrías y por el dolor por lo que fue posible y por lo que no. Te ofrezco todo lo que hice, las cosas que pasaron por mis manos y lo que con ellas pude construir.

### *A MI ALMA TERRA MATER*

Por la oportunidad que me dio para seguir preparándome como persona y profesional e inculcarme valores para desarrollarme en el campo mexicano.

### *A MIS ASESORES*

MC. LAURA E. PADILLA GONZÁLEZ. Gracias por la confianza y la amistad brindada en el desarrollo de este trabajo, y por alguna que otra platica fuera del trabajo para reforzar la confianza en mí.

MC. MANUEL TORRES HERNÁNDEZ. Gracias por la atención brindada en la revisión del trabajo y por las correcciones hechas.

DR. ENRIQUE NAVARRO GUERRRO. Gracias doctor por la confianza y por su amistad desinteresada en todos estos años de conocernos, gracias por los buenos consejos para seguir adelante y dar todo de mi, se lo agradeceré siempre.

A todos mis profesores quienes fueron parte principal de mi formación académica a todos ellos gracias.

Al laboratorista Carlos Arévalo Sanmiguel por su apoyo en la explicación del uso del cromatografo de gases.

### *MIS AMIGOS*

Hugo, Norbert, Tino, Luis, Abdiel, Yesenia, Rey David, Isaac, Guadalupe, Gaby, Alonso, gracias por su amistad y por todo lo vivido.

## **DEDICATORIA**

Va dirigida a los seres más queridos como muestra de amor, respeto y gratitud.

### ***A MIS PADRES***

**ROMEO HIDALGO ARENAS.**

**MAGNOLIA MAZA SARMIENTO.**

Por darme su amor y comprensión, sobre todo por darme su confianza a pesar de las adversidades que en algún momento hemos vivido siempre han estado presentes ahí para mí. Gracias por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, gracias por los ejemplos de perseverancia y constancia ante las adversidades, lo que me ha infundado siempre el valor para nunca darme por vencido. A ti mamá gracias por ser única, por darme la vida sin nada a cambio, hoy quisiera darte el fruto de tu trabajo por haberme dado lo mejor de tu existencia. A ti papá hoy sólo quiero decirte que eres el ser que más respeto, quiero y admiro. Gracias por haberme educado, estoy orgulloso de ser como soy y eso se los debo a ustedes.

### ***A MI HERMANA***

**CRUZ LORENA HIDALGO MAZA.**

Con respeto y admiración por su gran apoyo, cariño y comprensión brindada en los momentos más difíciles. Por ser el ejemplo de una hermana mayor de la cual he aprendido que los momentos difíciles no son para siempre y que puedes volver a levantarte, de los aciertos y desaciertos de la vida, gracias por todo. Te quiero hermanita, siempre contarás conmigo.

A toda mi familia que de alguna u otra manera contribuyeron en mi carrera profesional, gracias por todo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO.

|   | PÁG. |
|---|------|
| AGRADECIMIENTO.....   | i    |
| DEDICATORIA.....  | ii   |
| INDICE DE CONTENIDO.....  | iii  |
| INDICE DE CUADROS.....  | vii  |
| INDICE DE GRAFICAS.....   | viii |
| RESUMEN.....  | x    |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| 1.1 OBJETIVO .....  | 3    |
| 1.2 HIPOTESIS .....   | 3    |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA.....                                 | 4    |
| 2.1 Rumiantes .....   | 4    |
| 2.1.1 Características de los rumiantes .....                    | 4    |
| 2.1.2 El rumen .....  | 5    |
| 2.1.3 Medio ambiente ruminal.....                               | 7    |
| 2.1.4 Fisiología y metabolismo bacteriano.....                  | 8    |
| 2.1.5 Microbiología del rumen .....                             | 8    |
| 2.1.5.1 Poblaciones ruminales.....                              | 9    |
| 2.1.6 Microorganismos celulolíticos predominantes en el rumen . | 10   |
| 2.1.6.1 Fibrobacter succinogenes .....                          | 10   |
| 2.1.6.2 Butyrivibrio Fibrosolvens .....                         | 11   |
| 2.1.6.3 Ruminococcus flavefaciens .....                         | 11   |
| 2.1.7 Microorganismos amilolíticos predominantes en el rumen .. | 12   |
| 2.1.7.1 Ruminobacter amylophilus.....                           | 12   |
| 2.1.7.2 Succinomonas amylofítica .....                          | 12   |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.7.3 Streptococcus bovis .....   | 12 |
| 2.1.8 Secreciones digestivas en los rumiantes.....                        | 13 |
| 2.1.9 Fisiología de la digestión.....                                     | 16 |
| 2.2 Carbohidratos .....   | 18 |
| 2.2.1 Carbohidratos no fibrosos.....                                      | 20 |
| 2.2.2 Carbohidratos fibrosos .....  | 21 |
| 2.2.3 Digestión de carbohidratos .....                                    | 22 |
| 2.2.4 Degradación de carbohidratos.....                                   | 24 |
| 2.2.5 Metabolismo de los carbohidratos .....                              | 24 |
| 2.3 Proteínas .....   | 25 |
| 2.3.1 Degradación de proteínas.....                                       | 27 |
| 2.3.2 Síntesis de proteína microbiana .....                               | 27 |
| 2.4 Fermentación ruminal .....  | 28 |
| 2.5 Ácidos grasos volátiles (AGV's) .....                                 | 29 |
| 2.5.1 Productos que dan origen a los ácidos grasos volátiles.....         | 29 |
| 2.5.2 Producción de ácido acético .....                                   | 30 |
| 2.5.3 Producción de ácido propiónico .....                                | 31 |
| 2.5.4 Producción de ácido butírico .....                                  | 32 |
| 2.5.5 Absorción de ácidos grasos volátiles .....                          | 32 |
| 2.5.6 Factores que afectan la producción de ácidos grasos volátiles ..... | 34 |
| 2.5.7 Rutas metabólicas.....  | 35 |
| 2.6 Biopelícula o biofilm .....   | 36 |
| 2.6.1 Fase de desarrollo de las biopelículas .....                        | 37 |
| 2.6.2 Heterogeneidad de las biopelículas.....                             | 39 |
| 2.7 Opuntia imbricata .....   | 40 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.7.1 Descripción .....   | 40        |
| 2.7.2 Manejo .....  | 41        |
| 2.7.3 Distribución de la especie forrajera.....   | 41        |
| <b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>   | <b>42</b> |
| 3.1 Descripción del área de estudio.....  | 42        |
| 3.2 Materiales .....  | 42        |
| 3.2.1 Equipo .....  | 42        |
| 3.2.2 Material químico y biológico .....  | 42        |
| 3.3 Metodología .....   | 43        |
| 3.3.1 Preparación de los reactores .....  | 43        |
| 3.3.2 Obtención del liquido ruminal .....   | 44        |
| 3.3.3 Preparación de la saliva artificial .....   | 44        |
| 3.3.4 Preparación de la mezcla de saliva artificial y liquido ruminal .....                     | 44        |
| 3.3.5 Preparación del Coyoxtle .....  | 45        |
| 3.3.6 Formación de la biopelícula en trozos de coyoxtle.....                                    | 45        |
| 3.3.7 Desarrollo de la cinética .....   | 46        |
| 3.3.7.1 Preparación de los reactores .....  | 46        |
| 3.3.7.2 Tiempos de muestreo para determinación de metano y ácidos grasos volátiles (AGV´s)..... | 46        |
| 3.3.7.3 Extracción de muestras para evaluación de metano y ácidos grasos volátiles(AGV´s).....  | 46        |
| 3.3.7.4 Determinación de metano.....  | 47        |
| 3.3.7.5 Determinacion de ácidos grasos volátiles .....  | 47        |
| 3.3.7.6 Variables a evaluar .....   | 48        |
| 3.4 Diseño estadístico.....   | 48        |
| <b>IV RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>  | <b>49</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1 Ácido acético .....</b>                    | <b>49</b> |
| <b>4.2 Ácido propionico .....</b>                 | <b>50</b> |
| <b>4.3 Ácido butírico .....</b>                   | <b>52</b> |
| <b>4.4 Metano .....</b>                           | <b>53</b> |
| <b>4.5 Total de ácidos grasos volátiles .....</b> | <b>55</b> |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>                      | <b>56</b> |
| <b>VI. LITERATURA CITADA.....</b>                 | <b>57</b> |
| <b>VII. APENDICE.....</b>                         | <b>63</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS

PÁG.

Cuadro 1. Clasificación de los carbohidratos..... 22

Cuadro 2. Distribución de los reactores de prueba..... 43

## ÍNDICE DE FIGURAS

PÁG.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1. Representación esquemática de los órganos que forman el estomago del rumiante .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Figura 2. Metabolismo de los carbohidratos en el rumen. ....</b>                                    | <b>20</b> |
| <b>Figura 3. Digestión de las proteínas en el rumiante.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>Figura 4. Participación de los microorganismos en la producción de ácidos grasos volátiles.....</b> | <b>31</b> |
| <b>Figura 5. Eventos en el desarrollo de una biopelícula.....</b>                                      | <b>39</b> |
| <b>Figura 6. Opuntia imbricata .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>Figura 7. Formación de la biopelícula en el soporte .....</b>                                       | <b>45</b> |
| <b>Figura 8. Producción de ácido acético .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>Figura 9. Producción de ácido propiónico.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>Figura 10. Producción de ácido butírico .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>Figura 11. Producción de metano .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>Figura 12. Producción total de ácidos grasos volátiles.....</b>                                     | <b>55</b> |

|  | Pag.      |
|--|-----------|
| <b>VII. APENDICE.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>Cuadro 1A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los factores A y B para la variable ácido acético .....</b>                    | <b>63</b> |
| <b>Cuadro 2A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los factores A y B para la variable ácido propionico.....</b>                  | <b>64</b> |
| <b>Cuadro 3A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los factores A y B para la variable ácido butírico .....</b>                   | <b>65</b> |
| <b>Cuadro 4A. Análisis de varianza para la variable metano a 24 y 27 horas.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>Cuadro 5A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los factores A y B para la variable total de ácidos grasos volátiles .....</b> | <b>67</b> |

## RESUMEN

La presente investigación fue realizada en el laboratorio de Producción Animal perteneciente al Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”; así como también en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue la determinación de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) *in Vitro* empleando biopelícula de microorganismos ruminales en un soporte de *opuntia imbricata*.

Las Variables a evaluar fueron las siguientes: Cinética de producción de metano (0, 24, 48 y 72 horas), Cinética de producción de agv's (0, 24, 48, 72 y 96 horas) donde se determinó la producción de ácido acético, ácido propionico y ácido butírico

**Ácido acético:** Es altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ). Sobresalen para esta variable las combinaciones de tratamiento Coyonoxtle entero y Coyonoxtle en trozos con y sin biopelícula, destacándose en estos el Coyonoxtle entero sin biopelícula que tiene una respuesta superior a las 96 horas de exposición.

**Ácido propionico:** Los niveles del factor A fueron no significativos, mientras que la respuesta de los niveles del factor B así como la interacción AB fueron altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ). Por otro lado, es importante resaltar que las mejores combinaciones de tratamiento lo fueron Coyonoxtle entero sin biopelícula y Coyonoxtle en trozos con biopelícula, además que las máximas respuestas se observaron a las 72 horas.

**Ácido butírico:** Otro de los ácidos importantes que proveen de energía para el buen funcionamiento del rumen, ambos factores A y B hubo una falta de

significancia, sin embargo si la hay para la interacción de los factores AB ( $P \leq 0.05$ ). Teniendo respuesta similar a las combinaciones de tratamiento de los ácidos grasos volátiles (agv's) anteriores.

**METANO:** Uno de los productos terminales de la fermentación y que además es nocivo para el buen funcionamiento del rumen (Owens y Goetsch, 1986), lo es el metano esta variable muestra una alta significancia ( $P \leq 0.01$ ) tanto a las 24 horas como a las 72 horas. Las combinaciones de tratamiento que mostraron las mas bajas concentraciones de metano, lo fueron Coyonoxtle en trozos y Coyonoxtle entero ambos sin biopelícula.

**TOTAL DE ACIDOS GRASOS VOLATILES EN DIETA:** La respuesta al total de los ácidos grasos volátiles (agv's) fue muy similar a las combinaciones de tratamiento de los tres ácidos anteriores (acético, propionico y butírico). Indicando de nuevo que la mayor producción de ácidos grasos volátiles es mayor en los casos donde no fue formada la biopelícula de microorganismos; lo cual refleja que es probable que se requiera de un mayor tiempo de formación de la biopelícula de microorganismos ruminales.

**Palabras claves:** Biopelícula ruminal, ácidos grasos volátiles, rumiantes.

## **I.INTRODUCCION.**

El ganado bovino es de especial importancia gracias a su capacidad de transformar pastos de baja calidad ricos en paredes vegetales y no aprovechables para el hombre ni otros animales no rumiantes, en proteína de alta calidad. Los rumiantes han adaptado su tracto gastro-intestinal para poder degradar el alimento que digieren a través de una simbiosis con poblaciones microbianas y aprovechar al máximo los productos de fermentación formados (Van Soest, 1982).

El rumen provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microorganismos. La ausencia de aire en el rumen favorece el crecimiento de especies especiales de bacterias, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (Cuauhtémoc y Díaz, 2001).

Estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas para su crecimiento y el rumiante depende de los productos de fermentación anaeróbica del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yokohama y Johnson, 1988). El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como son los ácidos grasos volátiles (AGV), sin embargo, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, como puede ser el metano o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos (Owens y Goetsch, 1986).

Así el rumiante aprovecha los productos finales de la fermentación, particularmente los ácidos grasos volátiles (AGV). Además se producen algunos productos adicionales como el ácido láctico, el bióxido de carbono y el metano y los nutrientes contenidos en los cuerpos celulares de los microorganismos, que son aprovechados al digerirse en el abomaso e intestino delgado (Owens y Goetsch, 1986).

El objetivo de formular una dieta balanceada es generar un ambiente ruminal que maximice la síntesis microbiana y cubra las necesidades del animal. La flora microbiana consiste de bacterias, protozoos y hongos que pueden clasificarse de diferentes formas (George y Diamond, 2006).

Así el 25 % de las bacterias se encuentran en la fase líquida del rumen, el 70% adherida a las partículas en suspensión y un 5% adherida a los protozoos o a la pared ruminal. Para que la concentración bacteriana se mantenga es necesario que su tiempo de generación sea menor al tiempo de la ingesta. Dado que la tasa de pasaje de las partículas es menor al del líquido ruminal, las bacterias de menor crecimiento suelen adherirse a dichas partículas (George y Diamond, 2006).

En la naturaleza la mayoría de los microorganismos permanecen en grupos formados por agrupaciones, que se adhieren a una superficie. La mayoría de las bacterias pasan su vida en una biopelícula. Como miembros de un biofilm pueden estar los microorganismos metanogénicos (archaea) que utilizan los ácidos orgánicos para producir metano (Balaban et al., 2008).

La formación de una biopelícula favorece las interacciones sinérgicas entre los microorganismos lo cual se traduciría en una mayor producción de AGV, lo que indica que un sistema de biopelícula puede aportar un mayor aprovechamiento de los forrajes consumidos por el rumiante (Padilla y Rodríguez, 2007).

## **1.1 Objetivo**

Determinación de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) *in Vitro* empleando biopelícula de microorganismos ruminales en un soporte de *opuntia imbricata*.

## **1.2 HIPOTESIS.**

### **Hipótesis nula (Ho):**

Empleando una biopelícula de microorganismos ruminales no incrementará la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's)

### **Hipótesis alternativa (Ha):**

Empleando una biopelícula de microorganismos ruminales se incrementará la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's)

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **2.1 RUMIANTES.**

Un rumiante es un animal con un estómago que tiene compartimientos múltiples, lo que le permite extraer la nutrición de los pastos, heno, y otros alimentos ricos en celulosa que en otros animales por lo regular les resultaría indigesto. Otra característica de los rumiantes es que en parte regurgitan la comida para ayudar al proceso digestivo, la cual fue demolida parcialmente para su posterior digestión a lo cual se conoce como bolo alimenticio (*Hardy, 2011*).

Los animales evolucionaron para la vida en las praderas, para comer grandes cantidades de pasto en un momento y luego digerirlos. En esencia, un rumiante tiene una despensa de almacenamiento de alimentos mezclados con bacterias que ayudan a descomponerlos de manera que puedan ser digeridos por los animales (*Hardy, 2011*).

#### **2.1.1 Características de los rumiantes.**

Los rumiantes son capaces de aprovechar los alimentos ricos en fibras (celulosa) mediante la acción de la microflora y macrofauna existente en su pre-estómago, absorbiendo como productos finales ácidos grasos volátiles y proteína microbiana de calidad superior a la vegeta (*Dukes, 1955*). En principio el rumiante alimenta a los microorganismos y estos, a su vez, nutren al rumiante. Los pre-estómagos (rumen, redecilla y librillo) se desarrollan a partir del estómago embrionario, que pierde en el transcurso de su desarrollo, adquiriendo un tipo de epitelio escamoso. En el animal adulto las capacidades relativas de cada compartimiento son: rumen 80%, retículo 5%, omaso 7% y abomaso 8%. La función principal de los pre-estómagos será demorar los alimentos fibrosos a los efectos de humectación y fermentación, las ingestas que escapen a esta acción se degradarán en ciego y colon (*Castle y Watkins, 1988*).

La distinta constitución del aparato digestivo hace que los rumiantes presenten algunas diferencias básicas favorables, que son: Mayor capacidad, que le permite utilizar enormes cantidades de alimento basto (forraje), en comparación de los monogástricos. Adaptación del aparato digestivo para digerir esos alimentos bastos antes de que entren en el intestino delgado. Sistema digestivo más eficiente para usar la fibra de los alimentos. Son rumiantes los bovinos, ovinos y caprinos. Realizan la rumia y la eructación como mecanismos para favorecer la digestión y eliminar el exceso de gases, respectivamente (Dukes, 1955).

### 2.1.2. El rumen.

El estómago de los rumiantes consta de cuatro compartimientos: el rumen, el retículo, el omaso y el abomaso (Fig. 1). Estos compartimientos se desarrollan desde el estómago embrionario y son relativamente pequeños en el animal recién nacido, donde el rumen y el retículo juntos apenas son la mitad del abomaso o estómago verdadero.

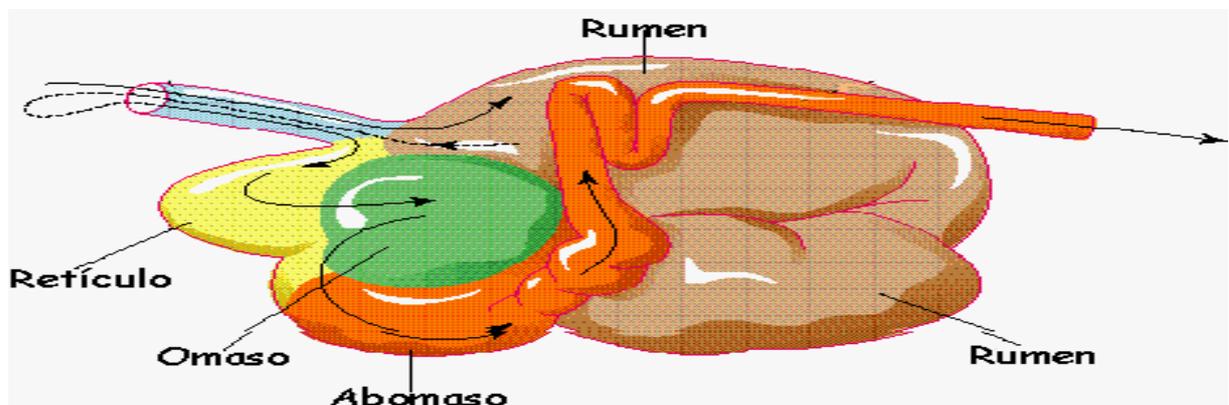


Figura 1. Representación esquemática de los órganos que forman el estómago del rumiante: rumen, retículo, omaso y abomaso. (Scientific American, 1958, citado por Anison y Lewis, 1996).

El crecimiento considerable del rumen se realiza durante los primeros meses de vida, pero el estímulo principal de desarrollo es la ingestión de sólidos. Cuando los cuatro compartimientos han alcanzado sus tamaños relativamente permanentes,

lo que ocurre después de un año, el rumen representa 80% del volumen total del estómago. La capacidad del rumen en los adultos varía mucho con la edad y el tamaño del animal, pero generalmente oscila entre cuatro y diez litros en ovejas y de ciento a trescientos litros en los bovinos (Anison y Lewis, 1996).

El rumen todavía no es funcional en los animales recién nacidos, pero la fermentación ruminal empieza en unas cuantas semanas. En este período, en que el animal no está destetado, su principal alimento es la leche, que se absorbe rápidamente, sin pre digestión, en el rumen (Dukes, 1955).

El rumen puede ser considerado como una gran cámara de fermentación que proporciona el medio conveniente para el cultivo continuo de la población microbiana (Denton, 1957).

La constancia de las condiciones en el rumen se logra como sigue:

- a) La toma frecuente de alimentos por el animal proporciona un suplemento regular de sustrato para los microorganismos.
- b) Los productos solubles de la actividad microbiana son absorbidos rápidamente por la pared ruminal y por lo tanto no se acumula ni llega a inhibir la acción enzimática.
- c) La temperatura del rumen se sostiene de 38° a 42 ° C. por el mecanismo regulador de temperatura del animal.
- d) El volumen del contenido ruminal se regula por el paso de material líquido a intervalos hacia el omaso a través del orificio retículo-omasal. Las pequeñas partículas alimenticias y una porción de la población microbiana se elimina del rumen en esta forma.
- e) Los rumiantes secretan grandes cantidades de saliva que es rica en bicarbonato y otros iones. La saliva es el factor más importante en el mantenimiento del volumen líquido y fija el estado del pH y la composición iónica en el rumen (Dukes, 1955).

Es posible que el rumen evolucione en reacción a la naturaleza fibrosa y voluminosa de la dieta. El desarrollo de este órgano ha dado al animal la capacidad de usar una variedad de microorganismos para convertir los muchos constituyentes refractarios de la dieta que no puede digerir, en formas rápidamente aprovechables. Los detalles de este proceso pueden ser entendidos sólo al examinar la población microbiana en el rumen y el destino en este órgano de la mayoría de los constituyentes de los alimentos. (Annison y Lewis, 1996).

### **2.1.3 Medio ambiente ruminal.**

El rumen ofrece un medio adecuado para el crecimiento bacteriano ya que el pH varía generalmente entre 5.5 y 7.0 y la temperatura de 39<sup>o</sup>-40<sup>o</sup>C., es muy cercana a la óptima para la mayoría de los sistemas enzimáticos (Hungate, 1966).

El alimento llega hasta el rumen en una forma más o menos constante y es mezclado por las contracciones de las paredes ruminales, lo que permite que los microorganismos entren en contacto con los alimentos recién ingeridos o regurgitados y vueltos a masticar y humedecer (Baldwin, 1965).

La reinsalivación de los alimentos durante la rumia, en combinación con el agua que llega al rumen, y las secreciones del mismo, proveen una humedad relativa favorable para muchos microorganismos (Annison, 1965).

Además, los productos finales de las reacciones fermentativas son eliminados del medio, ya sea por absorción de la mucosa del retículo-rumen, o bien por el paso a los siguientes compartimentos, evitando de esta manera la saturación del medio y la consecuente inhibición del crecimiento bacteriano (Meyer et al., 1965).

Por lo tanto, se favorece el crecimiento de la misma llegando a producir una cantidad de protoplasma equivalente al 10% del líquido total del rumen (Reid, 1970).

#### **2.1.4 Fisiología y metabolismo bacteriano**

Las bacterias son seres vivos y están compuestas al igual que las células eucariotas por proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros. Estas moléculas a su vez forman parte de estructuras celulares más complejas, como por ejemplo la pared celular y la membrana citoplasmática (Warner, 1962).

Una característica de los seres vivos es la capacidad para sintetizar sus propios constituyentes a partir de nutrientes que toman del medio externo.

El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Se trata de un proceso complejo, que supone la replicación de todas las estructuras y componentes celulares a partir de los nutrientes exógenos.

El término metabolismo se refiere al conjunto de reacciones químicas que tiene lugar en la célula. El metabolismo tiene lugar a través de secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente (Bryant 1963).

#### **2.1.5. Microbiología del rumen.**

El rumen es, en esencia, un sistema anaerobio muy reductor en un medio ligeramente ácido, pero con pH fijo, a una temperatura de 39°C, y en una fase gaseosa compuesta principalmente de bióxido de carbono, metano y nitrógeno. En este medio se forma una población microbiana muy especializada.

La proliferación continua de los microorganismos está asegurada por la ingestión periódica de alimentos; el sistema también está mantenido por un flujo continuo de saliva, por el paso del contenido a lo largo del tracto digestivo y por la absorción de los productos finales del metabolismo a través de la pared del rumen. El crecimiento y la división de los microorganismos se realiza por la muerte y autólisis de otros, así que están siempre presentes en el rumen algunos vivos, muertos y células dañadas, junto con una variedad de partículas alimenticias digeridas parcialmente (Annison y Lewis, 1996).

### **2.1.5.1. Poblaciones ruminales.**

La población microbiana en el rumen es variable, predominando las bacterias y los protozoarios ciliados. En general, y debido a las condiciones que prevalecen en el rumen, la mayor parte de los microorganismos son anaerobios o anaerobios facultativos.

Algunos de los géneros bacterianos más importantes, por su capacidad para degradar a los principales carbohidratos (glúcidos) de los alimentos son: bacterioides, ruminococos, succinomonas, ciertos clostridios, celobacterias y butirivibrio (Hungate, 1966).

Los protozoarios más comunes en el rumen pertenecen a los géneros: isotriquia, dasitriquia, diplodinio y entodinio. En rumiantes jóvenes también se encuentran protozoarios flagelados, monocercomonas, calimastix, quilomastix, tetratricomonas, etc. (Bryant 1963).

Las bacterias del rumen se han agrupado, según el sustrato que fermentan en forma predominante, de la siguiente manera:

*Bacterias celulolíticas.* Son las que producen celulasas que es una enzima extracelular capaz de hidrolizar los enlaces beta de la celulosa, produciendo celobiosa. Algunas de ellas también aprovechan la celobiosa que a su vez libera glucosa. Este tipo de bacterias se encuentran en concentraciones altas en el rumen de animales alimentados con forrajes que contiene mucha fibra. Muchas de las bacterias de este grupo también degradan el almidón (Hungate, 1966).

*Bacterias hemicelulolíticas.* Son bacterias capaces de degradar a las hemicelulosas, liberando pentosas, hexosas y ácidos urónicos, convirtiéndolos en glucosa o fructosa. Muchas de ellas son capaces además de degradar la celulosa (Bryant, 1963).

*Bacterias amilolíticas.* Estas utilizan los almidones como sustrato, pues poseen una amilasa que hidroliza enlaces alfa 1-4 produciendo maltosa, que por acción de la maltasa se convierte en glucosa (Dehority, 1967).

*Bacterias que utilizan azúcares solubles.* Estas dependen de la actividad de las anteriores, que son las que producen glucosa, xilosa y otros azúcares solubles de las celulosas, almidones, hemicelulosas, etcétera, transformándolas en ácidos grasos volátiles (Hungate, 1966).

*Bacterias proteolíticas.* Producen enzimas hidrolíticas que rompen enlaces peptídicos, liberando péptidos y finalmente ácidos aminados (Bryant, 1953).

*Bacterias lipolíticas.* Poseen esterases que hidrolizan a los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de ácidos grasos (Dehority, 1967).

*Bacterias que utilizan ácidos.* Actúan sobre los productos finales de la actividad de bacterias de los grupos anteriores, utilizando como sustrato diferentes tipos de ácidos, por lo que ayudan a su eliminación del medio (Bryant, 1953).

Además, hay otros tipos de bacterias capaces de producir amoníaco a partir de los ácidos aminados, por mecanismos de desaminación; las metanogénicas que producen metano a partir de hidrógeno y bióxido de carbono y otras que sintetizan vitaminas (Hungate, 1966).

## **2.1.6 MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS PREDOMINANTES EN EL RUMEN.**

### **2.1.6.1. Fibrobacter succinogenes.**

Se considera actualmente como una de las bacterias celulolíticas predominantes en el rumen.

Los ácidos grasos predominantes de *F. succinogenes* son ácidos saturados de cadena lineal. Sus celulasas y su modo de ataque a células de las paredes de las plantas han sido ampliamente investigados. *F. succinogenes* es particularmente

activa en la hidrólisis de celulosas altamente ordenadas, tales como fibras de algodón, numerosos estudios han establecido su capacidad para solubilizar y digerir material vegetal. A pesar de la solubilización extensa de material vegetal, *F. succinogenes* no utiliza pentosas para el crecimiento (Hungate, 1950).

#### **2.1.6.2. *Butyrivibrio fibrosolvens*.**

Estas bacterias se encuentran entre la especie predominante presente y se aislaron a partir de la dilución  $10^8$  del contenido del rumen. Las características de *B. fibrosolvens* pueden variar considerablemente entre los aislamientos, y hay una clara necesidad de una nueva evaluación de la taxonomía del género (Eadie, 1962).

Un estudio de los efectos de los ácidos grasos volátiles en *Butyrivibrio* sugirió la existencia de al menos dos biotipos principales (Warner, 1962). Aparte de las variaciones en los patrones de fermentación, las cepas de *B. fibrosolvens* varían sustancialmente en las propiedades antigénicas y en su contenido de ácidos lipoteicoicos (Eadie, 1962). La gama muy amplia de sustratos fermentados por *B. fibrosolvens* hacen que sea muy común en el rumen, donde se cree que desempeñan un papel en la hidrólisis de la pared celular de las plantas, la hidrogenación de los lípidos, y la proteólisis.

*B. fibrosolvens* se ha demostrado que fermenta celodextrinas, y una gama de despolimerasas polisacáridos y glucósido hidrolasas que han sido detectados en los extractos celulares; *Butyrivibrio fibrosolvens* hidrogena ciertos ácidos grasos insaturados (Russel, 1985).

#### **2.1.6.3. *Ruminococcus flavefaciens*.**

El papel de *R. flavefaciens* se da en la pared celular de las plantas, esto fue establecido en una serie de estudios sobre ruminococci y otras bacterias del rumen, se ha dilucidado aún más por microscopía electrónica de barrido (Baldwin,

1965) demostró que, *R. flavefaciens* coloniza principalmente los bordes cortados de la epidermis, el floema y las células del esclerénquima. La digestión de la epidermis y las células del parénquima en la vaina del haz se llevó a cabo por la adhesión de bacterias. La actividad polisacaridasa ha demostrado estar fuertemente influenciada como sustrato para el crecimiento (Ayers, 1959).

## **2.1.7. ORGANISMOS AMIOLÍTICOS PREDOMINANTES EN EL RUMEN.**

### **2.1.7.1. Ruminobacter amylophilus.**

Ayers (1959) describió esta bacteria gram-negativa amilolítica del rumen del ganado. Aunque no siempre es detectable en el contenido ruminal, en ocasiones *R. amylophilus* se piensa que es el predominante digestor del almidón. Los principales productos de fermentación son acetato y succinato. El dióxido de carbono y el amoníaco son esenciales para el crecimiento. Los ácidos grasos de *B. amylophilus* son principalmente de cadena lineal saturada y ácidos mono-insaturado (Wallnofer y Baldwin, 1967).

### **2.1.7.2. Succinomonas amyloliticas.**

Son células Gram-negativas con forma de varillas rectas o cocobacilos hasta 1,5 x 3,0 micro micras de diámetro, móviles por medio de un solo flagelo polar. *Succinomonas amylolitica* fue descrito por primera vez por Bryant et al. (1958) que fue aislado del rumen de bovinos alimentados con mezclas de heno y grano. Esta bacteria está normalmente asociada con la digestión del almidón, aunque produce una amplia gama de glucósidos e hidrolasas (Wallnofer y Baldwin, 1967).

### **2.1.7.3. Streptococcus bovis.**

*Streptococcus bovis* es de particular interés debido a su papel en el desarrollo de acidosis láctica en ovejas y ganado alimentado con un exceso de almidón. El papel de *S. bovis* en esta condición, identificado por vez primera por Hungate et al. (1952), ha sido revisado por Hungate (1966) y Russell y Hino (1985).

Aunque de interés en relación con la alimentación de la dieta de almidón, *S. bovis* es capaz de crecer en celodextrinas solubles en agua derivados de la celulosa cristalina (Russell, 1998). Así, *S. bovis* es capaz de sobrevivir en el rumen de animales alimentados con forraje (Hungate, 1966). Un aislamiento de *S. bovis* del rumen bovino fue encontrado por Hino y Russel (1985) el cual se utilizó para producir una liasa endo-poligalacturonato, esta enzima permite al organismo recuperar azúcar utilizable (arabinosa, xilosa, galactosa y ramnosa) que se asocian con la fracción péptica de las paredes celulares vegetales.

#### **2.1.8. Secreciones digestivas en los rumiantes.**

Saliva.

La saliva es la mezcla de secreciones de las glándulas salivales. Sus principales funciones son como medio de transporte para la deglución y para el regreso de los alimentos del rumen a la boca. En los rumiantes existen tres pares de glándulas salivales principales: parótidas, submaxilares y sublinguales; en estas glándulas se encuentran dos tipos de células secretoras: las células cerosas y las células mucosas (Stevens, 1970).

La cantidad de saliva excretada depende de las condiciones físicas del contenido de agua en el alimento y de la especie animal. La saliva en los rumiantes es alcalina con gran poder tamponizante y procede en su mayor parte de las parótidas, su pH es de 8.2 a 8.4 en bovinos, la secreción es continua en todas las glándulas salivales y es vertida al rumen junto con sustancias alimenticias y agua (Cronjé, 2000).

Los estímulos provocadores del flujo salival, provienen de la cavidad bucal y de otras regiones; así la estimulación del nervio parasimpático crea una profusa salivación (Reid, 1970).

## JUGO GASTRICO.

La cantidad de jugo gástrico producida por los rumiantes es continua y es mantenida por el constante paso de los alimentos a través del abomaso, después del vaciamiento de los pre estómagos se detiene la secreción del jugo gástrico ácido. El pH en bovinos es de 2 a 3. Las secreciones gástricas son similares a las de los monogástricos, el abomaso tiene glándulas fundicas y pilóricas, las primeras a través de las células principales y con una enzima proteolítica, el pepsinogeno es activado por el ácido clorhídrico para formar la pepsina, la cual actúa sobre las proteínas para convertirlas en péptidos, al mismo tiempo existe un efecto catalítico sobre el pepsinogeno para que siga produciendo, lo cual quiere decir que la pepsina puede convertir pepsinogeno en mas pepsina (Anderson et al., 1987).

## JUGO PANCREATICO.

El páncreas tiene funciones endocrinas y exocrinas, la función exocrina secreta dos tipos de soluciones, una contiene enzimas y es secretada por las células acinares, la otra contiene una concentración de bicarbonato de sodio secretado por las células que revisten los conductos. El objetivo de estas secreciones es hidrolizar las proteínas, grasas y carbohidratos y neutralizar el pH aumentando la alcalinidad. Las células acinares del páncreas secretan las enzimas en forma inactiva a fin de evitar la desintegración de ellas por las mismas enzimas. Las enzimas ribonucleasas y desoxiribonucleasas actúan sobre RNA y DNA degradándolos hasta convertirlos en nucleótidos (Baldwin, 1965).

La tripsina y la quimiotripsina separan proteínas completas, la carboxipeptidasa separa aminoácidos terminales. La amilasa pancreática (esteapsina) hidroliza las grasas y las convierte en ácidos grasos y glicerol, en un pH de 8 después de la acción de la bilis. El control de la secreción exocrina del páncreas depende de tres factores: a) Nervio vago, estimula la secreción, b) Colecistocinina (CCK) aumenta

la secreción y c) Secretina y Gastrina reducen la secreción por retroalimentación del estomago (Reid, 1970).

#### JUGO INTESTINAL.

Se elabora en las criptas de Lieberkühn diseminándose en la superficie interna del intestino delgado y el moco es secretado por las glándulas de Brunner en el duodeno, la secreción es estimulada por la presencia de alimento en el intestino. Además de agua, sales y moco algunas enzimas son secretadas por células intestinales entre ellas:

- 1.- Enterocinasa, que activa el tripsinogeno.
- 2.- Enzimas invertidoras: a) maltasa que hidroliza la maltosa en glucosa y fructosa; b) Sacarosa, que hidroliza la sacarosa en glucosa y fructuosa (levulosa), c) Lactasa, que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa, d) Peptidasa, que hidroliza los péptidos en aminoácidos, e) Ribonucleasa que hidroliza los ácidos ribonucleicos y f) Desoxirribonucleasa que hidroliza ácidos desoxirribonucleicos.

La regulación de las secreciones intestinales es mediante un estímulo local y un control hormonal por la secretina y la gastrina (Anderson et al., 1987).

#### JUGO BILIAR.

La secreción de bilis ocurre en las células hepáticas, y se almacena en la vesícula biliar. La bilis es una solución salina de color amarillo verdoso que consiste principalmente de sales biliares, colesterol, el fosfolípido lecitina y pigmentos biliares (sales de sodio y potasio de los ácidos glicocólico y taurocólico), son ellos los que participan en la digestión y la absorción de las grasas.

Los triglicéridos contenidos en el quimo duodenal forma grupos de ácidos grasos de cadena larga insoluble en agua, la bilis divide estos grupos por un proceso llamado emulsificación en pequeñas gotas, las cuales son absorbidas por el duodeno y el intestino delgado, también participa en la absorción de vitaminas

liposolubles y complementa la acción de lipasa pancreática, también interviene para hacer mas alto el pH del quimo intestinal (Meyer et al., 1965).

### **2.1.9. Fisiología de la digestión.**

El conjunto de procesos que comienza con la ingestión de los alimentos, continúa con su transformación a lo largo del tracto gastrointestinal, con la participación de glándulas, y la finalización con la eliminación de los residuos no absorbidos, esto constituye la digestión (Reid, 1970).

Generalidades de la digestión.

En la digestión de los alimentos intervienen fenómenos de orden físico y químico.

a).- Las modificaciones por vía física corren a cargo de la masticación, de la motilidad del tracto digestivo y de procesos de inhibición y solubilización.

b).- El ataque químico de los alimentos corre a cargo de las secreciones de las glándulas del tubo digestivo, por su contenido de enzimas y, por la acción de bacterias y protozoos.

Las secreciones digestivas proceden de las glándulas del páncreas, el hígado y las glándulas salivales (Reid, 1970).

Mecanismo de secreción.

La secreción es una función celular peculiar que comprende dos procesos principales:

a).- El transporte hasta la luz del tracto digestivo de agua y cristaloides que las células glandulares obtienen de la sangre, se añaden sustancias inorgánicas (HCl) y orgánicas de bajo peso molecular (Ac. Biliares).

b).- La cesión de proteínas y de enzimas que se unen a la corriente de fluidos, secretados en los conductos secretores.

Las enzimas digestivas contenidas en las secreciones ejercen su actividad sobre los tres grupos principales de alimentos: proteínas, hidratos de carbono y grasas. La pepsina, tripsina y quimiotripsina son las proteinasas actuantes en estomago o intestino delgado y que tras la activación del zimógeno correspondiente, desdobra mediante hidrolisis los compuestos peptídicos (Meyer et al., 1965).

Las bacterias constituyen en el canal digestivo una segunda fuente de enzimas, permiten aprovechar la celulosa formando enzima glucosidica, mediante ellas se puede aprovechar hasta cierto grado la celulosa de los forrajes (Annison, 1965).

Metabolismo nitrogenado del rumen.

Las proteínas son degradadas hasta aminoácidos, tanto en la panza como en el intestino, por enzimas y por proteinasas de origen microbiano. El amoniaco procede unas veces de la diseminación de los aminoácidos y de la reducción de nitratos, así como de la hidrolisis de la urea de formación endógena o de presencia exógena (Devant et al., 2000).

Digestión en el intestino.

En el intestino delgado se degradan la mayoría de los alimentos siendo el lugar más importante de la digestión. La papilla alimenticia pasa por el intestino a través del píloro y recibe la denominación de quimo, donde sufre degradación por nuevas secreciones digestivas (Church, 1988).

Degradación de lípidos.

Los ácidos grasos son neutralizados en el rumen y pasan como jabones de potasio al intestino delgado donde se absorben como tales y entran al sistema linfático. En el intestino delgado del rumiante también se vierten sales biliares y lipasas pancreáticas y por lo tanto pueden hidrolizar los triglicéridos que logran escapar del rumen (Devant et al., 2000).

## **2.2. CARBOHIDRATOS.**

Es importante apreciar la naturaleza química y física de las plantas para comprender el porqué de la digestión fermentativa de los forrajes. Las partes estructurales de las plantas, hojas y tallos contienen una gran cantidad de pared celular que es el material que da firmeza a las plantas, con excepción de la lignina, todas estas moléculas de la pared celular tienen una naturaleza carbohidratada (Williams et al., 1968).

Ninguno de los materiales de la pared celular se somete a la digestión hidrolítica de las enzimas digestivas glandulares de los mamíferos, sino a la acción hidrolítica de los complejos de enzimas microbianas conocidas como celulasas, la lignina también presente en la pared celular tiende a encapsular a los carbohidratos de la pared celular protegiéndolos de la celulasa bacteriana (Anderson et al., 1987).

En la boca el alimento es ingerido y no sufre digestión alguna pues el animal carece de la enzima amilasa presente en la saliva de los animales no rumiantes, ya que entra al rumen es atacado por las enzimas microbianas hidrolíticas, los carbohidratos estructurales requieren de una acción física de las bacterias a la superficie de la partícula vegetal, esta acción enzimática libera azúcares simples hacia el interior de la fase fluida, posteriormente son absorbidos hacia el interior de los cuerpos microbianos. Las celulasas bacterianas pueden estar asociadas a la célula o presentes en sacos de la membrana que pueden excretar enzimas de la célula bacteriana una vez que ha sido adherida al forraje (Wallace, 1993).

Una vez dentro de la célula son metabolizados siguiendo la ruta de la glucólisis o de Embden-Meyerhof, el catabolismo de la glucosa da lugar a dos moléculas de piruvato, la energía potencial que es formada durante esta reacción no es directamente accesible para el animal huésped, pero representa la fuente principal de energía para el mantenimiento y crecimiento de los microorganismos (Barcroft et al., 1944).

El piruvato sufre de una reducción mayor para dar lugar a una producción adicional de ATP, el CO<sub>2</sub> puede reducirse para formar metano dando al final los productos terminales principales de la digestión fermentativa de los carbohidratos, los ácidos grasos volátiles (AGV). Los AGV primarios son el ácido acético, propionico y butírico, otros cuantitativamente menores pero metabólicamente importantes son: valerico, isovalerico, isobutirico y 2-metilbutirico (El Shazly, 1952).

Las concentraciones relativas de AGV tienen consecuencias muy importantes desde el punto de vista nutricional y metabólico, los AGV son los productos de desecho o terminales del metabolismo microbiano, si se acumularan en el rumen podrían suprimir o alterar los procesos fermentativos porque disminuyen el pH, sin embargo el huésped mantiene las condiciones necesarias para la fermentación amortiguando los cambios de pH y retirando los AGV por medio de la absorción (Cook y Miller, 1965).

Se producen como resultado de la fermentación de los carbohidratos y de las cadenas carbonadas de los aminoácidos, principalmente ácido acético, propionico y butírico, constituyen la principal fuente de energía y pueden cubrir cerca del 60% de las necesidades energéticas (Figura 2).

El acetato se forma a partir del piruvato, el propionato sigue dos caminos en su formación, uno es mediante la carboxilación del fosfoenol-piruvato a oxaloacetato y succinato y el otro mediante la formación del acrilato, y el butirato, se puede generar bien a la inversa de la bioxidación de los ácidos grasos o bien a través de malonil-CoA. Otros ácidos grasos volátiles como el valerianato se origina a partir del acetato y propionato, el etanol solo aparece en altas concentraciones en el jugo del rumen, en la ingestión de grandes cantidades de almidón o azúcar (Stevens, 1970).

Para la degradación de la fibra, la disponibilidad de la celulosa a los microorganismos puede ser limitada debido a la asociación de la celulosa con lignina, debido a que no es degradada en el rumen, el grado de lignificación frecuentemente determina el valor nutritivo del alimento (Cook y Miller, 1965).

### 2.2.1 Carbohidratos no fibrosos.

Son aquellos que desde el punto de vista del análisis químico no forman parte de la FND (Fibra detergente neutra) y este grupo se compone de los carbohidratos de reserva de las plantas, azúcares solubles, pectinas y ácidos orgánicos. Como se ha mencionado anteriormente, las pectinas forman parte de la pared celular, pero no se incluyen dentro de la FND (Fibra detergente neutra) de Van Soest (1982) y al tener un perfil de fermentación parecido a los almidones, con una degradabilidad ruminal cercana al 100% (Nocek y Tamminga, 1991), se incluyen dentro de esta categoría (Cuadro 1).

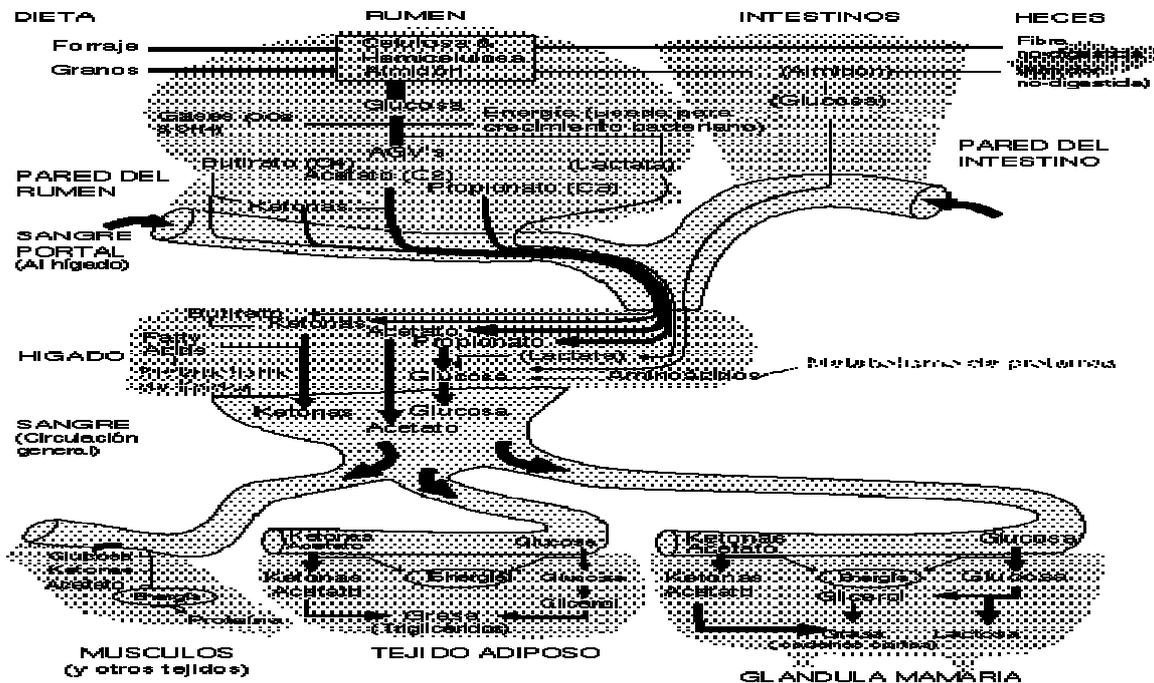


Figura 2. Metabolismo de carbohidratos en el rumen (Ecología Nutricional del Rumiante, 1982).

El almidón y los fructosanos son degradados eficientemente por las bacterias amilolíticas, siendo el propionato el principal producto de fermentación. Hay gran número de especies bacterianas que poseen actividad amilolíticas y su degradación comenzará por la adhesión del microorganismo al sustrato. Después intervienen diversos tipos de enzimas que actúan sinérgicamente degradando toda su estructura. Determinadas especies bacterianas pueden tener actividad sólo en una parte de la degradación, por lo que son frecuentes las asociaciones bacterianas entre especies amilolíticas e incluso con especies no amilolíticas (Hungate, 1966). Unas especies inician la degradación del almidón, pero no pueden degradar los productos solubles formados, que serán degradados por otras especies (Orskov y Ryle, 1998).

### **2.2.2 Carbohidratos fibrosos**

La fibra vegetal está constituida por los carbohidratos estructurales de las plantas y es un agregado de componentes que no constituyen una entidad propia, pero que se entrelazan formando una misma macromolécula (Chesson y Forsberg, 1988).

Los carbohidratos son la fuente más importante de energía y de los principales precursores de grasa y azúcar (lactosa) en la leche de la vaca. Los microorganismos en el rumen permiten a la vaca obtener energía de los carbohidratos fibrosos (celulosa y hemicelulosa) que son ligados a la lignina en las paredes de las células de plantas, la fibra es voluminosa y se retiene en el rumen donde la celulosa y la hemicelulosa fermentan lentamente. Mientras que madura la planta, el contenido de lignina de la fibra incrementa y el grado de fermentación de celulosa y hemicelulosa en el rumen se reduce (Chesson y Forsberg, 1988).

La presencia de fibra en partículas largas es necesaria para estimular la rumiación. La rumiación aumenta la separación y fermentación de fibra, estimula las contracciones del rumen y aumenta el flujo de saliva hacia el rumen. La saliva contiene bicarbonato de sodio y fosfatos que ayudan a mantener la acidez (pH) del

contenido del rumen en un pH casi neutral. Raciones que faltan fibra suficiente resultan en un porcentaje bajo de grasa en la leche y contribuyen a desordenes de digestión, tales como desplazamiento del abomaso y acidosis del rumen (Chesson y Forsberg, 1988).

| <i>Carbohidratos</i>            | <i>Composición</i>   |
|---------------------------------|--|
| <i>No fibroso</i>               |  |
| <i>Azúcares solubles</i>        | <i>Mono y di-sacáridos</i>   |
| <i>Carbohidratos de reserva</i> |  |
| <i>Almidón</i>                  | <i>Polímero de glucosa unidas por enlaces <math>\alpha</math> 1-4, <math>\alpha</math> 1-6</i> |
| <i>Fructosanos</i>              | <i>Polímero de fructosa</i>  |
| <i>Lévanos</i>                  | <i>Enlaces <math>\beta</math> 2-6 (forrajes verdes y granos de cereal)</i>                     |
| <i>Inulinas</i>                 | <i>Enlaces <math>\beta</math> 2-1 (tubérculos)</i>   |
| <i>Pectinas</i>                 | <i>Ácido galacturónico, arabinosa, galactosa</i>   |
| <i>Ácidos orgánicos</i>         | <i>Productos de fermentación de otros carbohidratos (ensilados)</i>                            |
| <i>Fibroso</i>                  | <i>Polímero de glucosa unidas por enlaces <math>\beta</math> 1-4</i>                           |
| <i>Celulosa</i>                 |  |
| <i>Hemicelulosa</i>             | <i>Xilanos, glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, ácido galacturónico</i>                     |
| <i>Lignina</i>                  | <i>Polímero fenólico unidos por enlaces cruzados muy complejos</i>                             |

*Cuadro 1. Clasificación de los carbohidratos (adaptado de Van Soest, 1982).*

### **2.2.3 Digestión de carbohidratos.**

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los microorganismos ruminales (Hungate, 1966). Y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los rumiantes. Además de aportar energía a los microorganismos y al

rumiante, se encargan de mantener el óptimo funcionamiento del rumen. Los carbohidratos se dividen en fibrosos y no fibrosos.

Los ruminantes consumen preferentemente alimentos de origen vegetal, especialmente forrajes que se caracterizan por tener una proporción importante de fibra. Esta fibra es la estructura que forma parte de la pared celular vegetal, y en ella se distinguen celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina (Hungate, 1966).

Estos carbohidratos fibrosos además son necesarios para:

- ✓ Estimular la rumia (la cual mejora la fermentación).
- ✓ Aumentar el flujo de saliva hacia el rumen.
- ✓ Estimular las contracciones ruminales (Firkins, 1996).

La celulosa, la hemicelulosa y las pectinas son degradadas mediante enzimas *celulasas*, *hemicelulasas* y *pectinasas* aportadas por las bacterias que rompen los enlaces  $\beta$  [1-4], mientras que las ligninas no son digeridas por las enzimas bacterianas ni las del rumiante y son eliminadas sin ser digeridas en las heces. Su importancia se debe no solo a que no es digestible sino que además protege a otros carbohidratos de los procesos digestivos (Barcroft et al., 1944).

Los carbohidratos son digeridos de distinta manera según el animal sea monogástrico o rumiante, pero en cualquiera de los casos al final se van a obtener monosacáridos y éstos serán absorbidos a nivel intestinal (Hungate, 1966).

La digestión implica todos los procesos físicos y químicos que se llevan a cabo sobre los alimentos, con el fin de reducirlos de tamaño, para que puedan ser absorbidos, la absorción implica el paso de los nutrientes desde el intestino hacia la sangre.

El material vegetal es atacado por las enzimas presentes en la superficie de las bacterias, para liberar monosacáridos y oligosacáridos, que son utilizados de

nuevo por las bacterias, primeramente para la formación de piruvato por la misma vía metabólica de *Embden-Meyerhof* en las células de los mamíferos (Firkins, 1996).

El piruvato en condiciones de aerobiosis entra en el ciclo de Krebs y por un proceso de fosforilación oxidativa se obtiene energía en forma de ATP, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En condiciones de anaerobiosis como las que se tienen en el medio ruminal, a partir de piruvato se obtienen AGV (acético, butírico y propionico), gases (metano y CO<sub>2</sub>) y H<sub>2</sub>O, por diferentes vías metabólicas (Cronjé, 2000)

La producción de los diferentes ácidos grasos depende de las bacterias que intervienen en el proceso y del tipo de alimento. Así, con dietas ricas en almidón aumenta la cantidad de todos los AGV. Sin embargo, con dietas ricas en fibra la proporción de acético es mayor que con dietas ricas en almidón (Cronjé, 2000).

#### **2.2.4 Degradación de los carbohidratos.**

Se verifica en dos etapas; una es por el desdoblamiento intraluminal de los polisacáridos y la otra por la digestión membranosa de los oligosacáridos presentes en el pienso. La amilasa rompe los enlaces alfa glucosídicos de la amilosa, amilopectina y glucógeno, formándose sacarosa, lactosa y almidón (Devant et al., 2000).

#### **2.2.5 Metabolismo de los carbohidratos.**

Los carbohidratos son degradados en los preestomagos de los rumiantes hasta ácidos grasos volátiles (AGV) inferiores, se utilizan para la síntesis de polisacáridos microbianos.

La degradación de la celulosa se realiza gracias a la flora microbiana en tres etapas:

- 1.- Degradación en fragmentos menores, mediante una despolimerasa.

2.- Ruptura de los fragmentos en celobiosa y glucosa por efecto de una glucosidasa.

3.- Transformación de la celobiosa y glucosa por efecto de la celubiasa y descomposición de la glucosa en ácidos grasos inferiores.

En la degradación de las hemicelulosas y pentosas actúan tres enzimas la  $\beta$ -xilosidasa, xilanasa y arabinosidasa. La pectina se descompone por acción de la pectinestearasa y poliglacturonidasa, formando ácido pectínico y metanol.

En la degradación del almidón, los polisacáridos de la fructuosa son desdoblados en el rumen hasta ácidos grasos de cadena corta. La degradación de disacáridos y monosacáridos se realiza mediante la reacción de glucólisis con formación de piruvato o lactato (Baldwin, 1965).

### **2.3. PROTEÍNAS.**

Las proteínas pueden ser vulnerables a la digestión fermentativa ya que son atacadas por enzimas proteolíticas. Algunas proteínas son desdobladas en el rumen a amonio y a varios ácidos orgánicos. El amonio proveniente de la degradación de las proteínas, mas un poco más que se forma de la urea proveniente de la saliva es usado en la síntesis de proteína microbiana, el amonio remanente es absorbido en forma de amoniaco por las paredes retículo-rumen e intestinal y transportado al hígado para ser convertido a urea. Las proteínas microbianas y remanente en el alimento pasan al intestino donde son hidrolizadas a aminoácidos, los cuales son utilizados en el metabolismo del animal (Firkins, 1996).

Cuando menor es la solubilidad de las proteínas, menor es su degradación en el rumen, y así están más disponibles para su digestión y absorción en el intestino delgado. Del total de nitrógeno (N) (Figura 3), de los alimentos, esta dividido en N

proteico y N no proteico, este a su vez puede ser soluble o insoluble, y no disponible (Firkins, 1996).

En el rumen la fracción soluble de N es degradable en  $\text{NH}_3$ , y puede ser absorbido a través de las paredes del rumen y transportado al hígado donde se convierte en urea y es reciclado por la saliva al rumen. Algo de amoniaco es utilizado para la síntesis de aminoácidos y proteína microbiana, se ha estimado que de 50-80% de la proteína microbiana se deriva del amoniaco ruminal (Devant et al., 2000).

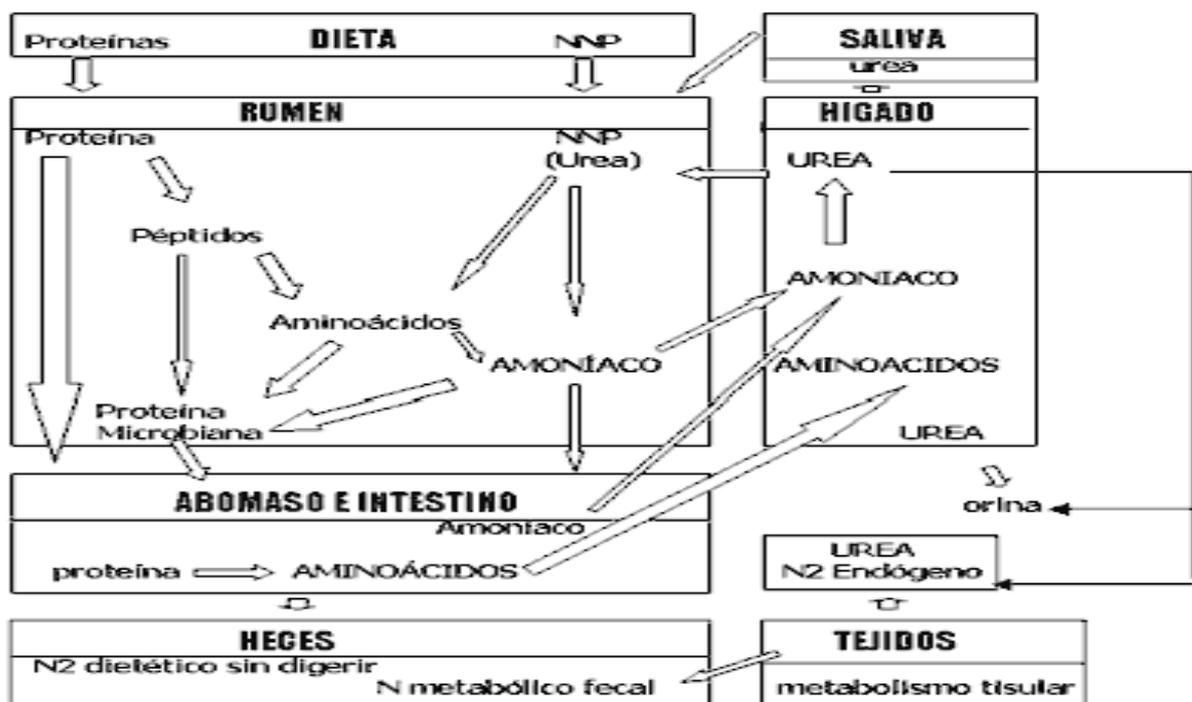


Figura 3. Digestión de las proteínas en el rumiante (Ecología Nutricional del Rumiante, 1982.).

Al aumentar la tasa de pasaje de materia orgánica, la cantidad fermentable en el rumen esta reducida por lo que decrece la síntesis de la proteína microbiana. La absorción en el intestino delgado es en forma de aminoácidos, péptidos, nucleótidos y nucleosidos. Los aminoácidos son transportados al hígado y de allí

son llevados a otros tejidos del cuerpo para crecimiento, lactación, preñez, etc. (Devant et al, 2000).

### **2.3.1. Degradación de proteína.**

La proteína es un nutriente esencial en la nutrición de todas las especies animales. En los rumiantes, el objetivo de la nutrición proteica es doble, por una parte satisfacer las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales, y por otra, aportar aminoácidos al animal. Las necesidades de los microorganismos, se pueden cubrir con fuentes de nitrógeno proteico y no proteico, en cambio, las necesidades del animal solo se pueden cubrir con aminoácidos, que pueden ser de origen dietario o microbiano.

A diferencia de lo que pasa en monogástricos, el perfil y la calidad de los aminoácidos que llegan al duodeno es diferente al aportado en la ración, debido a la degradación ruminal de los aminoácidos dietarios y al aporte de proteína microbiana, sintetizada a partir de la energía derivada de los carbohidratos y de compuestos nitrogenados simples. Esta proteína microbiana junto con la proteína que se escapa de la degradación ruminal esta directamente disponible para ser digerida y absorbida por el rumiante (Wallace y Cota, 1988).

### **2.3.2. Síntesis de proteína microbiana.**

Las bacterias fermentan los hidratos de carbono y la proteína dietaria para obtener esqueletos carbonados, energía y compuestos nitrogenados simples para sintetizar proteína propia para su crecimiento. Esta proteína microbiana puede representar entre el 40 y 100% de la proteína metabolizable para la nutrición del ganado de carne, disminuyendo al aumentar el contenido en proteína no degradable de la dieta. La proteína microbiana es de alto valor biológico y de composición muy constante en dietas muy diferentes (Orskov, 1992).

## **2.4. FERMENTACIÓN RUMINAL.**

El rumen es una cámara de fermentación anaerobia. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar los alimentos con regularidad, añadiendo tampones y eliminando los ácidos producidos, arrastrando los residuos alimenticios no digeribles y los productos microbianos, y manteniendo unas condiciones apropiadas de pH, temperatura y humedad para el crecimiento microbiano. Estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas para su crecimiento, y el rumiante depende de los productos de fermentación del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yokohama y Johnson, 1988).

El metabolismo del rumiante está enfocado en aprovechar los productos de la fermentación como los ácidos grasos volátiles (AGV), sin embargo, no todos los productos de fermentación son útiles para el rumiante, como el metano, o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos (Owens y Goetsch, 1986).

La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos (m.o.) presentes en el rumen. Tiene aspectos que difieren de la digestión glandular propia de los animales monogástricos (como el cerdo). La digestión propia de la mayoría de los mamíferos ocurre en el estómago y el intestino delgado por enzimas producidas por el animal mismo. Esto se denomina 'digestión autoenzimática'. En los rumiantes, la degradación de los sustratos moleculares por la acción de bacterias y otros microorganismos se realiza por una hidrólisis enzimática igual que en la digestión glandular; la diferencia mayor es que las enzimas digestivas en la fermentación son de origen microbiano, por lo que se le denomina digestión aloenzimática (Firkins, 1996).

Esta digestión fermentativa es más lenta y los sustratos son alterados en mayor grado que en la digestión glandular. Además la fermentación ocurre en un medio anaerobio. La digestión aloenzimática puede ocurrir en solo dos sitios del tracto gastrointestinal. Estos sitios son el ciego y/o colon por un lado y por otro lado en el

retículo-rumen. En el primer caso hablamos de fermentación cecocólica (o postgástrica) y en el segundo caso de fermentación pregástrica, la cual corresponde a los rumiantes (Firkins 1996).

## **2.5. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES.**

### **2.5.1. Productos que dan origen a los ácidos grasos volátiles (AGV)**

Los carbohidratos constituyen la mayor parte de la ración alimenticia de los rumiantes y por lo mismo, son la fuente principal de energía, tanto para los microorganismos como para el rumiante que los ingiere.

Los carbohidratos más abundantes en las raciones para rumiantes son polisacáridos, celulosa, hemicelulosa, pectinas, fructanas y almidones. En base a materia seca, la celulosa puede alcanzar de 20 a 30% de los carbohidratos, las hemicelulosas de 14 a 17% y las pectinas hasta 10%. Son pocos los productos vegetales que tienen cantidades considerables de sacarosa (la caña de azúcar es uno de ellos) y menos aun los que contienen glucosa (Corbett, 1969).

La proteína de la dieta también puede contribuir a la producción de ácidos grasos volátiles, especialmente en aquellas raciones con un contenido proteico elevado.

Su participación es a través de la degradación de los ácidos aminados hasta metabolitos capaces de convertirse en ácidos grasos volátiles. Sin embargo, se carece de datos cuantitativos al respecto (Forrest y Walker, 1971).

Hay ocasiones en que la concentración de azúcares solubles de la ración puede ser muy elevada, alcanzando hasta un 25% de la materia seca cuando se utilizan vegetales poco antes de la floración (Weston y Hogan, 1968).

La fermentación de estos carbohidratos solubles puede ser muy rápida, pero es necesario que la ración proporcione también nitrógeno, indispensable para la

síntesis proteica bacteriana. Cuando los microorganismos del rumen fermentan carbohidratos solubles, utilizan una parte de la glucosa para la síntesis de compuestos de almacenamiento de energía, los cuales pueden ser aprovechados cuando las bacterias encuentran como sustratos principales la celulosa y hemicelulosas (Spicer et al., 1986).

Los productos que se obtienen al final del proceso fermentativo dependen, en parte, del tipo de microorganismos presentes en un momento dado en el rumen, ya que los compuestos que algunas bacterias tienen como productos finales pueden ser utilizados por otros para su metabolismo. Sin embargo, los que resultan más importantes son el ácido acético, el propionico y el butírico, entre los ácidos grasos volátiles, además del láctico, el succínico, el etanol, el metano, CO<sub>2</sub>, hidrógeno y ácido sulfhídrico (Weston y Hogan, 1968).

Todos ellos se obtienen a partir de la glucosa o fructosa que se liberan de los distintos carbohidratos y que fermentan las bacterias siguiendo la vía catabólica de la glucolisis. Uno de los compuestos clave en este proceso degradativo es el ácido pirúvico que aparece en concentración baja en el líquido ruminal a partir de la cual se obtienen los distintos ácidos grasos volátiles. El ácido láctico puede producirse en cantidad considerable bajo ciertas condiciones especiales. Durante la fermentación en el rumen, los ácidos grasos que se producen sufren procesos de interconversión, lo cual puede explicarse tomando en cuenta que un ácido determinado, que es producto final de la actividad de algunos microorganismos, es utilizado a su vez como sustrato para la actividad de otros. Así podemos observar que 40 a 80% del ácido butírico deriva del acético y de 6 a 20% del acético proviene del butírico (Spicer et al., 1986). (Figura 4).

### **2.5.2. Producción de ácido acético**

Las reacciones que predominan en la producción de este ácido y lo mismo del butírico, son reacciones fosfoclasticas, en las que el ácido pirúvico es convertido

en fosfato de acetilo y ácido fórmico o hidrógeno y CO<sub>2</sub>. Los hidrógenos que se desprenden en el proceso oxidativo son utilizados de distintas maneras según las bacterias que realicen la fermentación, los clostridios transfieren los electrones liberados a protones que se separan como hidrógeno molecular, otras los transfieren al CO<sub>2</sub> produciendo ácido fórmico y otras más los utilizan para hidrogenar ácido grasos (Marty y Preston, 1988).

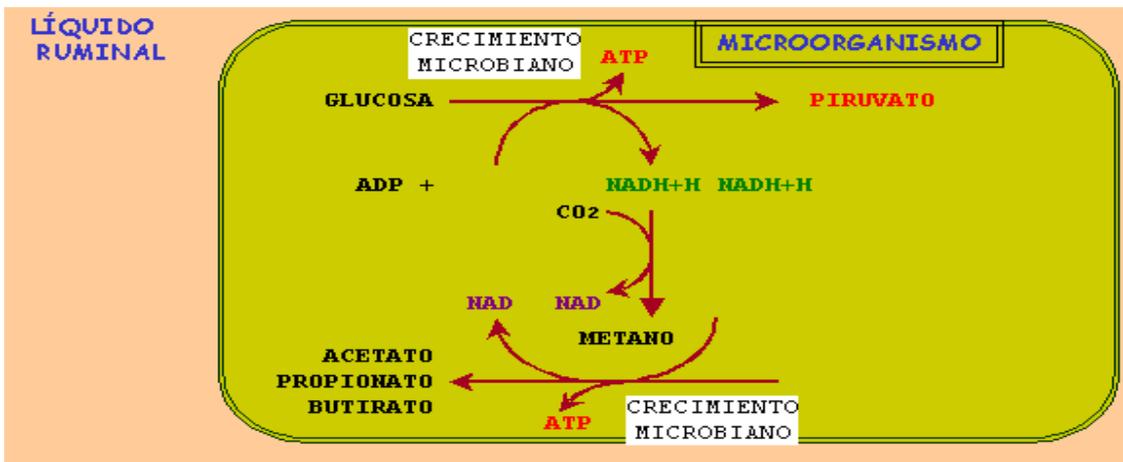


Figura 4. Participación de los microorganismos en la producción de ácidos grasos volátiles.

Además hay bacterias, como las propionibacterias que al oxidar el ácido pirúvico hasta acético no liberan hidrógeno, sino que este es utilizado para formar ácido propionico simultáneamente.

A su vez el ácido fórmico sufre oxidación rápida en el rumen, en la que interviene una deshidrogenasa fórmica asociada a ferredoxina. Esta oxidación produce hidrógeno y CO<sub>2</sub> (Allen, 1964).

### 2.5.3. Producción de ácido propiónico

El ácido propiónico es producido en el rumen a partir del ácido pirúvico o del ácido láctico, siguiendo dos vías diferentes, aun cuando las dos son funcionales, una de

ellas es la predominante y se lleva a cabo con la formación de oxaloacetato y succinato. La segunda vía requiere de la formación de acrilato y se presenta en el rumen de animales en los que la ración alimenticia es deficiente en azufre, quizás debido a un cambio en la población bacteriana o bien cuando es a base de granos (Whanger y Matrone, 1967).

#### **2.5.4. Producción de ácido butírico**

En el rumen se puede sintetizar este ácido a partir del acético o de sustancias capaces de formar Acetil-CoA, como el ácido pirúvico (Barker, 1961)

El AGV que siempre se produce en mayor cantidad es el acetato. Es el producto típico de rumiantes consumiendo forraje y depende del tipo de microorganismos presentes. La celulosa y la hemicelulosa son los principales carbohidratos de los forrajes y su presencia en el rumen induce el crecimiento de las poblaciones de bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas y metanogénicas. Cuando se agregan concentrados a la dieta, estamos agregando almidón que es un carbohidrato de fácil digestión; esto induce el crecimiento de una flora amilolítica que está asociado a un cambio de pH en el rumen. En estas condiciones se aumenta la proporción de propionato en el rumen (Tweedie et al., 1966).

#### **2.5.5. Absorción de ácidos grasos volátiles.**

Los ácidos grasos que se liberan en el rumen son aprovechados en parte por las bacterias, que los utilizan para sintetizar algunos de sus componentes estructurales. La síntesis de proteína se realiza principalmente a partir del ácido acético, algunas bacterias sintetizan los ácidos grasos de cadena larga a partir del isobutírico, n-valérico y n-caproico, principalmente (Wegner, 1963).

El resto es absorbido en su mayoría a través de la pared del rumen realizándose por medio de difusión simple, es decir, siempre que el gradiente de concentración sea favorable para ello; aquellos que no son absorbidos a este nivel pasan al

omaso y abomaso en donde también hay absorción (Tweedie, 1966). Weston y Hogan (1968) comprobaron que cerca de 76% de los ácidos presentes en el rumen se absorbían a este nivel, 19% en omaso y abomaso y tan sólo un 4-5% llegaba a pasar al intestino.

El orden en que se absorben los ácidos en corderos y terneros corresponde a la secuencia: butírico > propionico > acético. En el abomaso la absorción se realiza prácticamente a la misma velocidad que en el retículo rumen. En cambio el ácido láctico, que normalmente no se produce en gran cantidad en rumen, parece ser absorbido más bien lentamente (Sellers, 1955).

Se ha observado que la absorción a través de la pared del rumen es más efectiva en aquellas superficies que poseen un gran número de papilas y ha habido investigadores que han establecido que existe una correlación entre la longitud relativa de las papilas en el saco ventral del rumen y la ganancia de peso por el animal (Sellers, 1955).

La absorción de los ácidos grasos es afectada por el pH en el medio. Si se alcaliniza el contenido ruminal, la absorción se reduce, en cambio cuando el medio es acidificado la absorción se aumenta. Este aumento puede deberse a que se facilita el paso de moléculas no ionizadas de las capas lipoides de la membrana celular o al hecho de que cuando se eleva la concentración de CO<sub>2</sub> y ácido butírico se induce un aumento en el aporte sanguíneo hacia el rumen, facilitando la salida rápida de los productos de la digestión (Sellers, 1955).

Otro de los factores que tiene una gran influencia sobre la velocidad de absorción de los ácidos, es el metabolismo de los mismos a nivel de la célula epitelial del rumen. El hecho de que estos ácidos son metabolizados en el epitelio que recubre el rumen, aun cuando no se conoce bien el grado de modificación de cada uno de los ácidos, es posible afirmar que el acético es absorbido y pasa al torrente sanguíneo prácticamente sin ningún cambio, el propionico se absorbe y en el

epitelio una parte se convierte en láctico; en cambio el butírico es transformado casi totalmente a cuerpos cetónicos (Pennington y Pfander, 1967).

Los ácidos grasos volátiles se forma en el rumen una vez que el bolo alimenticio llega y se descompone en él. Sin embargo la proporción de formación de estos ácidos grasos varía con la dieta que se les suministre a los animales (Heuter, 1956).

### **2.5.6. Factores que afectan la producción de ácidos grasos volátiles**

En el rumen, la producción de los ácidos grasos volátiles depende de la composición de la ración, la actividad microbiana, el pH del medio y la frecuencia de ingestión de alimentos. En general, las raciones a base de forraje producen menos cantidad de ácidos grasos volátiles, en contraposición con aquéllas a base de concentrados de alto contenido de proteínas o de carbohidratos fácilmente fermentables. La mayor concentración de ácidos grasos volátiles en el rumen se observa después de que han transcurrido de 3 a 6 horas de la ingestión del alimento, si éste es ofrecido una sola vez al día y la producción de ácidos grasos volátiles disminuye conforme aumenta el pH del rumen.

La cantidad de ácidos grasos volátiles presentes en el líquido ruminal en un momento dado depende, además de los factores anteriores, de la absorción de los ácidos a través de la pared del rumen, o de su paso a los otros compartimentos. La proporción de cada uno de los ácidos grasos volátiles en la mezcla varía con la calidad, cantidad y aun la textura de los componentes de la ración alimenticia; el sustrato predominante en la ración tiene una influencia marcada (Balch, 1957).

La proporción molar de ácido acético es elevada, entre 60-75%, cuando se suministran raciones a base de forraje o pastos sin picar o en trozos grandes, la variación dependerá del tipo de forraje o pasto, el estado de madurez del mismo, la fertilización de la tierra en que creció, etcétera. El ácido propiónico varía entre 15 y 19% y el butírico sufre variaciones más amplias, 8 a 16%. Además con estas

raciones hay una pérdida considerable de la energía consumida, energía que se pierde bajo la forma de metano (Armstrong, 1960).

Si el forraje se da al animal finamente picado, la proporción de ácido acético se ve disminuida en relación a los otros ácidos, en aquellos casos en que la ración alimenticia es modificada por la introducción de una gran cantidad de concentrado, sin un periodo previo de adaptación, se puede provocar una acumulación de ácido láctico en el rumen. Esto es el resultado de la incapacidad de las bacterias existentes para metabolizarlo a la velocidad en que es producido y por la falta de una concentración adecuada de bacterias capaces de hacerla. La producción excesiva de ácido láctico puede llegar a provocar una acidosis en el animal, y aun su muerte (Marty y Preston, 1970).

La actividad microbiana en el rumen, que es la responsable de la digestión a este nivel y finalmente de la producción de los distintos ácidos grasos, depende de la adaptación de los microorganismos a la ración alimenticia del animal, esta adaptación ayuda a determinar la digestión de las deferente raciones (Knox y Ward, 1961).

### **2.5.7. Rutas metabólicas**

Para la oxido-reducción anaerobia, los carbohidratos son el sustrato ideal, sus carbonos tienen un mayor potencial de trabajo químico anaerobio (Barcroft et al., 1944)

Orskov, (1991) citado por Ried, (1994) concluyo que hay 3 características críticas de los alimentos fibrosos: la fracción soluble, el componente insoluble pero degradable y la tasa de degradación del material insoluble, y así la digestibilidad esta determinada por la fracción de forraje que es potencialmente digestible y por la constante de digestión y pasaje.

También consideran que el más serio error en las mediciones cinéticas es la falla en estimar el residuo indigestible de las fermentaciones.

En la fermentación, los electrones pasan del dador, un intermediario formado durante la degradación de la molécula de sustrato, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico, también generado durante el catabolismo del sustrato inicial (Barcroft et al., 1944).

El metabolismo anaeróbico es siempre menos eficiente que la respiración, ya que la fermentación no aprovecha toda la energía del sustrato orgánico (por ejemplo, un azúcar) para la producción del combustible universal de la célula (el ATP) ni, por tanto, para la síntesis de material celular (Swjersen et al., 2006).

Los productos de la fermentación no pueden ser metabolizados, en condiciones anaeróbicas, por el organismo que los produce. En las fermentaciones el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato, pues se sintetiza durante el catabolismo de un compuesto y en pasos enzimáticos concretos, pero requiere que la fuente genere un intermediario de alta energía (Swjersen., 2006).

## **2.6. BIOPELÍCULA O BIOFILM.**

Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son ubicuas (que pueden estar presentes en muchos lugares al mismo tiempo) en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. Son consideradas comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y están adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo (Lindsay y Holy, 2006).

Se tienen registros fósiles de la formación de biopelículas desde hace aproximadamente 3.2 mil millones de años, por lo que se considera que esta organización celular representa el modo de crecimiento que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles, dispersarse para formar nuevos nichos y les

otorga ventajas significativas de protección frente a fluctuaciones del ambiente como la humedad, temperatura y pH, así como la concentración de nutrientes y la eliminación de desechos. Las concentraciones de los biofilm permiten que los microorganismos se agrupen en zonas muy limitadas y seguras, uniéndose con fuerza a un soporte sólido que les va a proporcionar estabilidad, nutrientes y espacio (Lindsay y Holy, 2006).

La biopelícula es por efecto el modo de crecimiento de la mayoría de los patógenos. Este modo de crecimiento maximiza la obtención de nutrientes favoreciendo la colonización, permite la cooperación entre las cepas por medio del crecimiento en comunidad y propicia la protección frente a los mecanismos de defensa del hospedador o a sustancias antimicrobianas (Holah y Kearney, 1992).

En su estado maduro, una biopelícula forma tapices, agregados, promontorios o incluso microcolonias de mayor complejidad. Los habitantes de la película pueden pertenecer a una misma especie o a diversos grupos de microorganismos. Su nexo común es una matriz de polisacáridos, ADN y proteínas, que constituyen una sustancia polimérica extracelular, la mucosidad (Balaban et al., 2008).

### **2.6.1. Fase de desarrollo de las biopelículas.**

La maduración de la biopelícula corresponde al crecimiento tridimensional y definición de una arquitectura por las interacciones entre las bacterias adheridas. Ese proceso conlleva la creación de ambientes heterogéneos desde el punto de vista físico-químico en el cual las bacterias asociadas a la biopelícula presentan características fisiológicas distintas de las planctónicas (Chmielewski y Frank, 2003).

Además, dependiendo de la cepa implicada, las microcolonias pueden estar compuestas de 10 – 25% de células y de 75 – 90% de matriz SPE (Sustancia Polimérica Extracelular).

Las biopelícula contienen “canales de agua” que permiten el transporte de nutrientes, metabolitos y señales químicas que las células secretan en respuesta al aumento de la densidad poblacional y que interfieren en el desarrollo de la biopelícula (Costerton, 1995).

En la actualidad es bien conocido el sistema de comunicación entre las bacterias por medio de secreción de pequeñas moléculas difusibles. Varios estudios recientes indican que la formación de biopelícula es regulada por la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional y controlados por señalización célula a célula en un mecanismo denominado “*quorum sensing*” (Costerton, 1995).

En un creciente número de cepas bacterianas se evidencia ese tipo de comunicación en el cual las bacterias pueden sentir cambios en el medio y coordinar la expresión genética a favor de la supervivencia de toda la comunidad. El “*quorum sensing*” regula varias funciones tan diversas como la movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético además del desarrollo de la biopelícula (Marshall, 1992).

Asimismo, condiciones ambientales interfieren en la dispersión de la biopelícula entre esas se incluyen la disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígeno, pH y presencia de determinados compuestos químicos (Marshall, 1992).

La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo que son: 1) adhesión, 2) acondicionamiento, 3) síntesis de matriz extracelular, 4) maduración y 5) dispersión (figura 5), lo que lleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeados de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua (Balaban et al., 2008).

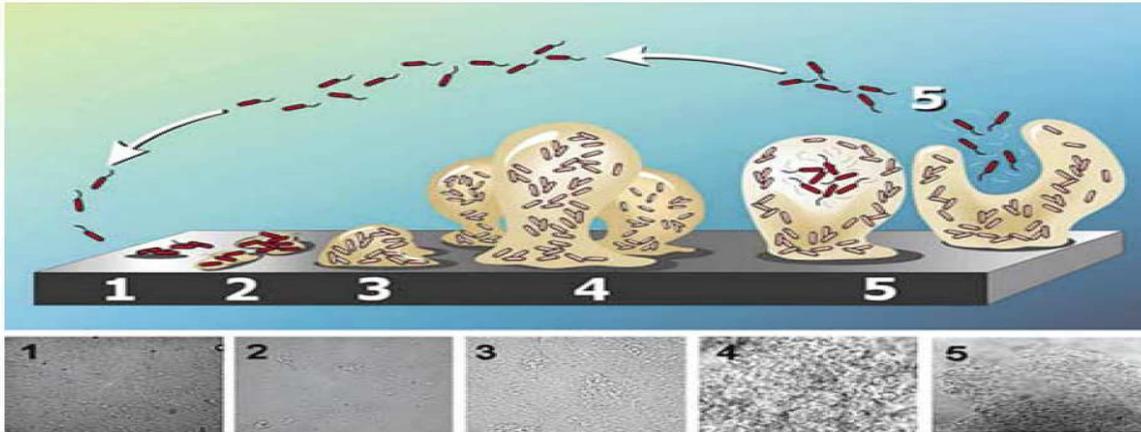


Figura 5. Eventos en el desarrollo de una biopelícula (Balaban et al. 2007).

Durante la fase de acondicionamiento, los componentes orgánicos del medio ambiente o de los tejidos forman una cubierta que neutraliza la carga excesiva de la superficie (que previene la aproximación entre células bacterianas o de hongos) (Marshall, 1992).

### 2.6.2 Heterogeneidad de las biopelículas.

El estudio de estas biopelículas ha demostrado que se componen de 97% de agua, el resto son células microbianas y productos derivados de éstas. Se ha reportado que son estructuras heterogéneas con tres patrones químicos, que corresponden a diferencias en gradientes de concentraciones desde el exterior al interior de la biopelícula. El patrón de sustrato metabólico determina mayor concentración en el exterior y menor en el interior, el patrón de producto metabólico es inverso al anterior y el patrón de intermediarios metabólicos muestra mayor concentración entre la parte limítrofe de la biopelícula en la fase acuosa. Estos patrones traen como consecuencia que dentro de estas estructuras se establezcan diferencias de gradientes de pH y oxigenación, lo que permite que se instalen poblaciones microbianas aerobias, anaerobias o facultativas dentro de los diferentes estratos de la biopelícula, así como poblaciones microbianas que pueden considerarse para entender las diferencias de susceptibilidad al

tratamiento con antibióticos, ya que es diferente la respuesta a las formas libres (planctónicas) que a las adheridas (sésiles). (O'toole y Kolter, 2000).

En consecuencia, las principales características de las biopelículas son: adherencia, heterogeneidad, diferentes microambientes (pH, oxígeno, concentración de iones, carbono, nitrógeno, etcétera), sistema circulatorio primitivo (canales de agua), resistencia a la defensa del hospedero, agentes antimicrobianos y biocidas y autoinducción (*quorum sensing*). (O'toole y Kolter, 2000).

## 2.7. OPUNTIA IMBRICATA.

### 2.7.1. Descripción.

Es un arbusto hasta de 5 m de altura con ramas más o menos abundantes; tronco corto, leñoso, bien definido, de unos 10 cm de diámetro, del que parten una ramas primarias escasas, muy largas, casi tan gruesas como el tronco, las que a su vez producen varias series de segmentos dispuestos en pseudoverticilos; segmentos de 12 a 35 cm de largo y de unos 2.5 a 3.5 cm de diámetro; tubérculos dispuestos en 3 ó 4 series, muy prominentes, de 2 a 3.5 cm de largo; hojas subuladas, de 1-2.5 cm de largo, caducas (Figura 6. A, B, (Scheinvar, 1999).

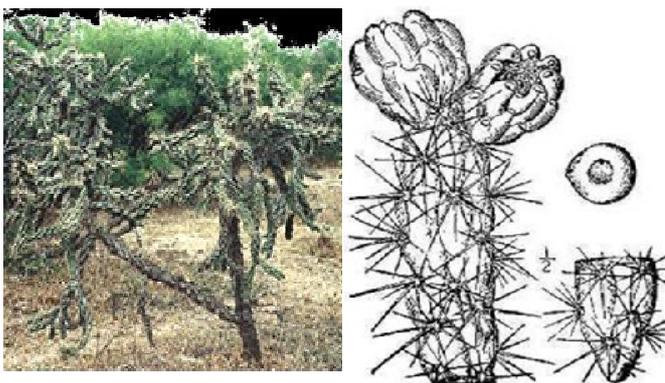


Figura 6. *Opuntia imbricata* sp. **A.** Arbusto. **B.** Areolas.

### **2.7.2. Manejo.**

Areolas grandes con glóquidas escasas; espinas numerosas, 10-30 por areola, extendidas en todas direcciones, rectas, de 1-3 cm de largo, de color rojizo moreno hasta rosadas, casi aciculares pero algo aplanadas, fuertemente barbadas, con vainas blanquecinas, papiráceas y persistentes. Flores numerosas en la extremidad de las ramas, de 5-7 cm de diámetro, de color púrpura a púrpura rozado; pericarpelo tuberculado; segmentos del perianto angostamente obovados, de 2.5-3.5 cm de largo y 1.5-2 cm de ancho; ápice ampliamente redondeado, entero o algo crenado, ondulado. Fruto tuberculado, amarillo, carnoso cuando madura, sin espinas, ovoide de 2.5-4.5 cm de largo y 2-3 cm de diámetro, muy umbilicado, persistente en el invierno. Semillas abundantes, lisas, de 2.5-3.5 mm de diámetro (Bravo-Hollis, 1991).

La multiplicación y reproducción se consigue por los artículos (partes de areolas) de las ramas que caen en la época de sequía y enraízan en temporada de lluvia. Su aprovechamiento está regulado por las normas NOM-005-RECNAT-1997 y NOM-007-RECNAT. (Borrego y Burgos, 1986)

### **2.7.3. Distribución de la especie forrajera.**

*O. imbricata*. (Nopal coyonoxtle, xoconoxtle, cardenche o choya) exhibe una gran variabilidad y se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, Chihuahua, Aguascalientes, Durango, Jalisco y Guanajuato. Crece bien en suelos relativamente pobres y es una planta invasora típica de pastizales con manejo deficiente. Usado como forraje de cabras y ovejas después de chamuscar las espinas *in situ* (Glanze y Wernger, 1981).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.**

La presente investigación fue realizada en el laboratorio de Producción Animal perteneciente al Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”; así como también en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

#### **3.2 MATERIALES.**

##### **3.2.1 Equipo.**

- Reactores Bach esterilizados.
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml.
- Jeringas de 3 ml.
- Viales plásticos de 3 ml.
- Centrifuga para viales.
- Micro pipetas para cromatografo.
- Cromatografo de gases para determinación de metano.
- Cromatografo de gases para determinación de ácidos grasos (Perkin-Elmer).
- Balanza analítica.
- Baño maría con capacidad de 5 litros y con control de temperatura.
- Estufa de laboratorio con regulador de temperatura.
- Refrigerador.

##### **3.2.2 Material químico y biológico.**

- Líquido ruminal extraído de animal fistulado.
- Saliva artificial la cual esta conformada de los siguientes reactivos químicos:

Solución 1:

-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 3.7 g.

-Na HCO<sub>3</sub> 9.8 g.

-Agua destilada a 40°C 1000 ml

Solución 2:

-Na Cl 4.7 g.

-KCl 5.7 g.

-CaCl<sub>2</sub> 0.4 g.

-MgCl 0.6 g.

-Agua destilada 100 ml.

- Alimento: 50% maíz y 50% alfalfa (molido)
- Coyonoxtle deshidratado: trozos de 3 cm y trozos de 1.5 cm.
- Coyonoxtle con biopelícula de microorganismos.

### 3.3 METODOLOGÍA.

#### 3.3.1 Preparación de los reactores.

Los reactores y su contenido a evaluar quedaron distribuidos en el siguiente cuadro (cuadro 2):

| REACTOR | CARACTERÍSTICAS            |
|---------|----------------------------|
| 1       | CyE*(b*)+LR*+1g Sustrato   |
| 2       | CyE*(b*)+LR*+1g Sustrato   |
| 3       | CyT*(b)+LR+1g sustrato     |
| 4       | CyT*(b)+LR+1g sustrato     |
| 5       | CyE(sin b*)+LR+1g sustrato |
| 6       | CyE(sin b*)+LR+1g sustrato |
| 7       | CyT(sin b)+LR+1g sustrato  |
| 8       | CyT(sin b)+LR+1g sustrato  |

\*CyE= coyonoxtle entero, \*b= biopelícula, \*LR= Líquido ruminal, \*CyT= coyonoxtle entero, \*sin b= sin biopelícula

Cuadro 2.- Distribución de los reactores de prueba.

### **3.3.2 Obtención de líquido ruminal.**

Para obtener la muestra de líquido ruminal se utilizó un toro fistulado del rumen el cual esta alojado en la unidad metabólica del Departamento de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; para la obtención de dicho líquido, previamente el animal debe de quedar dietado por aproximadamente 12 horas previas, durante este período solo tendría a su disposición agua a libre acceso; señalando que la dieta de este torete era a base de heno de alfalfa.

La extracción se realizó al siguiente día para lo cual era necesario sujetar al animal en una prensa y tener preparado previamente un termo con agua caliente, un embudo de boca ancha y tela de algodón porosa, posteriormente se procedió a realizar la extracción del líquido ruminal de la siguiente forma: destapar la tapa de la fistula y con una mano enguantada sacar parte del contenido ruminal lo más rápido posible y depositar en la tela colocada en el embudo y se procedía a exprimirlo para que el líquido cayera en el termo para así conservar su temperatura que debe ser aproximadamente de 38 a 40 °C, y así sucesivamente hasta completar medio litro de líquido.

Posteriormente el líquido colectado fue llevado al laboratorio y proceder a mezclarlo con la saliva artificial.

### **3.3.3 Preparación de la saliva artificial.**

Para la preparación de la saliva artificial Mc Dougal se procedió de acuerdo a técnica descrita por Tejada (1992) la cual menciona que la solución amortiguadora se prepara adicionando 100 ml de la solución 2 a 1 litro de la solución 1. Se agita la mezcla con agitador durante 15 minutos, durante ese tiempo se le burbujea CO<sub>2</sub>.

### **3.3.4 Preparación de la mezcla de saliva artificial y líquido ruminal.**

Para dicha preparación se tomaron 250 ml de líquido ruminal los cuales se adicionaron en un litro de saliva artificial, todo esto lo mas rápido posible para

mantenerlo a la temperatura de 38 a 40°C para así proceder al llenado de los reactores.

### 3.3.5 Preparación del Coyonoxtle.

En la estufa a una temperatura controlada de 80 °C fueron colocados trozos grandes de Coyonoxtle de aproximadamente 10 gramos y trozos pequeños de aproximadamente 5 gramos, a los cuales se procedió a extraerles el mayor contenido de humedad por aproximadamente 24 horas para posteriormente algunos de ellos ser utilizados en la preparación de la biopelícula adherida a dicho Coyonoxtle (soporte).

### 3.3.6 Formación de la biopelícula en trozos de Coyonoxtle.

Para permitir la formación de la biopelícula en los trozos de Coyonoxtle se procedió a colocar varios trozos de Coyonoxtle de diferentes pesos en un reactor con líquido ruminal y saliva artificial en proporción 1:4 con 0.5 gramos del sustrato (50% alfalfa, 50% maíz) en medio anaerobio para lo cual se adicione CO<sub>2</sub> (gas) para desplazar el oxígeno, posteriormente se selló el reactor y se colocó en estufa a 40°C por 22 días teniendo dos agitaciones leves por día (mañana y tarde). La formación de la biopelícula en el Coyonoxtle se puede apreciar en las siguientes figuras (Fig. 7):

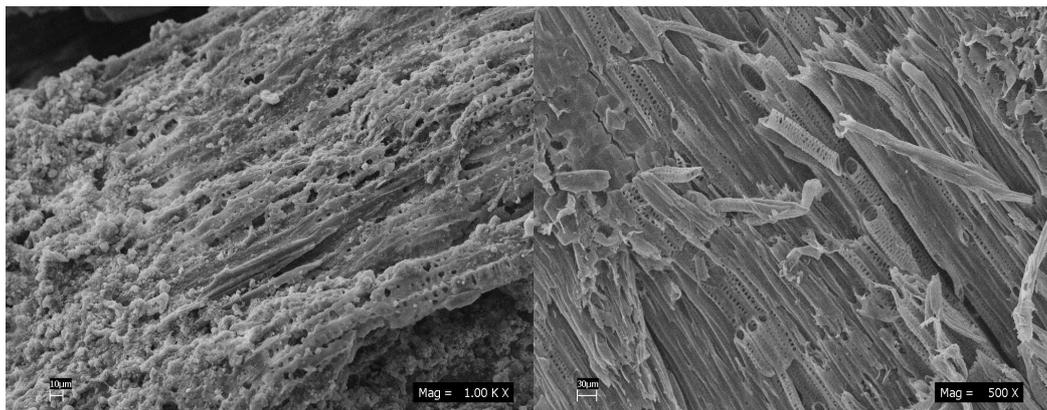


Figura 7. Formación de la biopelícula en el soporte.

### **3.3.7 DESARROLLO DE LA CINÉTICA.**

#### **3.3.7.1 Preparación de los reactores.**

Se colocaron en cada uno de los reactores de prueba 1 gramo del sustrato (50% alfalfa y 50% maíz), a los cuales se les adiciono 100 ml del preparado de líquido ruminal y saliva artificial, posteriormente se agregó el Coyonoxtle entero y en trozos con y sin biopelícula formada; antes de sellarlos herméticamente se desplazó el oxígeno con gas de CO<sub>2</sub> a cada uno de los reactores, así mismo se hizo un muestreo previo para medir pH y así proceder a su sellado. Posteriormente fueron colocados a baño maría a una temperatura de 39-40°C con agitación muy leve.

#### **3.3.7.2 Tiempos de muestreo para determinación de metano y ácidos grasos volátiles (AGV).**

Metano: 0, 24, 48, y 72 horas.

AGV's: 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

#### **3.3.7.3 Extracción de muestras para evaluación de metano y AGV's.**

Metano: Fueron sacados cada uno de los reactores del baño maría para proceder a hacer la determinación de metano lo cual consistía en extraer de la fase gaseosa directamente del reactor 25 micro litros utilizando una micro jeringa especial de 100 micro litros para cromatografo de gases.

AGV's: Se saco cada reactor del baño maría y con una jeringa de 3 ml fue extraído 0.5 ml de liquido sobrenadante del reactor y se colocaron en viales plásticos cada uno de los reactores, al terminar el total de los reactores los viales fueron colocados a refrigeración (5°C) hasta su posterior lectura.

#### **3.3.7.4 Determinación de metano.**

Para la determinación del metano se utilizó un cromatografo de gases Varian Star para lo cual de la fase gaseosa extraída con la micro pipeta en cada uno de los reactores de prueba fue inyectado directamente en le cromatografo para evaluar los picos de producción de metano.

Considerar que No debe de haber humedad en la jeringa por que puede generar falsas lecturas.

Los picos de producción del metano se dieron en milivolts/segundo los cuales posteriormente se convirtieron a concentración de metano en cada muestra por cada tiempo.

Formula de conversión: g/lts de metano= volts+0.0177/25622x40000

#### **3.3.7.5 Determinación de ácidos grasos volátiles.**

Para realizar esta determinación los viales de extracción del sobrenadante de cada uno de los reactores que fueron guardados en le refrigerador fueron sacados y puestos a temperatura ambiente. Una vez realizado esto se procedía a someterlos a centrifugación para evitar restos de partículas al inyectar en el cromatografo.

Dicha centrifugación se realizó en un centrifuga especial a 2000rpm por 10 minutos. Del sobrenadante líquido (sin restos de partículas) se tomo 1 micro litro de cada vial y se inyecto directamente en el cromatografo de gases (Perkin-Elmer).

La calibración del aparato consistía en introducir los siguientes datos:

Prog oven: 150°C

Inyector: 250°C

Detector: 200°C

Tiempo de corrida: 9.5 minutos.

Una vez programado el aparato se procedía a inyectar la muestra de cada uno de los reactores, hasta terminar la corrida y apreciar los picos de producción de los ácidos grasos (ácido acético, ácido propionico y ácido butírico), en este orden de aparición, en una concentración de miligramos/litro.

### 3.3.7.6 Variables a evaluar.

- Cinética de producción de metano a: 0, 24, 48 y 72 horas
- Cinética de producción de AGV's a: 0,24,48, 72 y 96 horas
  - Producción de ácido acético
  - Producción de ácido propionico
  - Producción de ácido butírico.

### 3.4 Diseño Estadístico.

El diseño utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial de 2 por 2 con igual número de repeticiones, es decir; dos niveles del Factor A y dos del B, respectivamente.

$$Y_{ijk} = M + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = respuesta

M = Media

$A_i$  = niveles del factor A

$B_j$  = niveles del factor B

$AB_{ij}$  = interacción de niveles del factor A con niveles del factor B.

$e_{ijk}$  = error experimental.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados de este trabajo de investigación para la producción de cada uno de los ácidos grasos volátiles y metano se señalan a continuación:

### 4.1 Ácido acético:

El ácido acético es el principal producto de la digestión de los carbohidratos en los rumiantes, ya que es el único ácido graso volátil que se encuentra en la sangre en cantidades significativas. Muchos tejidos lo usan como fuente de energía, también funciona como la principal fuente de acetil-CoA para la síntesis de lípidos, al ácido acético también le corresponde un papel primordial en la síntesis de la grasa de la leche, siendo las fracciones destinadas a la formación de caseína y lactosa (Kaneko et al., 1997).

En el cuadro 1A se presenta el análisis de varianza para la variable ácido acético y se aprecia que tanto el factor A (Coyonoxtle entero y en trozos), como el factor B (con y sin biopelícula) así como la interacción AB son altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ). Lo anterior es soportado por la medias de tratamiento ilustrado en los cuadros presentados en el apéndice (1A).

Así mismo en la figura 8 se puede observar las diferentes combinaciones de tratamiento de los factores A y B y sobresalen para la variable ácido acético, las combinaciones de tratamiento Coyonoxtle entero y Coyonoxtle en trozos con y sin biopelícula, destacándose en estos el Coyonoxtle entero sin biopelícula que tiene una respuesta superior a las 96 horas de exposición.

Es de importancia señalar que estas tres combinaciones de tratamiento empezaron una respuesta importante a partir de las 72 horas. Sin embargo esta significancia manifiesta a las 96 horas es probable que se deba a una acumulación del ácido acético producido, siendo que los tiempos de 24 a 48 horas son los de importancia para la producción y aprovechamiento por el animal apreciándose un incremento en producción para el CyT sin biopelícula (20.08 mM/l) y CyT con

biopelícula (18.67mM/l) a las 48 horas (Fig. 8), lo cual refleja que la estabilidad de los microorganismos en la biopelícula no fue suficiente para marcar una mayor producción del ácido acético a este tiempo.

Producción de ácido acético en dieta.

| muestra     | 0 hrs | 24 hrs | 48 hrs | 72 hrs | 96 hrs |
|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| CyE+lr+d    | 2.27  | 11.44  | 11.30  | 16.51  | 29.17  |
| CyE(b)+lr+d | 2.64  | 5.20   | 14.44  | 16.02  | 7.71   |
| CyT+lr+d    | 2.90  | 19.25  | 20.08  | 17.42  | 23.99  |
| CyT(b)+lr+d | 2.27  | 5.18   | 18.67  | 16.97  | 26.28  |

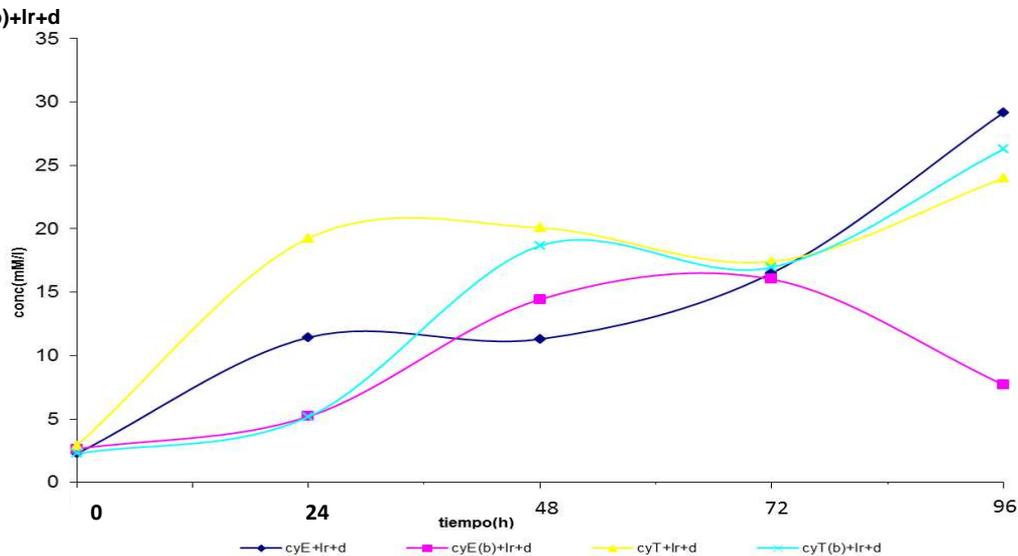


Figura 8. Producción de ácido acético para 50% maíz- 50% alfalfa con y sin biopelícula de microorganismos ruminales

#### 4.2 Ácido propionico.

El ácido propionico es capaz de convertirse en glucosa, por tal motivo es bueno en la producción de carne pero no en la síntesis de leche (cuando los niveles de ácido propionico en vacas lecheras aumentan, se pueden presentar problemas disminuyendo el % de grasa en la leche) (Juárez, 2004).

Por lo que respecta a otro de los componentes de los ácidos grasos volátiles (agv's), puede apreciarse en el Cuadro 2A el análisis de varianza para la variable

ácido propionico, destacando que los niveles del factor A fueron no significativos, mientras que la respuesta de los niveles del factor B así como la interacción AB fueron altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ), lo anterior es soportado por la respuesta de las medias de tratamiento presentadas en los cuadros del apéndice 2A.

#### Producción de ácido propionico en dieta

| muestra     | 0 hrs | 24 hrs | 48 hrs | 72 hrs | 96 hrs |
|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| CyE+lr+d    | 0.00  | 8.91   | 11.43  | 18.05  | 22.12  |
| CyE(b)+lr+d | 0.12  | 8.29   | 9.45   | 11.03  | 6.26   |
| CyT+lr+d    | 0.00  | 10.23  | 19.56  | 23.75  | 15.99  |
| CyT(b)+lr+d | 0.00  | 2.46   | 14.66  | 10.65  | 17.01  |

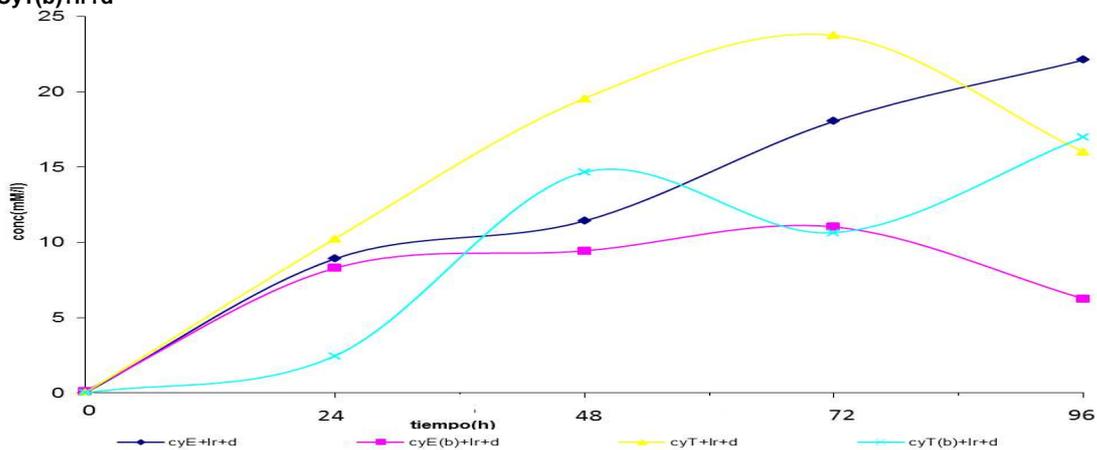


Figura. 9. Producción de ácido propionico Producción para 50% maíz- 50% alfalfa con y sin biopelícula de microorganismos ruminales

Por otro lado, es importante resaltar que las mejores combinaciones de tratamiento lo fueron Coyonoxtle entero sin biopelícula y Coyonoxtle en trozos con biopelícula, además que las máximas respuestas se observaron a las 72 horas y solo el tratamiento Coyonoxtle entero sin biopelícula mantiene la superioridad en relación al resto de tratamientos a las 96 horas (Figura 9).

Con relación a la producción de ácido propionico tal y como se aprecia en el cuadro 2A y figura 9 la mayor producción se observa a las 72 horas para las 2

presentaciones de coyonoxtle, en ambos casos sin biopelícula en ellos, sin embargo; en el lapso de 24 a 48 horas que es el tiempo de digestión en el rumiante se observa el incremento en producción de ácido propiónico para el soporte en trozos sin biopelícula (19.56 mM/min) a 48 horas y para el soporte en trozos con biopelícula (14.66 mM/min) a 48 horas; de igual manera se refleja que no hubo la suficiente estabilidad de los microorganismos adheridos al coyonoxtle para mejorar la producción de este ácido.

#### **4.3 Ácido butírico:**

El ácido butírico es muy importante para el rumiante debido a que es absorbido en forma de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, es oxidado en muchos tejidos para la producción de energía, es uno de los productos iniciales para la síntesis de grasas corporales y de la leche, es importante en la síntesis de los tres principales componentes de la leche. (Kaneko et al., 1997).

Otro de los ácidos importantes que proveen de energía para el buen funcionamiento del rumen, lo es el ácido butírico, de tal forma que el análisis de varianza para tal variable es presentada en el cuadro 3A. Se aprecia que para ambos factores A y B hubo una falta de significancia, sin embargo si la hay para la interacción de los factores AB ( $P \leq 0.05$ ). Así lo corroboran la estrecha diferencia entre medias de tratamiento y para el caso de la interacción se confirma la diferencia en la respuesta en magnitud del nivel 1 del Factor A con el nivel 2 del Factor B con relación a los otros niveles presentados en los cuadros del apéndice (3A).

Una respuesta similar de las combinaciones de tratamiento de los ácidos grasos volátiles (agv's) anteriores fue observado para el ácido butírico (figura 10), en la cual se puede observar que la máxima respuesta de los tratamientos la alcanzaron a las 96 horas, posteriormente el que mantuvo la más alta concentración de ácido butírico fue el Coyonoxtle entero sin biopelícula, le siguieron el Coyonoxtle en

trozos con y sin biopelícula y el que tuvo la mas baja respuesta fue la combinación Coyonoxtle entero con biopelícula.

Se observa en la siguiente figura (Fig.10) que a 24 horas hay una tendencia a mayor producción de ácido butírico para el soporte entero con biopelícula (14.29 mM/l) así como para el soporte en trozos son biopelícula (12.49 mM/min) manteniéndose este ultimo con mayor producción a las 48 horas (16.11 mM/min); igualmente a los anteriores ácidos se refleja que el tratamiento de estabilizar los microorganismos ruminales en una biopelícula formada en un soporte no marco la diferencia para los resultados obtenidos en ácido butírico.

Producción de ácido butírico en dieta.

| muestra     | 0 hrs | 24 hrs | 48 hrs | 72 hrs | 96 hrs |
|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| CyE+lr+d    | 0.14  | 7.78   | 9.41   | 17.02  | 18.50  |
| CyE(b)+lr+d | 0.68  | 14.29  | 10.00  | 12.96  | 7.89   |
| CyT+lr+d    | 0.12  | 12.49  | 16.11  | 17.72  | 11.25  |
| CyT(b)+lr+d | 0.45  | 4.18   | 12.70  | 8.81   | 14.29  |

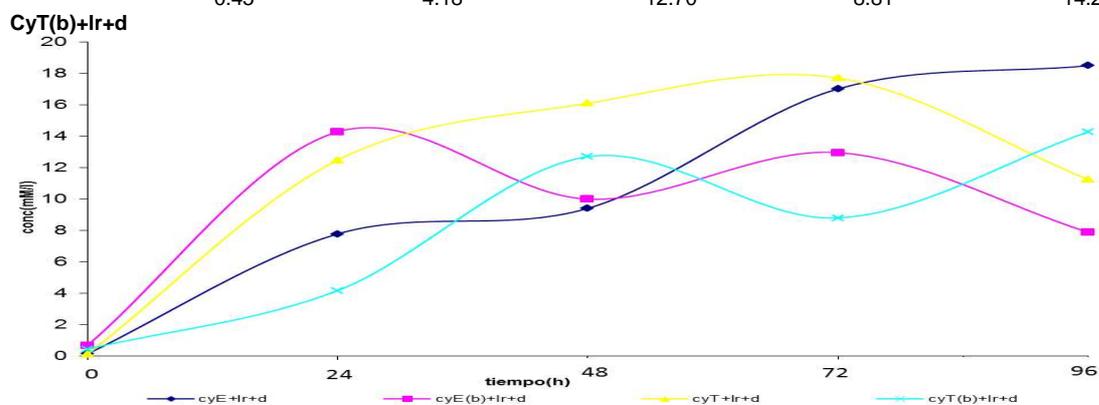


Figura. 10 producción de ácido butírico para 50% maíz- 50% alfalfa con y sin biopelícula de microorganismos ruminales

#### 4.4 METANO:

Uno de los productos terminales de la fermentación y que además es nocivo para el buen funcionamiento del rumen (Owens y Goetsch, 1986), lo es el metano esta variable muestra una alta significancia ( $P \leq 0.01$ ) en su análisis de varianza en los

niveles del Factor B, tanto a las 24 horas como a las 72 horas (Cuadro 4A respectivamente)

#### Producción de metano en dieta

| muestra     | 0 hrs | 24 hrs | 48 hrs | 72 hrs |
|-------------|-------|--------|--------|--------|
| CyE+lr+d    | 0.00  | 10.08  | 33.84  | 49.63  |
| CyE(b)+lr+d | 0.00  | 36.53  | 60.21  | 73.73  |
| CyT+lr+d    | 0.00  | 5.41   | 26.55  | 31.98  |
| CyT(b)+lr+d | 0.41  | 36.66  | 62.37  | 105.00 |

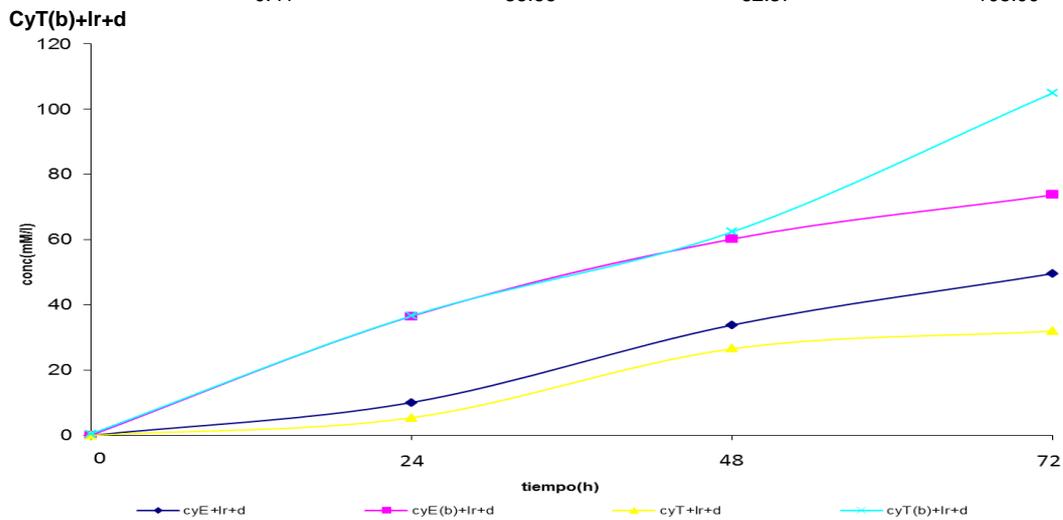


Fig. 11. producción metano para 50% maíz- 50% alfalfa con y sin biopelícula de microorganismos ruminales

Las combinaciones de tratamiento que mostraron las mas bajas concentraciones de metano, lo fueron Coyoxtle en trozos y Coyoxtle entero ambos sin biopelícula; el que tuvo la concentración mas alta de metano fue Coyoxtle en trozos con biopelícula (Figura 11).

Estos resultados indican que los microorganismos presentes en el líquido ruminal y posteriormente adheridos a la biopelícula quizá predominaban las bacterias metanogénicas dando como resultado un incremento en la producción de metano.

#### 4.5 TOTAL DE ACIDOS GRASOS VOLATILES EN DIETA.

La respuesta al total de los ácidos grasos volátiles (agv's) se puede ver en la Figura 12 y en los cuadro 5A cuyo comportamiento es muy similar a las combinaciones de tratamiento de los tres ácidos anteriores (acético, propionico y butírico).

Indicando de nuevo que la producción de ácidos grasos volátiles es mayor en los casos donde no fue formada la biopelícula de microorganismos; lo cual refleja que es probable que se requiera de un mayor tiempo de formación de la biopelícula de microorganismos ruminales.

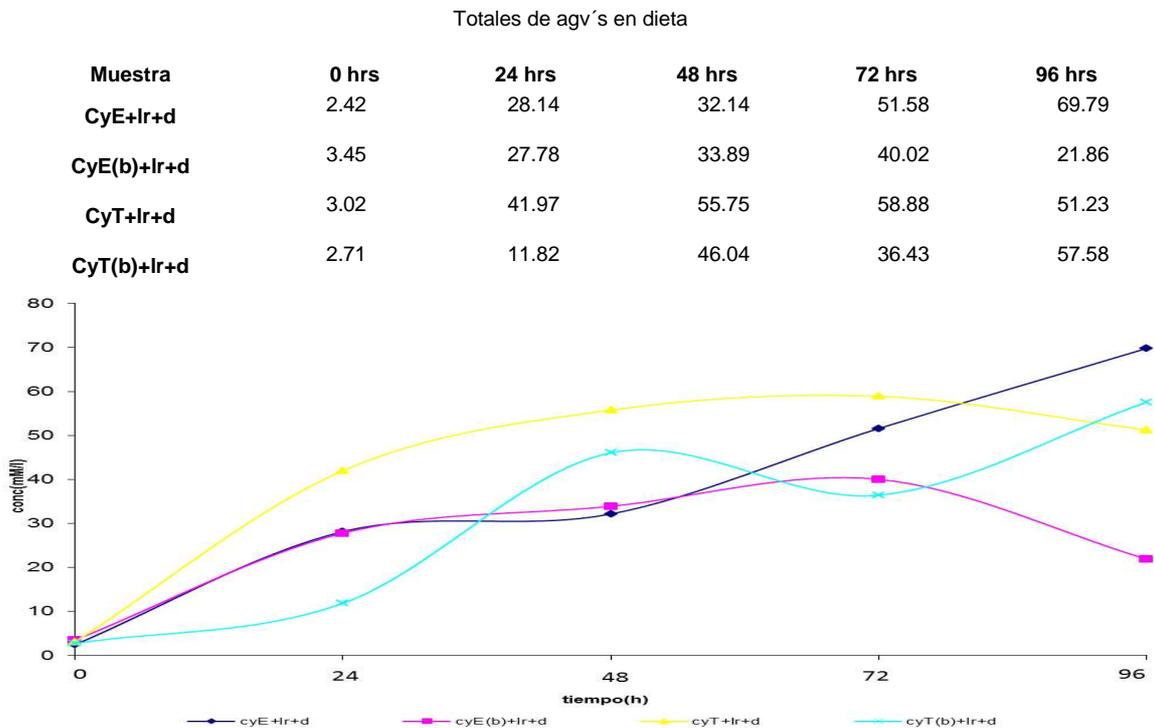


Fig. 12. Producción total de ácidos grasos volátiles para 50% maíz- 50% alfalfa con y sin biopelícula de microorganismos ruminales

## V. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo pueden interpretarse como sigue:

1. Hasta 96 horas es cuando se observa una diferencia de ácido acético para Coyonoxtle en trozos con biopelícula y Coyonoxtle entero sin biopelícula.
2. La variable ácido propionico siguió la misma tendencia que el ácido acético, ya que la mayor diferencia se obtuvo a las 96 horas sobresaliendo Coyonoxtle en trozos y entero sin biopelícula y Coyonoxtle en trozos con biopelícula.
3. Por lo que se refiere al ácido butírico la mayor respuesta se obtuvo también a las 96 horas sobresaliendo Coyonoxtle en trozos y entero sin biopelícula.
4. A las 24 horas y 72 horas hay una producción importante de metano para Coyonoxtle entero y en trozos con biopelícula.
5. De los totales de ácidos grasos volátiles (AGV'S) las mejores combinaciones de tratamiento fueron Coyonoxtle en trozos y entero sin biopelícula y Coyonoxtle entero con biopelícula con una diferenciación hasta las 96 horas.

De manera general se puede concluir para esta investigación que se requiere investigar mas a fondo sobre la formación de las biopelículas de microorganismos ruminales en soportes naturales, ya que según la literatura (Cobos, 2002) es difícil aislar los microorganismos presentes en el rumen.

La baja actividad amilolítica y celulolítica de las bacterias, puede estar directamente relacionada con el tipo de sustrato y los medios de cultivo empleados para los análisis; ya que estos no incluyen todas las condiciones fisicoquímicas y nutritivas presentes en el rumen. Además de la falta de interacción con otros microorganismos que estimulan la actividad de las bacterias (Guerrero, 2011).

## VI. LITERATURA CITADA.

- Allen, S, H. G., R. W. Kellermeyer, R. L. Sto Jernholm and F. G Wood. 1964. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation J. Bact. 87: 171-178.
- Anderson, K.L., T.G. Nagaraja, y J.L. Morril. 1987. Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. J. Dairy Sci. 70: 1000-1005.
- Annison, E.F. 1965. Physiology of the digestion in the ruminant. Butterworth, London. 1a Ed.
- Annison, E. F. and D. Lewis. 1996. METABOLISM IN THE RUMEN. London 1ra. Edición, Pp. 10-18.
- Armstrong, D.G. 1960. Colorimetric determination of the net energy value of dried S-23 ryegrass at four stages of growth. Proc. 8th Intl. Grassland Congr.
- Ayers, W.A. 1959. Phosphorolysis and synthesis of cellobiose by cells extracts from Ruminococcus flavefaciens. J. Biol. Chem. 234: 2811-2819.
- Balaban N, Ren D, Givskov M, Rasmussen TB. 2008. Introduction. In: Control of biofilm infections by signal manipulation. Balaban N, Ed. Springer Serieson Biofilms 2 USA, 1-11.
- Balch, C.C. y S.J. Rowlan. 1957. Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of cows receiving of variety of diets. Brit. J. Nutr. 11: 288-293.
- Baldwin, R.L. 1965. Physiology of digestion in the ruminant. 1a Ed, Butterworth, Inc. London.
- Barcroft, J., R.A. McAnally y A.T. Phillipson. 1944. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. J. Explt. Biol. 20: 120-126.
- Barker, H.A. 1961. The bacteria 2: 151 1a. Ed. Academic Press, New York.
- Borrego, E. F., V. N. Burgos. 1986. *El Nopal*. Saltillo: Ed. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. p.145.
- Bravo-Hollis, H. 1991. *Las cactáceas de México*. Volumen III, México, D.F.: UNAM. 643pp.
- Bryant, M.P. and L.A. Burkey. 1953. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cow fed different rations. J. Dairy Sci. 36:218-224.

- Bryant, M.P., N. Small, C. Bouma e I. Robinson. 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.* 41: 1747-1767.
- Bryant, M.P. 1963. Symposium on microbial digestion in ruminant: Identification of groups of anaerobic bacteria active in the rumen. *J. Anim. Sci.* 22:801-813.
- Castle, M.; Watkins, P. 1988. Producción lechera moderna. Principios y aplicaciones para estudiantes y ganaderos. Zaragoza: Acribia.
- Chesson, A. y C.W. Forsberg. 1988. Polysaccharidae degradation by rumen microorganisms. Ed. Elsevier Applied Science, New York.
- Church D. 1993. Fisiología digestiva y nutrición: Zaragoza.
- Church, C.D. 1988. El ruminante, fisiología digestiva y nutrición.
- Chmielewski, R.N.A. y J.F. Frank. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp. Rev. Food Sci. and Food Saf.* 2: 22-32.
- Cook, R.M. y L.D. Miller. 1965. Utilization of volatile fatty acids in ruminants. 1. Removal of the from portal blood by the liver. *J. Dairy Sci.* 48: 1339-1345.
- Corbett, J.L. 1969. Nutrition of animals of agricultural importance. 1a. Ed. Pergamon Press.
- Cobos, P. M. A. 2002. Interacciones entre microorganismos ruminales. In: *Microbiología Agrícola para el Siglo XXI*. Ferrera-Cerrato R. (ed.). MundiPrensa, México, D. F. (en prensa).
- Costerton, J.W. Overwiev of microbial biofilms. *J. Indus. Microbiol.* 15: 137-140, 1995.
- Cuauhtémoc N. C. y A. Díaz, 2001. Introducción a la Digestión Ruminal. Departamento de Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- Cronje, P.B. 2000. Ruminant physiology: Digestion metabolism, growth and reproduction.
- Devant, M., A. Ferret, J. Gasa, S. Calsamiglia, y R. Casals. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78: 1667-1676.
- Denton, D.A. 1957. *Quart J. exp. Physiol.* 42, 72. *And Nature, Lond.* 179, 341.

- Dukes, H. H. 1955. *The Physiology of Domestic Animals*: 7<sup>th</sup> Ed: Cornell University Press.
- El Shazly, K. 1952. Degradation of protein in the rumen of sheep. *Biochem. J* 51:647-653.
- Eadie, J.M. 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. Gen. Microbiol.* 29: 563-578.
- *Ecología Nutricional Del Rumiante*. O & B Books Inc. 1982. , 1215 NW Kline Place, Oregon 97330.
- Firkins, J.L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.* 126: 13475-13545.
- Forrest, W.W. y D.J. Walker. 1971. *Advances in microbial physiology*. 1a. Ed, Academic Press, New York.
- George M. Kamande y Diamond V. Mills, 2006. Congreso de Forrajes. *Producir XXI*, Bs. As., 15(180):52-57.
- Glanze, P. y Wernger, E. 1981. Distribution of *Opuntia* spp. and their evaluation as feed. *Beitrage Zur Tropischen Landwirtschaft und Veterinarmedizin*, 19: 49-58
- Goetsch, A. L. and F. N. Owens. 1986. Effects of dietary nitrogen level and ileal antibiotic administration on digestion and passage rates in beef heifers. I. High-concentrate diets. *J. Anim.Sci.* 62:830.
- Guerrero, C.A.C. 2011. Aislamiento de bacterias ruminales degradadoras de celulosa. Universidad Politécnica Salesiana, Tesis de pregrado, Ecuador. 2011.
- *Hardy, J. A. 2011. Que es un rumiante*. Escuela de Ciencias Sociales, Artes y Humanidades, Universidad de las Américas Puebla. Mayo.
- Heuter, F.G., J.C. Shaw y R.N. Doetsch. 1956. Absorption and dissimilation of lactates added to the bovine rumen and the resulting effects on blood glucose. *J. Dairy Sci.* 39: 1430-1437.
- Hino, T. y J.B. Russell. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cells extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 168-1374.
- Holah, J.T. y I.R. Kearney. 1992. *Introduction to biofilms in the food industry*. Biofilm-Science and technology. Kluver Academic Press.

- Hungate, R.E. 1996. The rumen and its microbes. 1a. Ed. Academic Press, New York.
- Juárez, F.I. 2004. Biohidrogenación ruminal. Principios de nutrición en rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México.
- Kaneko, J.J., J.W. Harvey y M.L. Bruss. 1997. Clinical biochemistry of domestic animal. Ed. Academic Press. San Diego.
- Knox, K.L. y G.M. Ward. 1961. Rumen concentrations of rumen volatile fatty acids as affected by feeding frequency. J. Anim. Sci. 44:1550-1553.
- Lindsay D, von Holy A. 2008. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect, 64: 313-325.
- Marshall, K.C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. Am. Soc. Microbiol. News.
- Marty, R.J. y T.R. Preston. 1970. Proporciones molares de los ácidos grasos volátiles de cadena corta Producidos en el rumen de Ganado vacuno alimentados con dietas altas en miel. Rev. Cubana Cienc. Agric. 4:189-192.
- Meyer, J.H., R. Kroman y W.N. Garrett. 1965. Physiology of digestion in the ruminant. Butterworth, London 1a Ed.
- Moore, L.A. 1964. Nutritive value of forage as affected by physical form. General Principles involved with ruminants and effects of feeding pellet or wafered forage to dairy cattle. J. Anim. Sci. 23: 230-238.
- Nocek, J.E. y S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of Dairy cows and its effects on milk yield and composition. J. Dairy Sci. 74: 3598-3629.
- Orskov, E.R. 1992. Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited. 24-28 Oval Road, London, UK.
- Orskov, E.R. y M. Ryle. 1998. Energy nutrition in ruminants. Chalcombe Publications, UK.
- O'toole, G.A. y R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol.
- Owens, F.N., y R. Zinn. 1988. Metabolismo de la proteína en rumiantes. Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.

- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, y D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Padilla, G.L. y Rodríguez, M.J. 2007. Estudio comparativo de la biodegradación in vitro de alfalfa mediante dos sistemas anaerobios: Líquido ruminal y biopelícula ruminal. XII congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. Morelia, Michoacán. México.
- Pennington, R.J. y W.H. Pfander. 1967. The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. Some interrelationships in the metabolism of fatty acids and glucose by sheep-rumen epithelial tissue. *Biochem. J.* 65: 109-111.
- Reid, J.P. 1970. *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. Oriel Press, 1a. Ed. Pp 8-9.
- Russell, J.B. 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 572-579.
- Russell, J.B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76: 1955-1963.
- Scheinvar L. 1999. *Biosistemática de los xococonostles mexicanos y su potencial económico*. In: Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del Nopal. 6-10 de septiembre. San Luis Potosí, México. p. 255-274
- Sellers, A. 1. 1955. *Physiology of digestion in the ruminant*. Butterworth. Lonterwoth, London. 1a. Ed.
- Sokatch, J.R. 1969. *Bacterial physiology and metabolism*. 1a Ed, Academic Press, New York.
- Spicer, L.A., C.B. Theurer, J. Sowe y T.H. Noon. 1986. Ruminal and postruminal utilization of nitrogen and starch from sorghum grain-, corn- and barley-based diets by beefsteers. *J. Anim. Sci.* 62: 521-530.
- Stevens, C.E. 1970. *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. Oriel Press., 1a Ed.
- Swjrsen K., Hvelplund T., Nielsen M.O. 2006. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*.
- Tejada, I. 1992. *Control de calidad y análisis de alimentos para animales*. México.

- Tweedie, J.W., M.G. Rurnsby y J.C. Hawke. 1966. Studies in rumen metabolism V. formation of branched long-chain fatty acids in cultures of rumen Bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 17:241-243.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Corvallis, OR.
- Wallace, R.J. 1983. Breakdown of diazotized proteins and synthetic substrates by rumen bacterial proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 212-217.
- Wallace, R.J. y M.A. Cota. 1988. *Metabolism of nitrogen-containing compounds*. Ed. Elsevier Applied Science, New York.
- Wallnofer, P. y R.L. Baldwin. 1967. Pathway (enzymatic) of propionate formation in *Bacteroides rumenicola*. *J. Bact.* 93: 503-504.
- Warner, A.G. I. 1962. Some factors influencing the rumen microbial populations. *J. Gen. Microbiol.* 28:129-146.
- Whanger, P.D. y G. Matrone. 1967. Metabolism of lactic, succinic and acrylic acids by rumen microorganisms from sheep fed sulfur-adequate and sulfur-deficient diet. *Biochem. Biophys. Acta.* 136: 27-35.
- Wegner, G.H. y E.M. Foster. 1963. Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. *J. Bact.* 85: 53-61.
- Weston, R.H. y J.P. Hogan. 1968. The digestion of pasture plants by sheep. I. Ruminant production of volatile fatty acids by sheep offered diets of rye grass and forage oats. *Aust. J. Agr. Res.* 19: 419-432.
- Williams, V.J., T.R. Hutching y K.A. Archer. 1968. Absorption of volatile fatty acids from the reticulo rumen and abomasum of sheep. *Austral. J. Biol. Sci.* 21:89-96.
- Yokohama, M.T. y K.A. Johnson. 1988. En: D.C. Church (Ed.). Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp: 125-144.

## VIII. APENDICE

**Cuadro 1A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los Factores A y B para la variable ácido acético.**

### ANALISIS DE VARIANZA

| FV          | GL | SC         | CM         | F       | P>F   |
|-------------|----|------------|------------|---------|-------|
| FACTOR A    | 1  | 89.511963  | 89.511963  | 11.8199 | 0.027 |
| FACTOR B    | 1  | 183.55249  | 183.55249  | 24.2378 | 0.009 |
| INTERACCION | 1  | 282.031494 | 282.031494 | 37.2417 | 0.005 |
| ERROR       | 4  | 30.291992  | 7.572998   |         |       |
| TOTAL       | 7  | 585.387939 |            |         |       |
| C.V.        |    | 12.63%     |            |         |       |

### TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR A

| FACTOR A | MEDIA     |
|----------|-----------|
| 1        | 18.442499 |
| 2        | 25.1325   |

### TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR B

| FACTOR B | MEDIA     |
|----------|-----------|
| 1        | 26.577499 |
| 2        | 16.997499 |

### TABLAS DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB

| FACTOR A | FACTOR B  |           | MEDIA                         |
|----------|-----------|-----------|-------------------------------|
|          | 1         | 2         |                               |
| 1        | 29.1700 A | 7.7150 B  | 18.4425 B CyE SIN BIOPELICULA |
| 2        | 23.985    | 26.2800 A | 25.1325 A CyT CON BIOPELICULA |
| MEDIA    | 26.5775 A | 16.9975 B | 21.7875                       |

**Cuadro 2A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los Factores A y B para la variable ácido propionico.**

ANALISIS DE VARIANZA

| FV          | GL | SC         | CM         | F       | P>F   |
|-------------|----|------------|------------|---------|-------|
| FACTOR A    | 1  | 10.671997  | 10.671997  | 2.0829  | 0.222 |
| FACTOR B    | 1  | 110.112793 | 110.112793 | 21.4911 | 0.011 |
| INTERACCION | 1  | 142.467285 | 142.467285 | 27.8058 | 0.008 |
| ERROR       | 4  | 20.494629  | 5.123657   |         |       |
| TOTAL       | 7  | 283.746704 |            |         |       |
| C.V.        |    | 14.75%     |            |         |       |

TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR A TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR B

| FACTOR A | MEDIA     | FACTOR B | MEDIA     |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 1        | 14.190000 | 1        | 19.055000 |
| 2        | 16.500000 | 2        | 11.635000 |

TABLAS DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB

| FACTOR A | FACTOR B  |           | MEDIA                     |
|----------|-----------|-----------|---------------------------|
|          | 1         | 2         |                           |
| 1        | 22.1200 A | 6.2600 B  | 14.19 CyE sin biopelícula |
| 2        | 15.9900   | 17.0100 A | 16.5 CyT con biopelícula  |
| MEDIA    | 19.0550 A | 11.6350 B | 15.3450                   |

**Cuadro 3A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los Factores A y B para la variable ácido butírico.**

ANALISIS DE VARIANZA

| FV          | GL | SC         | CM        | F       | P>F   |
|-------------|----|------------|-----------|---------|-------|
| FACTOR A    | 1  | 0.365479   | 0.365479  | 0.0444  | 0.836 |
| FACTOR B    | 1  | 28.614624  | 28.614624 | 3.4784  | 0.135 |
| INTERACCION | 1  | 93.093018  | 93.093018 | 11.3164 | 0.029 |
| ERROR       | 4  | 32.905396  | 8.226349  |         |       |
| TOTAL       | 7  | 154.978516 |           |         |       |
| C.V.        |    | 22.10%     |           |         |       |

TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR A TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR B

| FACTOR A MEDIA |           | FACTOR B |  | MEDIA     |
|----------------|-----------|----------|--|-----------|
| 1              | 13.192499 | 1        |  | 14.869999 |
| 2              | 12.764999 | 2        |  | 11.087500 |

TABLAS DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB

| FACTOR A | FACTOR B  |          | MEDIA                       |
|----------|-----------|----------|-----------------------------|
|          | 1         | 2        |                             |
| 1        | 18.4950 A | 7.8900 B | 13.1925 CyE sin biopelícula |
| 2        | 11.2450   | 14.2850  | 12.7650                     |
| MEDIA    | 14.8700   | 11.0875  | 12.9787                     |

**Cuadro 4A. Análisis de varianza para la variable metano a 24 y 72 horas.**

ANALISIS DE VARIANZA metano a 24 horas

| FV          | GL | SC          | CM         | F        | P>F   |
|-------------|----|-------------|------------|----------|-------|
| FACTOR A    | 1  | 10.305908   | 10.305908  | 0.9947   | 0.623 |
| FACTOR B    | 1  | 1664.644775 | 1664.64478 | 160.6632 | 0.001 |
| INTERACCION | 1  | 11.471924   | 11.471924  | 1.1072   | 0.353 |
| ERROR       | 4  | 41.444336   | 10.361084  |          |       |
| TOTAL       | 7  | 1727.866943 |            |          |       |
| C.V.        |    | 14.52%      |            |          |       |

ANALISIS DE VARIANZA metano a 72 horas

| FV          | GL | SC          | CM         | F      | P>F   |
|-------------|----|-------------|------------|--------|-------|
| FACTOR A    | 1  | 92.750000   | 92.750000  | 0.1624 | 0.706 |
| FACTOR B    | 1  | 4718.09375  | 4718.09375 | 8.2602 | 0.045 |
| INTERACCION | 1  | 1196.585938 | 1196.58594 | 2.0949 | 0.221 |
| ERROR       | 4  | 2284.730469 | 571.182617 |        |       |
| TOTAL       | 7  | 8292.160156 |            |        |       |
| C.V.        |    | 36.72%      |            |        |       |

**Cuadro 5A. Análisis de varianza, tablas de medias del factor A y B, así como la interacción de los Factores A y B para la variable ácido grasos volátiles totales.**

ANALISIS DE VARIANZA

| FV          | GL     | SC          | CM         | F       | P>F   |
|-------------|--------|-------------|------------|---------|-------|
| FACTOR A    | 1      | 147.148438  | 147.148438 | 4.0647  | 0.113 |
| FACTOR B    | 1      | 864.238281  | 864.238281 | 23.8729 | 0.009 |
| INTERACCION | 1      | 1472.345703 | 1472.3457  | 40.6707 | 0.004 |
| ERROR       | 4      | 144.806641  | 36.20166   |         |       |
| TOTAL       | 7      | 2628.539063 |            |         |       |
| C.V.        | 12.01% |             |            |         |       |

TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR A

| FACTOR A | MEDIA     |
|----------|-----------|
| 1        | 45.825005 |
| 2        | 54.402500 |

TABLAS DE MEDIAS DEL FACTOR B

| FACTOR B | MEDIA     |
|----------|-----------|
| 1        | 60.507500 |
| 2        | 39.719997 |

TABLAS DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB

| FACTOR A | FACTOR B |         | MEDIA   |
|----------|----------|---------|---------|
|          | 1        | 2       |         |
| 1        | 69.7850  | 21.8650 | 45.8250 |
| 2        | 51.2300  | 57.5750 | 54.4025 |
| MEDIA    | 60.5075  | 39.7200 | 50.1138 |