

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**División de Ciencia Animal**

**Departamento de Producción Animal**



**Efecto de la biopelícula de microorganismos ruminales establecidos en Opuntia imbricata (soporte) en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's) *in vitro***

**Por:**

**REY ELIUD VILLA HERNANDEZ**

**TESIS**

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

**INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila. México**

**Junio del 2013**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Efecto de la biopelícula de microorganismos ruminales establecidos en  
Opuntia imbricata (soporte) en la producción de ácidos grasos volátiles  
(AGV's) *in vitro***

**Presentado por:**

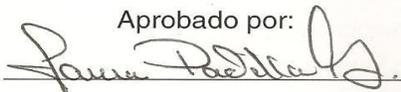
**Rey Eliud Villa Hernández**

**TESIS**

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

**INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA**

Aprobado por:

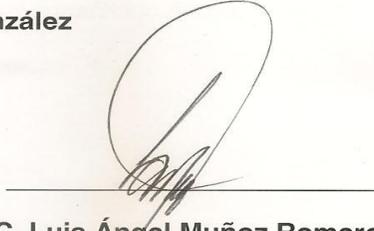


**M.C. Laura E. Padilla González**

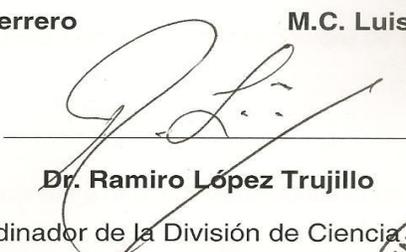
Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Enrique Navarro Guerrero**

Asesor

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Luis Ángel Muñoz Romero**

Asesor

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ramiro López Trujillo**

Coordinador de la División de Ciencia Animal

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013



## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A DIOS.**

*Por bendecir mi camino y nunca soltarme de tu mano, por haberme colmado de suficiente salud y sabiduría para poder llegar hasta donde me encuentro. Gracias infinitas.*

### **A LA UAAAN.**

*¡VIVA LA NARRO!*

### **M.C. LAURA PADILLA.**

*Por la colaboración en este trabajo, por las palabras de aliento, por brindarme su amistad, por las correcciones que solo hicieron que este trabajo fuera un éxito y por darme la oportunidad de ser participe en esta investigación. Gracias por ser parte de mi formación académica.*

### **DR. ENRIQUE NAVARRO.**

*Por brindarme su ayuda desinteresadamente, por proporcionar parte de su tiempo en la elaboración de este trabajo, pero sobre todo por esa amistad que me brindo en toda mi estadía en esta universidad. Gracias por todo le estoy muy agradecido Amigo.*

### **ING. LUIS MUÑOZ.**

*Por la colaboración en este trabajo. Gracias*

### **A MIS PROFESORES.**

*Por formarme y prepararme para poder defender el nombre de esta universidad y seguir con el prestigio.*

### **A MIS AMIGOS.**

*Por estar en todos esos momentos y hacer de la universidad otra familia. Gracias.*

## **DEDICATORIA**

### **DON RAYMUNDO VILLA.**

*Abuelo convertido en mi ÁNGEL. Eres parte de mi éxito te agradezco todas esas enseñanzas que en vida recibí de tu gran sabiduría y que ahora desde el cielo las sigo recibiendo. Misión cumplida.*

### **A MIS PADRES.**

### **SRA.FRANCISCA HERNANDEZ Y SR. JUAN VILLA**

*A quienes la ilusión de mi vida ha sido convertirme en una persona de provecho. Porque solo la superación de mis ideales me ha permitido comprender cada día más la difícil posición de ser padres; mis conceptos, mis valores morales, y mi superación se las debo a ustedes, quiero que se sientan que el objetivo logrado también es de ustedes. MI ADMIRACIÓN, CARIÑO, LOS AMO. ¡SIGUE ADELANTE Y LLEGARAS A LA CIMA!*

### **A MIS HERMANOS.**

*Por ayudarme hacer una mejor persona día a día esto es de ustedes, sin su presencia difícil seria ser quien soy. Les agradezco eternamente. LOS QUIERO MUCHO HERMANOS*

### **A TI AMOR.**

*Para ti el amor de mi vida, chaparrita eres parte de mi vida sabes que este éxito también es tuyo, todas esas tardes haciendo tesis rindió frutos, juntos lograremos todo lo que hemos planeado, tu apoyo es fundamental, nunca cambies. TE AMO.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A DIOS.**

*Por bendecir mi camino y nunca soltarme de tu mano, por haberme colmado de suficiente salud y sabiduría para poder llegar hasta donde me encuentro. Gracias infinitas.*

### **A LA UAAAN.**

*¡VIVA LA NARRO!*

### **M.C. LAURA PADILLA.**

*Por la colaboración en este trabajo, por las palabras de aliento, por brindarme su amistad, por las correcciones que solo hicieron que este trabajo fuera un éxito y por darme la oportunidad de ser participe en esta investigación. Gracias por ser parte de mi formación académica.*

### **DR. ENRIQUE NAVARRO.**

*Por brindarme su ayuda desinteresadamente, por proporcionar parte de su tiempo en la elaboración de este trabajo, pero sobre todo por esa amistad que me brindo en toda mi estadía en esta universidad. Gracias por todo le estoy muy agradecido Amigo.*

### **ING. LUIS MUÑOZ.**

*Por la colaboración en este trabajo. Gracias*

### **A MIS PROFESORES.**

*Por formarme y prepararme para poder defender el nombre de esta universidad y seguir con el prestigio.*

### **A MIS AMIGOS.**

*Por estar en todos esos momentos y hacer de la universidad otra familia. Gracias.*

## **DEDICATORIA**

### **DON RAYMUNDO VILLA.**

*Abuelo convertido en mi ÁNGEL. Eres parte de mi éxito te agradezco todas esas enseñanzas que en vida recibí de tu gran sabiduría y que ahora desde el cielo las sigo recibiendo. Misión cumplida.*

### **A MIS PADRES.**

### **SRA.FRANCISCA HERNANDEZ Y SR. JUAN VILLA**

*A quienes la ilusión de mi vida ha sido convertirme en una persona de provecho. Porque solo la superación de mis ideales me ha permitido comprender cada día más la difícil posición de ser padres; mis conceptos, mis valores morales, y mi superación se las debo a ustedes, quiero que se sientan que el objetivo logrado también es de ustedes. MI ADMIRACIÓN, CARIÑO, LOS AMO. ¡SIGUE ADELANTE Y LLEGARAS A LA CIMA!*

### **A MIS HERMANOS.**

*Por ayudarme hacer una mejor persona día a día esto es de ustedes, sin su presencia difícil sería ser quien soy. Les agradezco eternamente. LOS QUIERO MUCHO HERMANOS*

### **A TI AMOR.**

*Para ti el amor de mi vida, chaparrita eres parte de mi vida sabes que este éxito también es tuyo, todas esas tardes haciendo tesis rindió frutos, juntos lograremos todo lo que hemos planeado, tu apoyo es fundamental, nunca cambies. TE AMO.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁG.
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
APÉNDICE.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
1.2 HIPÓTESIS.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 RUMIANTES.....	3
2.1.1 CARACTERISTICAS DE LOS RUMIANTES.....	4
2.1.2 ALIMENTACIÓN DE LOS RUMIANTES.....	5
2.1.3 PROCESO DIGESTIVO DEL RUMIANTE.....	5
2.2 RUMEN.....	6
2.2.1 MICROORGANISMOS DEL RUMEN.....	6
2.2.2 BACTERIAS.....	7

2.2.3 PROTOZOARIOS.....	9
2.2.4 HONGOS .....	9
2.3 FERMENTACIÓN RUMINAL .....	10
2.3.1 CONDICIONES DEL RUMEN PARA LA FERMENTACIÓN.....	11
2.3.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	12
2.4 DEGRADACION DE ALIMENTO POR MICROORGANISMOS RUMINALES .....	14
2.5 PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN.....	16
2.6 ÁCIDOS GRASOS VOLATILES (AGV´s).....	16
2.6.1 IMPORTANCIA DE LOS AGV´s PARA EL RUMIANTE.....	17
2.6.2 ÁCIDO ACÉTICO.....	19
2.6.3 ÁCIDO PROPIÓNICO.....	20
2.6.4 ÁCIDO BUTÍRICO.....	21
2.6.5 FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE AGV´s.....	21
2.7 BIOPELICULAS.....	25
2.7.1 BIOPELÍCULA RUMINAL.....	26
2.7.2 ESTABLECIMIENTO DE UNA BIOPELÍCULA.....	27
2.8 DESCRIPCIÓN DE <i>Opuntia Imbricata</i> (coyonoxtle).....	28
III. MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1 UBICACION DEL AREA DE ESTUDIO.....	30
3.2 MATERIALES.....	30

<b>3.2.1 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO UTILIZADO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.2 MATERIAL QUIMICO Y BIOLOGICO UTILIZADO.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES REACTORES.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.1 REACTORES A EVALUAR.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.2 OBTENCIÓN DE LÍQUIDO RUMINAL.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3 PREPARACION DE LA SALIVA ARTIFICIAL.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.4 COMBINACIÓN DE SALIVA ARTIFICIAL Y LIQUIDO RUMINAL.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.5 PREPARACIÓN DEL COYONOXTLE (<i>Opuntia Imbricata</i>).....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.6 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE MICROORGANISMOS RUMINALES EN TROZOS DE COYONOXTLE.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 DESARROLLO DE LA CINETICA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.1 PREPARACION DE LOS REACTORES.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.2 TIEMPOS DE MUESTREO PARA DETERMINACION DE METANO Y ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV´s).....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.3 EXTRACCION DE MUESTRAS PARA EVALUACION DE METANO Y AGV´s.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METANO.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.5 DETERMINACION DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV´s).....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 VARIABLES ESTUDIADAS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>37</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 ÁCIDO ACÉTICO.....</b>	<b>38</b>

<b>4.2</b>	<b>ÁCIDO PROPIÓNICO.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>ÁCIDO BUTÍRICO.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>METANO.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>TOTALES DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV´s).....</b>	<b>49</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>APENDICE.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1. Sistema digestivo de los rumiantes.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2. Protozooario ciliado en medio de pequeñas bacterias.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 3. Rutas de transformación de los AGV's a compuestos más aprovechables para el rumiante.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4. Establecimiento de una biopelícula.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5. Opuntia imbricata (Coyonoxtle).....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6. Formación de biopelícula en el soporte.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7. Producción de ácido acético con 50% maíz-50% alfalfa con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 8. Líneas de regresión para ácido acético de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 9. Producción de ácido propiónico con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 10. Líneas de regresión para ácido propiónico de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 11. Producción de ácido butírico con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 12. Líneas de regresión para ácido butírico de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 13. Producción de metano con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal.....</b>	<b>48</b>

**Figura 14. Líneas de regresión para metano de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.....48**

**Figura 15. Producción total de AGV's con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal.....50**

**Figura 16. Líneas de regresión para total de agv's de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.....50**

## INDICE DE CUADROS.

<b>Cuadro 1. Grupos de géneros bacterianos.....</b>	<b>8</b>
<b>Cuadro 2. Distribución de los reactores de prueba.....</b>	<b>31</b>
<b>Cuadro 3. Producción de ácido acético (mM/l) en tratamientos.....</b>	<b>39</b>
<b>Cuadro 4. Producción de ácido propiónico (mM/l) en tratamientos.....</b>	<b>41</b>
<b>Cuadro 5. Producción de ácido butírico (mM/l) en tratamientos.....</b>	<b>44</b>
<b>Cuadro 6. Producción de metano (mM/l) en tratamientos.....</b>	<b>47</b>
<b>Cuadro 7. Producción de ácidos grasos totales (mM/l) en tratamientos.....</b>	<b>49</b>

## APENDICE

<b>Cuadro 1 A. Análisis de varianza para ácido propiónico en un diseño completamente al azar de 2 x 2.....</b>	<b>60</b>
<b>Cuadro 2 A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para ácido propiónico.....</b>	<b>60</b>
<b>Cuadro 3 A. Análisis de varianza para ácido butírico en un diseño completamente al azar de 2 x 2.....</b>	<b>63</b>
<b>Cuadro 4 A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para ácido butírico.....</b>	<b>64</b>
<b>Cuadro 5 A. Análisis de varianza para metano en un diseño completamente al azar de 2 x 2.....</b>	<b>67</b>
<b>Cuadro 6 A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para metano.....</b>	<b>67</b>
<b>Cuadro 7 A. Análisis de varianza para ácido grasos volátiles totales en un diseño completamente al azar de 2 x 2.....</b>	<b>68</b>
<b>Cuadro 8 A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para ácidos grasos volátiles totales.....</b>	<b>69</b>

## RESUMEN

Los resultados de investigación de este experimento son un esfuerzo conjunto que se realizó en el laboratorio de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) y el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC). El objetivo fue evaluar 2 factores (cyE y cyT) (con y sin líquido ruminal) utilizando una biopelícula de microorganismos ruminales y determinar la funcionalidad de éstos en este tipo de estratos en la producción de los ácidos grasos volátiles (agv's), indispensables para la producción de energía y funcionamiento de los rumiantes. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial con igual número de repeticiones. Se cuantifico la producción de los AGV's sobre un periodo de exposición de 0, 24, 48, 72 y 96 horas a excepción de metano que involucro el mismo rango excepto la lectura de 96 horas. Para ácido acético la combinación de tratamientos de cyT fue superior a aquellos de cyE con y sin líquido ruminal a partir de las 48 horas, es bien conocido que la actividad digestiva en los rumiantes ocurre en el intervalo de 24 a 48 horas dependiendo del tipo de dieta (forraje o concentrado) a la que este sujeto el animal (Teruya, s/f) Por otra parte, la concentración de ácido propiónico – ácido graso volátil muy relacionado con la producción de carne, se observó mejor comportamiento en cyE con líquido ruminal a las 24 horas con un valor de 8.29 mMol/l, sin embargo, después de las 48 y hasta las 96 horas hay una superioridad de los tratamientos de cyT con líquido ruminal ya que tuvieron lecturas de 14.66 y 17.01 mMol/l, a excepción de las 72 horas. Otro de los AGV's importantes es el ácido butírico ya que este participa en la síntesis de grasas corporales esenciales para la producción de leche. Se observó que a las 24 horas el tratamiento que incluyo cyE con líquido ruminal fue superior sobre el resto de los tratamientos. Sin embargo, es importante resaltar que en promedio los tratamientos de cyE y cyT sin líquido ruminal son mejores a partir de las 48 horas de exposición.

En relación al gas metano, este es un producto final de la digestión y se considera una pérdida de energía además que es nocivo y debe ser eliminado mediante

eructos y heces, ya que es el causante de la acidosis y de la muerte de los animales si no es expulsado del cuerpo (Blaxter, 1964). Se observó en este estudio que los valores más bajos de producción de metano fueron para cyT y cyE sin líquido ruminal a las 72 horas de exposición con valores de 41.56 y 66.14 mMol/l, respectivamente. Finalmente para la concentración de totales de ácido grasos volátiles (AGV's), se observó que al inicio de la exposición destacaron los tratamientos con cyE sin embargo, después de las 48 horas la superioridad se reflejó en los tratamientos con cyT con y sin líquido ruminal hasta las 96 horas de exposición.

## I. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes son mamíferos que se han especializado en consumir material vegetal fibroso, que las enzimas digestivas son incapaces de degradar, pero mediante la fermentación que proporcionan los microorganismos que viven en simbiosis en el rumen, son aprovechados (Phillipson, 1981).

Una característica importante de los rumiantes es que son los únicos animales que se pueden alimentar de cualquier tipo de material vegetativo desde el más tierno hasta el más fibroso así como también de alimentos concentrados, o sea que transforman la celulosa, hemicelulosa, lignina, carbohidratos, etc. a compuestos más simples que proveen de energía a su organismo tales como los ácidos grasos volátiles. Para llevar a cabo lo anterior, en el rumen se encuentran poblaciones densas de microorganismos en una gran variedad de bacterias, hongos y protozoos que son responsables de los procesos digestivos que tienen lugar en el órgano (Hungate, 1966).

Es de suma importancia el papel que juega el rumen ya que este funge como una cámara de descomposición de los alimentos que previamente el animal consume, el rumen provee de las óptimas condiciones para que los microorganismos funcionen bien. Es en este sentido, que los microorganismos deberán de trabajar formando una sinergia y simbiosis con el animal para degradar las moléculas complejas en moléculas más simples tales como el ácido acético, propiónico y butírico, entre otros, los cuales son absorbidos y asimilados por diferentes rutas metabólicas, para proveer de energía al animal.

Lo anterior se puede maximizar a través de biopelículas de microorganismos naturales o creadas, ya que los microorganismos se integran en comunidades microbianas que permite su desarrollo, agrupación e interaccionan en medios que se adhieren a una superficie y es esta una de las formas más exitosas que permite la colonización y funcionamiento de dichos microorganismos (hongos, bacterias y protozoarios) (Harrison, et al., 2006).

## **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluación del efecto de la biopelícula de microorganismo establecida en coyonoxtle (*Opuntia Imbricata*) con y sin la presencia de líquido ruminal en la producción de ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propionico y ácido butírico) *in vitro*.

### **1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar el efecto que tiene el soporte cyE y cyT con la biopelícula formada para la producción de los AGV's.

Evaluar el efecto que tiene tanto la presencia como la ausencia del líquido ruminal en combinación con la biopelícula en el coyonoxtle para la producción de AGV's.

## **1.2 HIPOTESIS**

### **Hipótesis nula (Ho):**

Empleando una biopelícula de microorganismos ruminales en soporte de coyonoxtle (cyE y cyT) con la presencia de líquido ruminal no incrementara la producción de los ácidos grasos volátiles (AGV's)

### **Hipótesis alternativa (Ha):**

Empleando una biopelícula de microorganismos ruminales en soporte de coyonoxtle (cyE y cyT) con la presencia de líquido ruminal incrementara la producción de los ácidos grasos volátiles (AGV's)

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 RUMIANTES

Los rumiantes son mamíferos que se han especializado en consumir material vegetal fibroso, donde las enzimas digestivas son incapaces de degradar, pero mediante la fermentación que proporcionan los microorganismos que viven en simbiosis en el rumen, son aprovechados.

La gran capacidad gástrica de los rumiantes es necesaria para mantener los alimentos el tiempo suficiente para ser digeridos. Así, el estómago de los rumiantes se encuentra constituido por cuatro compartimientos, rumen, retículo, omaso y abomaso (Figura 1), sólo el último produce enzimas digestivas capaces de degradar alimentos (Phillipson, 1981).

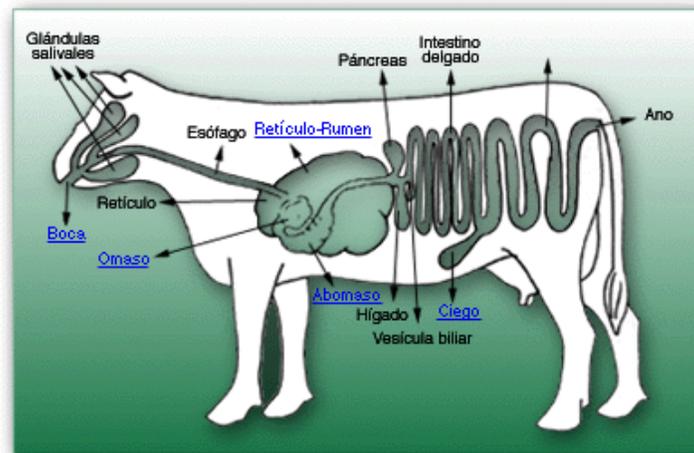


Figura 1. Sistema digestivo de los rumiantes (Universidad Católica de Chile, s/f).

Los Rumiantes (Ruminantia) son un suborden de mamíferos artiodáctilos que incluye algunos animales muy conocidos, como las vacas, toros, cabras, ovejas y venados. Los rumiantes digieren los alimentos en dos pasos: masticando y tragando de manera normal y, luego regurgitando el bolo para re masticar y volver a tragar, y así extraer al máximo el valor nutritivo. El estómago de los rumiantes se caracteriza por poseer varias divisiones.

Dadas estas características, a diferencia de los no rumiantes, son capaces de aprovechar los carbohidratos estructurales presentes en las plantas (celulosa, hemicelulosa y pectina, las dos primeras constituyentes de la fibra) teniendo así una fuente de energía adicional y basando su alimentación en el consumo de forraje (Real academia, 2011).

### **2.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS RUMIANTES**

Los animales rumiantes constituyen una importante fuente de alimentos y subproductos para los seres humanos. Estos animales se han adaptado de tal manera que pueden satisfacer sus necesidades energéticas a través de la utilización de los forrajes, los cuales son relativamente abundantes en la superficie terrestre, aspecto que los coloca entre los animales de más alto interés zootécnico. Los rumiantes son animales poligástricos, es decir, que la estructura anatómica de sus estómagos es compleja por estar formada por 4 compartimentos: retículo, rumen, omaso y abomaso. Los tres primeros se denominan conjuntamente pre estómagos y poseen una mucosa glandular (epitelio sin capacidad de producir jugos con función digestiva). Poseyendo el último de los cuatro (el abomaso) una estructura glandular equivalente a la del estómago simple en los mono gástricos (Redondo, 2003).

Hablando de su aparato digestivo existen constantes fisiológicas las cuales son:

- 1) Comiendo alimento a libre acceso, su consumo es de 3% del PV\* (heno de buena calidad) 2.2% del PV (ensilaje) 1% del PV (pajas)
- 2) Consumo de agua: (10 % del PV en 4 períodos) 3.6 - 4.3 litros de agua/kg de MS, 50 - 80 litros de agua/día (alimento seco), 24 - 40 litros de agua/día (alimento verde), 14 - 16% PV (más de 5 L/L de leche) (UNAM, S/F).

\*PV= Peso Vivo

### **2.1.2 ALIMENTACIÓN DE LOS RUMIANTES**

La alimentación del rumiante está basada en materiales fibrosos como los forrajes de gramíneas o leguminosas y/o materiales de diferente naturaleza como los alimentos concentrados los cuales contienen proporciones altas de proteína, como los son los granos o subproductos animales (harinas de origen animal) entre otros. Además, el tiempo entre comidas, consumo de agua son variables del mismo modo que la secreción de saliva, la fermentación, la tasa de pasaje, y el volumen y contenido ruminal (Church, 1974). Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje. Esta característica se basa en la posibilidad de poder degradar los hidratos de carbono estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para las especies de estómago simple o no-rumiantes. Basada en esta diferencia fundamental, la fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares. La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas digestivas, y los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales (Relling y Martolli, 2002).

### **2.1.3 PROCESO DIGESTIVO DEL RUMIANTE**

La estrategia de alimentación de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal huésped; ya que el rumiante contribuye aportando las materias primas o alimentos y las condiciones propicias del medio ruminal como son: la temperatura que oscila de 38 a 40°, un pH de 5 a 7, anaerobiosis, ambiente reductor entre otros; mientras que las bacterias utilizan parcialmente los alimentos para aprovechar los forrajes los cuales son indigestibles para los mamíferos, con la consecuente aportación de productos de la fermentación con valor nutritivo para el rumiante como son los ácidos grasos volátiles y la proteína (Ángeles, 2013).

## **2.2 RUMEN**

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar 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 5 a 7, temperatura de alrededor de 38 a 40°C y de 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 anaerobia del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yokohama y Johnson, 1998). El rumen se desarrolla anatómicamente a partir de la porción no secretora del estómago. El aparato digestivo de los rumiantes al nacer funciona muy parecido al de los mono gástricos, debido a que el rumen tiene un desarrollo muy rudimentario (Church, 1979).

Sin embargo, su especial pauta de motilidad ya está perfectamente establecida desde el nacimiento. El desarrollo del rumen implica, por lo tanto, la implantación de la masa microbiana y la capacidad de absorción de nutrientes, siendo importante el tiempo que transcurra entre el desarrollo morfo-fisiológico digestivo y los procesos digestivos de fermentación ruminal dada por la relación simbiótica establecida con los microorganismos ruminales (Orskov, 1990).

### **2.2.1 MICROORGANISMOS DEL RUMEN**

El rumen se encuentra densamente poblado por una gran variedad de bacterias, hongos y protozoos que son responsables de los procesos digestivos que tienen lugar en el órgano. Estableciéndose una relación de simbiosis entre el animal y los microorganismos ruminales (Hungate, 1966). La estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en dicha simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal. Mientras el rumiante aporta alimentos y las condiciones

medioambientales adecuadas (temperatura, acidez, anaerobiosis, ambiente reductor, etc.), las bacterias utilizan parcialmente los alimentos haciendo útiles los forrajes (de otra forma indigestibles para los mamíferos) aportando productos de la fermentación con valor nutritivo para el rumiante (ácidos grasos volátiles) y sus propios cuerpos microbianos (proteína). La característica más peculiar de las bacterias fibrolíticas está dada por su capacidad de digerir la fibra, produciendo acetato como producto principal de fermentación. El acetato es fundamental para la síntesis de grasa de la leche. Sin embargo, es esencial que el pH ruminal se mantenga por encima de 6.0 para garantizar las condiciones idóneas para su funcionamiento (Calsamiglia, 1997).

Los microorganismos ruminales constituyen un elemento de vital importancia para el mantenimiento de los animales poligástricos, esto se refleja si se tiene en cuenta que del 55 al 85 % de la energía metabolizable (EM) total derivada del alimento consumido, es absorbida desde la pared ruminal como ácidos grasos volátiles (AGV's) obtenidos a partir de la acción microbiana sobre este. La mayoría de las bacterias, hongos, y muy pocos protozoarios, pueden utilizar amoníaco (Díaz, et al., 2007).

En vacas lecheras, la proteína microbiana sintetizada por las bacterias proteolíticas (en especial los géneros *Prevotella*, *Selenomonas* y *Butyrivibrio*) y las bacterias que sintetizan aminoácidos, proporciona casi 60 % de los aminoácidos que llegan al duodeno, lo cual aumenta a 90 % en rumiantes alimentados con dietas bajas en proteína. La proteína que puede aportar la masa microbiana ruminal representa lo siguiente, respecto al total disponible: 44% en borregos, 48 % en vacas, 51 % en terneros, 45 % en novillos (alimentados con paja y grano de cebada), 39 % en novillos (alimentados con paja de cebada); además, proporciona todos los aminoácidos indispensables y 60 a 90 % del requerimiento energético y nitrogenado para los rumiantes (Díaz, et al. 2007).

## 2.2.2 BACTERIAS

Cada mililitro de contenido ruminal alberga alrededor de 10 000 a 50 000 millones de bacterias, siendo estos los microorganismos más abundantes. Las bacterias se encuentran en una gran variedad de géneros y especies por lo menos 28 especies funcionalmente importantes (Cuadro 1), las cuales se agrupan de acuerdo a su actividad. La mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas, que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, sin embargo también se encuentran presentes organismos facultativos (Nava y Díaz, 2001).

Cuadro 1. Grupos de géneros bacterianos (Nava y Díaz, 2001).

GRUPOS DE GÉNEROS BACTERIANOS	
<b>Celulolíticos:</b>	<b>Hemicelulolíticos:</b>
» <i>Bacteriodes succinogenes</i>	» <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
» <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	» <i>Bacteriodes ruminicola</i>
» <i>Ruminococcus albus</i>	» <i>Ruminococcus sp.</i>
» <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
<b>Utilizadores de azúcar:</b>	<b>Utilizadores de ácidos:</b>
» <i>Treponema bryantii</i>	» <i>Megasphaera elsdenii</i>
» <i>Lactobacillus vitulinus</i>	» <i>Selenomonas ruminantium</i>
» <i>Lactobacillus ruminus</i>	
<b>Pectinolíticos:</b>	<b>Utilizadores de lípidos:</b>
» <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	» <i>Anaerovobrio lipolytica</i>
» <i>Bacteriodes ruminicola</i>	» <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
» <i>Lachnospira multiparus</i>	» <i>Treponema bryantii</i>
» <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	» <i>Eubacterium sp.</i>
» <i>Treponema bryantii</i>	» <i>Fusocillus sp.</i>
» <i>Streptococcus bovis</i>	» <i>Micrococcus sp.</i>
<b>Amilolíticos:</b>	<b>Proteolíticos:</b>
» <i>Bacteriodes amylophilus</i>	» <i>Bacteriodes amylophilus</i>
» <i>Bacteriodes ruminicola</i>	» <i>Bacteriodes ruminicola</i>
» <i>Streptococcus bovis</i>	» <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
» <i>Succinimonas amylolytica</i>	» <i>Streptococcus bovis</i>
<b>Productores de amoníaco:</b>	<b>Productores de metano:</b>
» <i>Bacteriodes ruminicola</i>	» <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>
» <i>Selenomonas ruminantium</i>	» <i>Methanobacterium formicicum</i>
» <i>Megasphaera elsdenii</i>	» <i>Methanomicrobium mobile</i>
<b>Ureolíticos:</b>	
» <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	
» <i>Bacteriodes ruminicola</i>	
» <i>Selenomonas sp.</i>	
» <i>Ruminococcus bromii</i>	
» <i>Butyrivibrio sp.</i>	
» <i>Treponema sp.</i>	

### 2.2.3 PROTOZOARIOS

La población de protozoarios en el rumen es menor a la de las bacterias, encontrándose en concentraciones de 1 millón por ml de contenido ruminal, aunque su número es menor en comparación con las bacterias, estos microorganismos tienen un mayor volumen individual, dando lugar a una masa celular de protozoarios semejante a la masa de las bacterias.



Figura 2. Protozoo ciliado en medio de pequeñas bacterias (Nava y Díaz, 2001).

Si bien la mayoría de los protozoarios son ciliados (Figura 2), existen también protozoarios flagelados. Los protozoarios consumen y metabolizan azúcares solubles, hidrolizan bacterias para utilizarlas como sustrato logrando con esto limitar el crecimiento bacteriano.

Un papel particularmente importante de los protozoarios, es su capacidad para frenar la digestión de los sustratos que se fermentan con rapidez, como el almidón y algunas proteínas. Esto es posible ya que los protozoarios engloban al almidón y a las proteínas almacenándolos y protegiéndolos de la acción bacteriana (Nava y Díaz, 2001).

### 2.2.4 HONGOS

En el rumen existen también hongos anaerobios, conocidos desde 1974, en una concentración de  $10^3$  a  $10^5$  por ml de fluido ruminal ejemplos de estos lo

constituyen: *Neocallimástix frontalis*, *Sphaeromonas communis*, *Piromonas communis*, *Orpinomyces*. Es bien conocido que la población de hongos anaerobios del rumen está directamente relacionada con el contenido en fibra de la dieta, y su proporción disminuye en dietas ricas en almidón o azúcares solubles (Grenet, et al., 1989).

Los hongos ruminales tienen capacidad enzimática de hidrolizar celulosa y xilano, no siendo así con la pectina (Fonty, et al., 1991 y Hébraud, et al., 1988).

Lógicamente, su actividad enzimática frente a estos sustratos es variable dependiendo de su origen filogenético, en especial de su estructura rizoidal, pero se ha postulado que algunas especies, como *Neocallimástix frontalis*, *Piromyces comunis* y *Orpinomyces joyonii* son tanto o incluso más eficientes en la digestión de los polisacáridos estructurales como las especies bacterianas más activamente celulolíticas (Grenet, et al., 1989).

### **2.3 FERMENTACIÓN RUMINAL**

La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos 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” (Van y Regueiro, 2008).

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 (Van y Regueiro, 2008).

El patrón de fermentación en los rumiantes se lleva a cabo en el ambiente ruminal que está influenciado por la interacción entre la dieta, la población microbiana y el propio animal (Allen y Mertens, 1988). Dos aspectos importantes en el rumen para la fermentación, son las condiciones para una eficiente actividad celulolítica y las necesidades para una síntesis óptima de proteína microbial. Sin embargo, la importancia relativa de estos procesos varía de acuerdo con las características del alimento y los sistemas de producción animal (Williams, 1989).

### **2.3.1 CONDICIONES DEL RUMEN PARA LA FERMENTACIÓN**

El rumen junto con el retículo forman una cámara que mantiene un ambiente favorable para la fermentación anaerobia. Un patrón adecuado de fermentación necesita algunas condiciones para desarrollarse en forma adecuada (Nava y Díaz, 2001).

- Debe existir un aporte suficiente de sustratos.
- Se debe mantener un potencial de óxido-reducción.
- La temperatura debe estar en un rango de 39 - 40°C.
- Una osmolaridad cercana a los 300 mosm.
- Un pH de 6-7.
- Remoción de los desechos no digeribles.
- Remoción de microorganismos congruente con la regeneración de los mismos.
- Remoción de los ácidos grasos volátiles (AGV's), producidos durante la fermentación.

El rumen y el retículo se encargan de realizar la remoción de desechos y microorganismos a través un patrón complejo de contracciones que se originan en el retículo; además el retículo colecta el alimento que ha sido suficientemente fermentado para transportarlo hacia el omaso; las contracciones del retículo y rumen también participan en el eructo. Debido a la fermentación ruminal, se producen diferentes gases, cerca de 30-50 litros/hora en un bovino adulto y 5 litros/hora en un borrego; estos son eliminados a través del eructo; los principales gases producidos se enumeran a continuación.

- Bióxido de carbono (60-70%).
- Metano (30-40%).
- Nitrógeno (7%).
- Oxígeno (0.6%).
- Hidrógeno (0.6%).
- Ácido sulfhídrico (0.01%).

Los AGV's son principalmente retirados del líquido ruminal, al ser absorbidos en las paredes del rumen y retículo (Nava y Díaz, 2001).

### **2.3.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN**

El término fermentación se refiere al metabolismo microbiano en ausencia de oxígeno que convierte a los carbohidratos en productos orgánicos como los ácidos grasos volátiles (AGV's), ácido láctico y etanol. Estos productos retienen la mayor parte de la energía original en el sustrato, una consecuencia de la falta de oxígeno para su oxidación completa a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), agua (H<sub>2</sub>O) y energía (ATP) (Díaz, et al., 2007).

Se plantea que la fermentación ruminal le concede al rumiante una serie de ventajas que no poseen los animales monogástricos dentro de las cuales se encuentran:

- Utilizar alimentos que son muy fibrosos para los no rumiantes.

- Degradar la celulosa liberando el contenido celular, convirtiendo la celulosa en un nutriente primordial.
- Sintetizar proteína microbiana de alto valor biológico a partir de proteína vegetal de bajo valor biológico, del nitrógeno no proteico de la dieta y del reciclaje de productos metabólicos de desecho (urea).
- Proveer todas las vitaminas del complejo B siempre y cuando exista la concentración adecuada de cobalto para la síntesis de vitamina B<sub>12</sub>.

Como es de suponer no todo son ventajas por lo que a continuación se relacionan algunas de las desventajas que puede tener la digestión ruminal:

- El rumiante necesita pasar una buena parte del día (aprox. 8 h) rumiando y debe tener acceso al alimento a intervalos regulares.
- El rumiante necesita mecanismos complejos para mantener su cámara de fermentación trabajando eficientemente por ejemplo:
  - I. Adición continúa de grandes cantidades de saliva con naturaleza alcalina.
  - II. Movimientos de mezclado con tono marcado de los compartimentos gástricos.
  - III. Mecanismos para la eliminación de gases producto de la fermentación (eructo), para la regurgitación (rumia) y para la absorción de los productos finales de fermentación, así como para el paso de partículas no digeridas hacia el omaso.
  - IV. Las rutas metabólicas deben ser capaces de utilizar los particulares productos finales de la fermentación, los AGV's, de los cuales sólo el ácido propiónico es el único que puede convertirse en glucosa, cuyo requerimiento es elevado en etapas como final de gestación y lactación. Por lo que se considera al proceso de fermentación como ineficiente desde el punto de vista energético, ya que las bacterias gastan energía para su mantenimiento lo cual se traduce como calor y se considera una pérdida de energía para el rumiante (Díaz, et al., 2007).

## 2.4 DEGRADACIÓN DE ALIMENTO POR MICROORGANISMOS RUMINALES

La fibra se degrada lentamente, por lo que la adhesión de los microorganismos a la pared celular es el primer paso para iniciar su degradación, y para asegurar que los microorganismos permanecerán en el rumen el máximo tiempo, al asociarse a la parte más indigestible de la estructura vegetal. Esta adhesión puede ser vía uniones específicas con adhesinas (moléculas de la superficie microbiana que se une a receptores del material vegetal), o uniones inespecíficas con enlaces iónicos (Chesson y Forsberg, 1988).

Los primeros puntos de unión se localizan en los bordes de las partículas, en lesiones superficiales o en los estomas. Debido a que la superficie externa de las estructuras vegetales suele estar recubierta por lignina, taninos, cutina y sílice que dificultan el ataque microbiano, el proceso de degradación va de dentro hacia fuera (Hoover, 1986).

Los hongos son los únicos capaces de penetrar la cutina y la lignina, proporcionando nuevos sitios para la adhesión bacteriana, por lo que tienen una función importante en la degradación de la fibra (Ho, et al., 1988). Las bacterias son las primeras en colonizar la estructura vegetal, siendo *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* las principales bacterias celulolíticas (Hungate, 1966).

Después de las bacterias se producirá la colonización por protozoos y hongos. Los zoosporos fúngicos detectan los azúcares solubles que difunden de las partes lesionadas de las estructuras vegetales, van hasta esta zona, se enquistan e invaden el tejido con sus rizoides (Orpin y Bountiff, 1978).

Un mecanismo similar de quimiostasis también se ha descrito en los protozoos (Orpin, 1979). Los protozoos tienen gran actividad celulolítica y en determinadas condiciones, pueden representar más de la mitad de la actividad celulolítica del rumen (Orskov y Ryle, 1998).

Una vez adheridos, se produce la degradación enzimática que consta de dos etapas. En la primera etapa, los polisacáridos complejos son hidrolizados hasta oligosacáridos de cadena corta (celobiosa, maltosa, xilobiosa) y azúcares sencillos mediante las celulasas y hemicelulasas. En una segunda etapa, los monosacáridos son metabolizados hasta piruvato y finalmente hasta AGV's, siendo el acetato el principal producto final de degradación de los carbohidratos fibrosos. La actividad celulasa se realiza a través de un complejo enzimático que consta de tres enzimas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa) que trabajan sinérgicamente. Para degradar la hemicelulosa, también intervienen sinérgicamente más de una xilanasas (Rotger, 2004).

Además del sinergismo a nivel enzimático, también son muy importantes los sinergismos entre grupos bacterianos, incluso con bacterias no fibrolíticas abundantes en dietas forrajeras (*Selenomonas ruminantium*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Treponema Butyrivibrio*). Estas bacterias no celulolíticas degradan los productos de fermentación de la celulosa, como la celobiosa y celodextrina, y aceleran el proceso digestivo de la celulosa, evitando la inhibición por producto final (Russell, 1985; Cheng, et al., 1991). Este sinergismo también está presente en la degradación de la hemicelulosa que es primero solubilizada por microorganismos no utilizadores de hemicelulosa (*Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*) para después los polisacáridos solubles ser fermentados por bacterias que los pueden utilizar pero no degradar, como *Prevotella ruminicola* (Fondevila y Dehority, 1994).

Al ser la fibra una mezcla tan heterogénea, sus componentes serán degradados en distinta intensidad por los microorganismos ruminales. Algunos componentes de la pared celular se degradarán rápidamente, mientras que otros prácticamente no se degradarán en el rumen y su degradación podrá continuar en el tracto gastro intestinal posterior antes de ser excretados en heces.

El grado de degradación de la fibra en el rumen no solamente dependerá de la proporción de los componentes que la forman, sino que es más complejo y se verá afectado por una serie de factores como:

- a) Accesibilidad de los microorganismos al sustrato.
- b) Densidad y actividad de las poblaciones fibrolíticas presentes en el rumen.
- c) Factores microbianos que controlan la adhesión e hidrólisis mediante complejos enzimáticos de las poblaciones microbianas adherentes.
- d) Factores relacionados con el animal (masticación, salivación y cinética ruminal) que determinaran la accesibilidad del sustrato a las bacterias (Varga y Kolver, 1997).

## **2.5 PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN**

La actividad de los microorganismos en la fermentación del rumen incluye la degradación de los carbohidratos y otros constituyentes de la dieta, siendo los productos finales AGV's, anhídrido carbónico, metano, amoníaco y células bacterianas. Los AGV's incluyen fórmico, acético propiónico, n-butírico, iso-butírico, n-valérico, iso-valérico, 2 metil-butírico y vestigios de AGV's superiores con cadenas rectas y ramificadas. También se produce ácido láctico y se han registrado indicios de otros ácidos tales como el succínico. En función de su contribución potencial a las necesidades energéticas del ganado, los productos más importantes son los ácidos grasos volátiles acético, butírico, propiónico y láctico (Blaxter, 1964). Otro producto final de la fermentación también es la producción de proteína, ya que, de la población microbiana existente el 30% al 50% de las mismas representan bacterias altamente proteolíticas (Díaz, et al., 2007).

## **2.6 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV's)**

Los ácidos grasos consisten en dos cadenas de átomos de carbono que varían de entre 2 a 24 unidades o más de longitud; en el extremo de cada cadena hay un

grupo carboxilo. La estructura general es RCOOH, donde R es una cadena de carbono de longitud variable. El ácido acético un producto importante de la fermentación ruminal de la glucosa en rumiantes y tiene 2 carbonos, y su fórmula es CH<sub>3</sub>COOH (Pond, et al., 2010).

Los animales rumiantes producen estos ácidos con ayuda de los microorganismos presentes en el rumen, (protozoos, hongos, bacterias), los cuales se encargan de la degradación de los alimentos y estos a su vez producen los ácidos grasos volátiles.

Su concentración total varía ampliamente de acuerdo con las raciones de los animales y el tiempo transcurrido desde la última comida, pero normalmente se sitúa en el intervalo de 70-150 Mmol/l (equivalentes a 5 a 10 g/l). También varían las proporciones relativas de los distintos ácidos. Los forrajes fibrosos maduros originan mezclas de AGV's que contienen una elevada proporción (cerca del 70%) de ácido acético, los forrajes menos maduros tienden a producir proporciones algo menores de ácido acético y mayores de ácido propiónico.

La adición de concentrados a los forrajes, también hace aumentar la proporción de ácido propiónico a expensas del ácido acético, siendo especialmente apreciable este efecto en raciones que incluyen gran cantidad de concentrados (60%) (McDonald, et al., 1995)

### **2.6.1 IMPORTANCIA DE LOS AGV's PARA EL RUMIANTE**

Los AGV's son de suma importancia ya que representan más del 70% del suministro de energía al rumiante. Virtualmente el ácido acético, ácido propiónico y el ácido butírico son absorbidos por el epitelio del rumen y son transportados vía corta al hígado (figura 3). La absorción de AGV's no sólo es importante para mantener su distribución en las células animales, sino para prevenir cantidades excesivas que puedan alterar el pH ruminal.

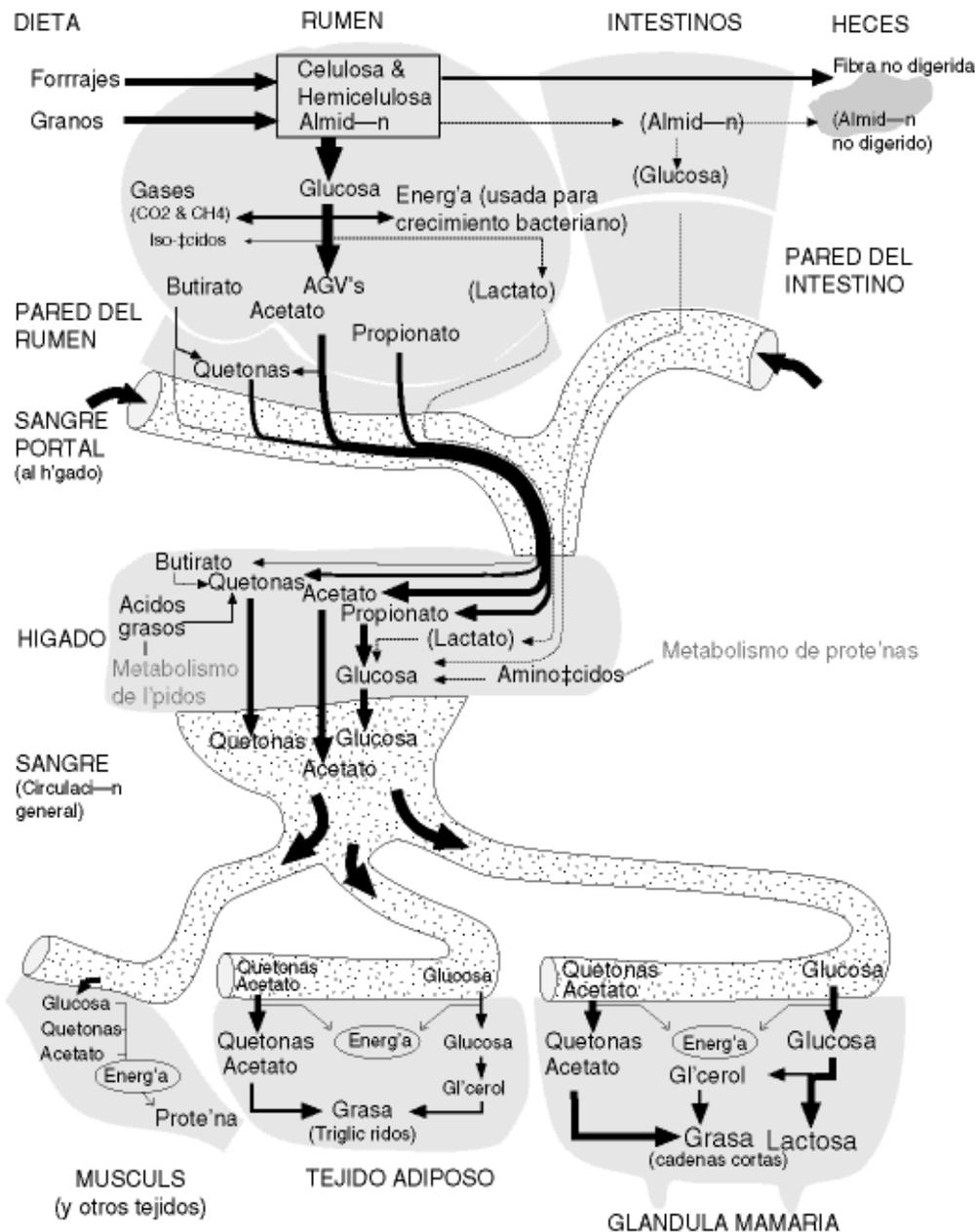


Figura 3. Rutas de transformación de los AGV's a compuestos aprovechables para el rumiante (Nava y Díaz, 2001).

El epitelio estratificado del rumen generalmente no se caracteriza por una eficaz absorción. No obstante es capaz de absorber eficientemente AGV's, ácido láctico, electrolitos y agua. La superficie del epitelio está muy extendida debido a la formación de papilas bien vascularizadas (Nava y Díaz, 2001).

El tamaño y longitud de las papilas del rumen se modifican, dependiendo las concentraciones de los AGV's en el rumen. Los animales con una buena alimentación y producción de AGV's, presentan papilas largas y robustas para promover la absorción. En contraste, los animales con una deficiente alimentación, tienen papilas pequeñas y requieren de un largo tiempo de recuperación para restaurar el tamaño de sus papilas y su capacidad de absorción. La absorción de los AGV's es a través de un mecanismo de difusión a favor del gradiente de concentración. La velocidad de absorción aumenta a medida que desciende el pH del líquido ruminal.

Cuando atraviesan el epitelio, los AGV's sufren diferentes grados de transformación. El acetato y propionato son absorbidos casi sin alterarse, pero la mayor parte del ácido butírico se transforma en ácido  $\beta$ -hidroxibutírico el cual es un cuerpo cetónico. Los AGV's absorbidos tienen diferentes destinos metabólicos (Nava y Díaz, 2001).

- El ácido acético se oxida en los diferentes tejidos para generar ATP. También funciona como la principal fuente acetil-CoA para la síntesis de lípidos.
- El propionato sirve principalmente como sustrato gluconeogénico, es de suma importancia para el rumiante debido a que en el intestino delgado casi no se absorbe glucosa.
- El ácido butírico absorbido en forma de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, es oxidado en muchos tejidos para la producción de energía.

### **2.6.2 ÁCIDO ACÉTICO**

Por lo que respecta al ácido acético, el papel que juega y que es determinante para la producción de leche, ya que ésta puede aumentarse con el resultado de un incremento en la absorción de ácido acético a través del rumen, pero no así con el aumento de propiónico o butírico (Rook y Balch, 1961). Esto repercute en la cantidad de leche, el contenido de sus principales componentes y en forma

especial de la grasa, ya que aproximadamente el 50% de los ácidos grasos, sobre todo aquellos con menos de 16 carbonos, se originan a partir del ácido acético (Annison y Linzell, 1964).

Las reacciones que predominan en la producción de este ácido y lo mismo del ácido butírico, son reacciones fosfoclasticas, en las que el ácido pirúvico es convertido en fosfato de acetil y ácido fórmico o hidrógeno y CO<sub>2</sub>. Los hidrógenos que se desprenden en el proceso oxidativo son utilizados en distintas maneras según las bacterias que realicen la fermentación, los clostridios transfieren los electrones a protones que se separan como hidrogeno molecular, otras los transfieren al CO<sub>2</sub> produciendo ácido fórmico y otras más los utilizan para hidrogenar ácidos grasos (Marty y Preston 1970).

### **2.6.3 ÁCIDO PROPIÓNICO**

Este ácido graso volátil es el único que el hígado puede transformar en glucosa mediante la gluconeogénesis, y se distribuye a través de torrente sanguíneo y llega al músculo y de esta forma está muy ligado con la producción de carne. La proporción de glucosa que se puede obtener a partir del ácido propiónico varia de entre un 19% a 62%(Steel y Leng, 1973).

Este ácido es producido en el rumen del animal a partir de ácido pirúvico o del ácido láctico, siguiendo dos vías diferentes, aún cuando los dos son funcionales, una de ellas es 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 los 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).

### **2.6.4 ÁCIDO BUTÍRICO**

En el rumen se pueden sintetizar este ácido a partir del acético o de sustancias capaces de formar Acetil-CoA, como el ácido pirúvico

El ácido graso volátil que más se produce en cantidad es el acetato. Es el producto típico de rumiantes consumiendo forraje y dependen del tipo de microorganismos presentes. La celulosa y 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 metagénicas. 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 asociada a un cambio de pH en el rumen. En estas condiciones se aumenta la proporción de propionato en el rumen (Hidalgo, 2012).

El ácido butírico es de vital importancia para los rumiantes, este es oxidado y absorbido en forma de  $\beta$ -hidroxibutírico en los tejidos para la producción de energía y colabora en la síntesis de las grasas corporales esenciales para la producción de leche. En la glándula mamaria el ácido  $\beta$ -hidroxibutírico se utiliza como fuente de energía, y en combinación con el acetato actúa como precursor de ácidos grasos de cadena corta saturados, que se sintetizan en este tejido. Una de las características de la leche de los rumiantes es la existencia de ácidos grasos que poseen de 4 a 10 carbonos, lo que se debe en parte a la incorporación de este ácido  $\beta$ -hidroxibutírico (Leng y Annison, 1964).

#### **2.6.5 FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE AGV's**

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 aquellas 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. La producción de ácidos grasos volátiles disminuye conforme aumenta el pH del rumen (Zavaleta s/f).

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 aún la textura de los componentes de la ración alimenticia; el sustrato predominante en la ración tiene una influencia marcada.

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. (Balch y Rowlan, 1957 citado por Bath y Rook, 1965)

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 (Meyer et, al 1965).

En aquellos casos en que la ración alimenticia es modificada por la introducción de una gran cantidad de concentrado, sin un período 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 (Annison, 1965).

La producción excesiva de ácido láctico puede llegar a provocar una acidosis en el animal, y aún su muerte (Ryan, 1964).

Por lo general, la adición de concentrados a las raciones a base de forraje causa una disminución en la concentración de ácido acético, que es compensada con un aumento en la de propiónico o de butírico. Este efecto no es constante, ya que se presentan variaciones entre individuos y de un concentrado a otro. El aumento en ácido propiónico se observa cuando la cantidad de concentrado adicionada es elevada y su composición es a base de granos con gran cantidad de almidón, especialmente si han sido tratados previamente con calor (Bath y Rook, 1965).

La adición de concentrados disminuye la producción de metano (Blaxter y Wainman, 1964).

Los concentrados a base de granos en cuya preparación se incluye el tratamiento con calor y presión son fermentados con mayor rapidez y favorecen la producción de ácido propiónico. Este aumento en la digestibilidad puede deberse a que durante el tratamiento previo llega a haber un cierto grado de fragmentación de los gránulos de almidón e hidrólisis parcial de las moléculas del mismo (Trei y Theurer, 1966).

Es posible aumentar la producción de ácido butírico hasta un 25-35% de los ácidos grasos volátiles totales (en base a molaridad) utilizando raciones con un alto contenido en miel y urea, logrando también en el proceso un aumento en la concentración de ácido valérico y caproico. Este incremento se realiza, por lo general, a expensas del ácido acético (Marty y Preston, 1970).

Además algunos investigadores han observado cambios en las proporciones molares de ácidos grasos volátiles cuando se varía la frecuencia del suministro de alimento (Knox y Ward, 1961; citado por Bath y Rook, 1963).

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 (Church, 1960).

Esta adaptación ayuda a determinar la digestibilidad de las diferentes raciones. Siendo la celulosa uno de los sustratos más importantes en las raciones para los rumiantes, ha sido una preocupación constante del especialista en nutrición el aumentar su digestibilidad adicionando a las raciones aquellos elementos que

ayuden a una mejor actividad de las bacterias celulolíticas. Uno de los factores que tiene mayor influencia es la cantidad de nitrógeno presente, ya que la digestibilidad de cualquier forraje se reduce con la disminución de nitrógeno en la ración. Si el forraje es de mala calidad es necesario agregar, ciertos minerales para aumentar la digestibilidad de la celulosa.

También se ha observado que la adición de ácidos aminados o ácidos grasos ramificados resulta benéfica pues este tipo de cadenas carbonadas son esenciales para las bacterias celulolíticas (Hungate, 1950).

En cambio la inclusión de carbohidratos solubles disminuye la digestibilidad de la celulosa, debido a que se establece una competición entre las bacterias celulolíticas y las no celulolíticas por el aprovechamiento del nitrógeno disponible en el medio. En general se acepta que existe una relación estrecha entre la cantidad de células bacterianas presentes en el rumen, los carbohidratos fermentados y la producción de ácidos grasos volátiles (Zavaleta, s/f).

Otro de los factores que se ha estudiado con amplitud es la textura de los alimentos, desde el troceado, picado y hasta el pulverizado. La fragmentación de los forrajes facilita la digestión porque hay mayor superficie para la acción enzimática bacteriana, sin embargo, el moler finamente el forraje disminuye su acción, ya que el tránsito a través del rumen se hace más rápido (Moore, 1964).

Se ha sugerido el uso de cálculos estequiométricos para determinar en un momento dado la concentración de ácidos grasos o estimar el grado de síntesis de componentes bacterianos (Hungate, 1950 citado por Weston, 1968). De hecho, el peso seco de los microorganismos producidos en condiciones anaeróbicas es proporcional al sustrato disponible, aun cuando cambien las especies existentes, siempre y cuando las condiciones sean similares (Zavaleta s/f).

## **2.7 BIOPELÍCULAS**

Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son ubicuas en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. Son consideradas comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos auto producido y están adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo (Lindsay y Holy, 2006). La biopelícula crece adherida a un sustrato, del que no se separa y sobre el que no se desplaza, está caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interface, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica (Donland, 2002).

Desde una perspectiva ecológica, las poblaciones de bacterias surgen de las células individuales, y metabólicamente poblaciones similares constituyen agrupaciones conocidas como gremios (por ejemplo, bacterias celulolíticas). Los conjuntos de los gremios (por ejemplo, celulolíticas y fermentativas, bacterias sulfato-reductoras y azufre, y metanogénica) llevan a cabo procesos fisiológicos interdependientes para formar comunidades microbianas asociadas (Donland, 2002). Los microorganismos también forman ensamblajes naturales en suspensiones, tales como en instalaciones de tratamiento de aguas residuales, digestores anaeróbicos del rumen en los cuales reciben alimentos líquidos, al que preferentemente se agregan para formar flóculos o gránulos (Macleod, 1990).

Las biopelículas se definen en general en conjuntos de colonias de microorganismos y sus productos extracelulares asociados a un interfaz, estando típicamente unida a una superficie de una partícula que es de baja solubilidad o inerte. La asociación de las colonias bacterianas dentro de los biofilms son esenciales para las reacciones microbianas que se requieren en un proceso de fermentación para una rápida y eficiente conversión de materiales de alimentación en nutrientes (Stams y Plugge, 2009).

Dependiendo de la cepa implicada, las microcolonias pueden estar compuestas de 10-25% de células y de 75-90% de matriz SPE (sustancia polímera extracelular). Las biopelículas 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).

### **2.7.1 BIOPELÍCULA RUMINAL**

Los compuestos tales como celulosa con pesos moleculares superiores a 1000 unidades de masa atómica se consideran macromolecular, no puede ser asimilados por las bacterias sin hidrólisis (Confer y Logan, 1997). Así, las bacterias que digieren la celulosa tienen que ser los primeros colonizadores de materiales vegetales en el desarrollo de la biopelícula en el rumen. Estos microorganismos se adhieren para alimentarse de partículas donde se ha dañado la cubierta cerosa y el sustrato se expone y liberan enzimas para separar los polímeros de hemicelulosa y celulosa y otras macromoléculas como las proteínas, en intermedios de cadena más corta que son solubles (azúcares, péptidos y aminoácidos) (Costerton, 1987).

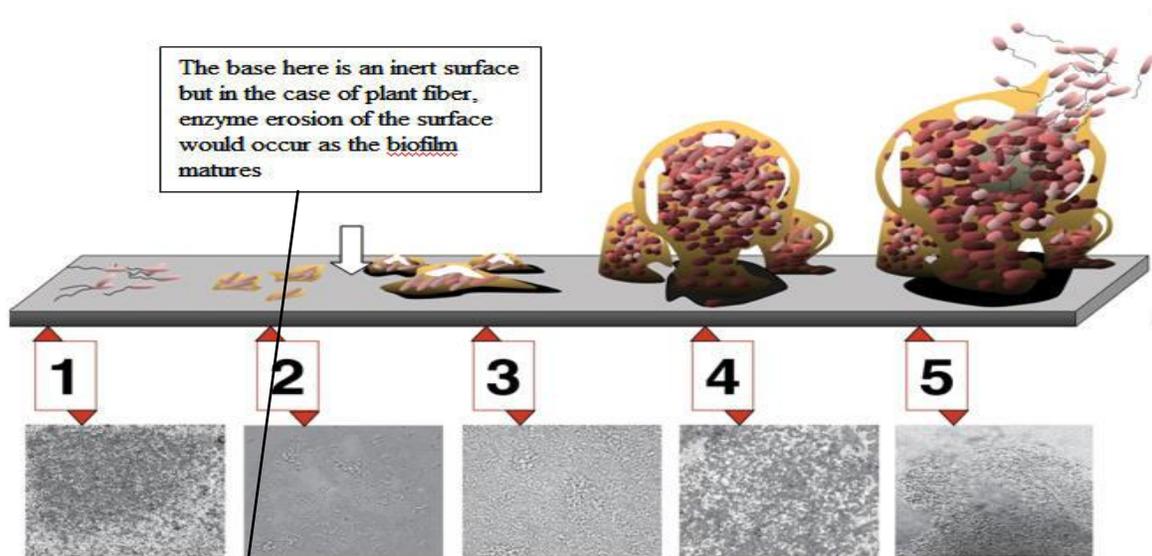
Para realizar este proceso de sustrato de energía eficiente, enzimas y microbios debe mantenerse dentro de 500 micrómetros uno de otro (Wetzel, 1991). El contacto físico entre los microbios, enzimas y componentes estructurales de plantas se necesita la presencia de la hidrólisis, y los microbios degradantes de celulosa se adhieren a partículas de materia vegetal para comenzar a producir sustancias poliméricas extracelulares o SPE. Las SPE formadas por estos organismos desarrolla la matriz del biofilm que proporciona el microambiente confinado para mantener los microbios, las enzimas y los sustratos en asociaciones cercanas (Flemming y Wingender, 2001) permitiendo a los microbios dentro de la biopelícula que fácilmente cambien de sustratos (Wolin, et al, 1997) y

asegura un ambiente altamente eficiente para la fermentación de la materia orgánica (Hungate, 1966; citado Chynoweth, 2003).

La digestión de la celulosa se mejora en casi 10 veces cuando el biofilm trabaja utilizando lo que los ecosistemas naturales proveen a la planta. La evidencia actual es indicativa de la superioridad de la digestión de la celulosa en el biofilm sobre la conseguida con los organismos planctónicos. De hecho, sería imposible para los rumiantes lograr la descomposición de materiales vegetales suficientes para sustentar la vida en las tasas de utilización de la celulosa, registrado para los microbios celulolíticos o suspensiones planctónicas (Wang y Chen, 2009).

### 2.7.2 ESTABLECIMIENTO DE UNA BIOPELÍCULA

El establecimiento de una biopelícula es ilustrada en la Figura 4, la cual muestra los pasos que llevan al establecimiento de la misma.



La base es aquí una superficie inerte, pero en el caso de la fibra de la planta, la erosión de la superficie permitirá las enzimas actuar y se produciría la biopelícula madura.

Figura 4. Establecimiento de un biopelícula (Anonymous, 2011).

- 1) Unión inicial (reversible) de las células a la superficie por adhesinas, receptores y mecanismos no específicos que se basan en fuerzas físico-químicas, tales como fuerzas de van-der Waals.
- 2) Unión irreversible por la producción de EPS que resulta más firmemente adherido.
- 3) Maduración I. El desarrollo temprano de la arquitectura del biofilm.
- 4) Maduración II. La maduración de la arquitectura de biopelículas, la unión de otros organismos, la competencia, la organización para crear poros o canales.
- 5) Dispersión de las células individuales de la biopelícula (Anonymous, 2011).

## **2.8 DESCRIPCIÓN DE *Opuntia Imbricata* (coyonoxtle)**

Es un arbusto de hasta 5 m de altura, con más o menos abundantes ramificaciones. Tronco corto, leñoso, bien definido, de unos 10 cm de diámetro, del que parten las primeras ramas primarias muy escasas, muy largas, casi tan gruesas como el tronco, las que a su vez producen varias series de artículos dispuestos en pseudo verticilios.

Artículos de 12 a 35 cm de largo y de unos 2.5 a 3.5 cm de diámetro; tuberculos dispuestos en 3 o 4 series, muy prominentes de 2 a 3.5 cm de largo. Hojas subuladas, de 1 a 2.5 de largo, caducas. Areolas grandes con gloquidas escasas. Espinas numerosas, 10 a 30 por areola, extendidas en todas direcciones, rectas, de 1 a 3 cm de largo, de color rojizo moreno hasta rosadas, casi aciculares pero algo aplanadas, fuertemente barbadas, con vainas blanquecinas, papiráceas y persistentes (Figura 5).

Las multiplicaciones se hacen más bien por los artículos de las ramas que se caen en la época de sequía y se enraízan en la época de lluvias. La población rural emplea las ramas secas como combustible; las plantas vivas las usan setos vivos y como pies de injerto.

En la época de sequía suele usar las partes tiernas de la planta y los frutos como forraje. En México existen, cuando menos, cuatro variedades: imbricata, argétea, cardenche y lloydii. (López y Medina 2009).



Figura 5. *Opuntia imbricata*. (Pasture and Roadside Plants, 2005).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN DEL AREA DE ESTUDIO**

El mencionado experimento fue realizado en el año 2012 mediante una sinergia de colaboración de dos universidades prestigiadas de la ciudad de Saltillo, Coahuila, la primera es la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en su laboratorio de Producción Animal el cual pertenece al departamento de Producción Animal; la segunda es en la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC) en su laboratorio de Biotecnología Ambiental el cual pertenece al departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas.

#### **3.2 MATERIALES**

##### **3.2.1 Material y equipo de laboratorio utilizado**

- Rectores Bach esterilizados
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml.
- Jeringas de 3 ml.
- Viales plásticos de 3 ml.
- Centrifuga para viales
- Micropipetas para cromatógrafo
- Cromatógrafo de gases *Varian Star 3400* (Outlet: 150 vamax, 120 vao) para determinación de metano
- Cromatógrafo 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 utilizado**

- Líquido ruminal de animal fistulado

- Saliva artificial la cual está 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:**

- NaCl 4.7 g.
- KCl 4.7 g.
- CaCl<sub>2</sub> 0.4 g.
- MgCl 0.6 g.
- Alimento: 50% maíz y 50% alfalfa (molido)
- Coyonoxtle deshidratado: entero (10 gramos) y en trozos (5 gramos)
- Coyonoxtle con biopelícula de microorganismos.

### 3.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES REACTORES

#### 3.3.1 Reactores a evaluar.

Los reactores de este experimento están en listados y distribuidos en el siguiente cuadro:

REACTOR	CONTENIDO
1	cyE(b)+lr+1 g de sustrato
2	cyE(b)+lr+1 g de sustrato
3	cyT(b)+lr+1 g de sustrato
4	cyT(b)+lr+1 g de sustrato
5	cyE(b)(sin lr)+1 g de sustrato
6	cyE(b)(sin lr)+1 g de sustrato
7	cyT(b)(sin lr)+1 g de sustrato
8	cyT(b)(sin lr)+1 g de sustrato

cyE: coyonoxtle entero. cyT: coyonoxtle en trozos. lr: líquido ruminal. (b): biopelícula. (sin lr): sin líquido ruminal. Sustrato (50% alfalfa + 50% maíz)

Cuadro 2. Distribución de los reactores de prueba.

### **3.3.2 OBTENCION DE LÍQUIDO RUMINAL**

El líquido ruminal se obtuvo de un toro previamente fistulado el cual fue proporcionado por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro mediante el departamento de Nutrición Animal, dicho toro se encuentra en las instalaciones de la unidad metabólica del departamento en mención. Para obtener el líquido ruminal, previamente el toro debe quedar dietado por un lapso de 12 horas antes de la extracción, durante estas horas el animal tendrá a su disposición agua a libre acceso, cabe mencionar que su alimentación era a base de heno de alfalfa.

La extracción del líquido ruminal se llevó a cabo al día siguiente, por lo cual, el toro se sujetó en una prensa de manejo para facilitar la acción. Previamente a esto, se debe de tener un termo con agua caliente, un embudo de boca ancha y una tela de algodón porosa, posteriormente se procede a la extracción del líquido ruminal siguiendo los pasos a continuación mencionados:

- Se destapa la fistula ruminal del toro.
- Con una mano enguantada se extrae parte del contenido ruminal lo más rápido posible.
- Depositar el contenido ruminal en el embudo previamente con la tela porosa.
- Se procede a exprimir dicha tela para la extracción del líquido, así sucesivamente hasta completar medio litro.

El líquido extraído debe de ser colocado en el termo para así conservar la temperatura adecuada que es de 38 a 40°C aproximadamente.

Después el líquido recolectado fue llevado al laboratorio para ser mezclado con la saliva artificial.

### **3.3.3 PREPARACIÓN DE LA SALIVA ARTIFICIAL**

Para la elaboración de saliva artificial Mc Dougal se procedió a como indica la técnica mencionada por Tejada (1992), la cual describe lo siguiente: la solución amortiguadora se prepara adicionando con 100 ml de la solución 2 a 1 litro de la

solución 1. Se agita la mezcla durante 15 min hasta lograr homogenizar la solución.

### **3.3.4 COMBINACION DE SALIVA ARTIFICIAL Y LÍQUIDO RUMINAL**

Para esta preparación se tomaron 250 ml de líquido ruminal extraído del toro fistulado lo cual se mezcla entre sí con un 1 litro de saliva artificial, se procede a realizar dicha mezcla lo más rápido posible para mantener una temperatura de 38 a 40°C, así mismo se burbujea el medio con gas CO<sub>2</sub> para dar las condiciones anaeróbicas que se requieren y posteriormente realizar el llenado de los reactores.

### **3.3.5 PREPARACION DEL COYONOXMLE (*Opuntia Imbricata*)**

Para la preparación del coyonoxtle, son colocados trozos grandes de coyonoxtle de 10 gramos aproximadamente y trozos pequeños de 5 gramos en una estufa con temperatura controlada a 80°C. Los cuales son sometidos a esta condición por un lapso de 24 horas para así extraerles la mayor cantidad de humedad para posteriormente ser utilizados en la preparación de la biopelícula adherida al coyonoxtle que servirá de soporte para la misma.

### **3.3.6 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE MICROORGANISMOS RUMINALES EN TROZOS DE COYONOXMLE**

Para realizar la formación de la biopelícula en Coyonoxtle (soporte), se procedió a colocar varios trozos de Coyonoxtle de los diferentes pesos (10 y 5 gramos) en un reactor con la preparación de líquido ruminal y saliva artificial en proporción 1:4 con 0.5 gramos del sustrato (50% alfalfa y 50% maíz) en un medio anaerobio al cual le fue adicionado CO<sub>2</sub> (gas) y una temperatura de 40°C durante 22 días empleando dos leves agitaciones diariamente (mañana y tarde). La formación de la biopelícula en el Coyonoxtle se puede apreciar en la Figura 6.

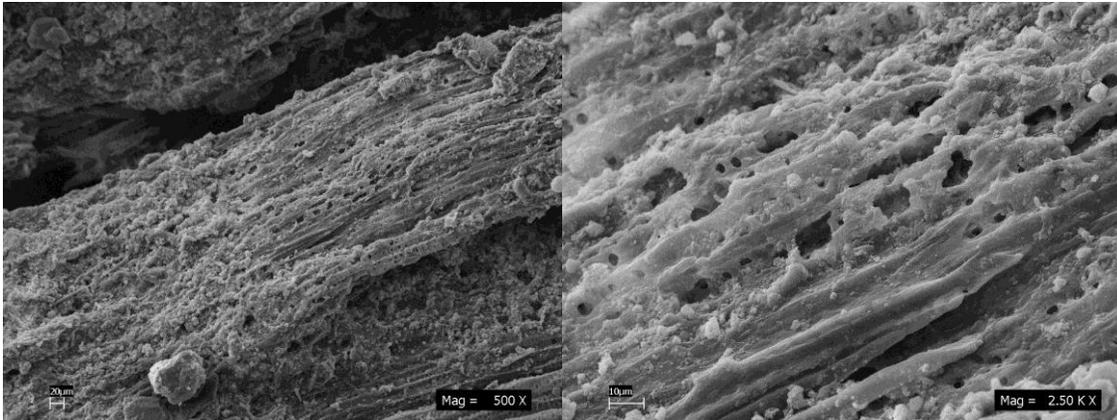


Figura 6. Formación de biopelícula en el soporte

### **3.4 DESARROLLO DE LA CINETICA**

#### **3.4.1 Preparación de los reactores**

En los reactores de prueba, 8 en total se colocaron en cada uno 1 gramo del sustrato empleado (50% alfalfa y 50% maíz), donde a 4 de estos reactores se les agrego 100 ml de la preparación de la saliva artificial - líquido ruminal y de igual manera a los 4 reactores restantes se le agrego solo saliva artificial (100 ml) todo esto con el propósito de probar el efecto único de los microorganismos presentes en la biopelícula, después se les coloco el coyonoxtle entero y en trozos, todos estos ya con la biopelícula formada; previamente de ser sellarlos herméticamente se sustituye el oxígeno con gas de CO<sub>2</sub> a cada uno de los reactores para dar las condiciones anaerobias. Después del sellado se colocan los reactores en baño maría a una temperatura controlada de 39 a 40°C agitando muy levemente.

#### **3.4.2 Tiempos de muestreo para determinación de metano y ácidos grasos volátiles (agv's)**

Metano: 0, 24, 48 y 72 horas

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

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

Metano: se sacan a cada uno de los reactores del baño maría para hacer la determinación de metano el cual consistió en extraer de la fase gaseosa directamente del reactor 25 micro litros extraídos con una micro jeringa especial de 100 micro litros para cromatógrafo de gases.

AGV's: se sacan los reactores uno por uno del baño maría, después con una jeringa de 3 ml es extraído 0.5 ml del líquido sobrenadante del propio reactor y posteriormente se colocan en tubos pequeños (viales) para cada uno de los reactores, al culminar con la totalidad de todos los reactores los viales fueron puestos en refrigeración a una temperatura de 5 °C hasta su posterior lectura.

### **3.4.4 Evaluación de la producción de metano**

Para la obtención de la lectura del metano se utilizó un cromatógrafo de gases *Varian Star 3400* (Outlet: 150 vamax, 120 vao) ubicado en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas (UAdeC), para lo cual la fase gaseosa sustraída (25 µl) con la micro pipeta de cada uno de los reactores de prueba fue inyectado directamente en el cromatógrafo para evaluar los picos de producción de metano en un tiempo aproximado de 2.5 min

Se debe tener en consideración que para tener lecturas correctas no debe de haber presencia de humedad en la jeringa.

Las máximas lecturas de producción de metano se obtienen en milivolts/segundo los cuales posteriormente se transforman a gramos/litro con ayuda de una fórmula de conversión la cual se presenta a continuación:

Formula de conversión: g/lit de metano= (volts+0.0177/25622)40000

### **3.4.5 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV's)**

Para obtener la lectura de los AGV's, los viales de extracción del sobrenadante de cada uno de los reactores fueron sacados del refrigerador y puestos a temperatura

ambiente. Una vez realizado esto, se procedía a someterlos a centrifugación para evitar restos de partículas al inyectar en el cromatógrafo.

La centrifugación fue realizada en un centrifuga especial a 2000 rpm por 10 minutos. Del sobrenadante líquido (sin restos de partículas) se extrajo 1 micro litro de cada vial y se inyectó directamente en el cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, ubicado en el laboratorio de Nutrición animal de la UAAAN.

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 calibrado el cromatógrafo se procedía a inyectar la muestra de cada uno de los reactores, hasta terminar la corrida y apreciar los picos de producción (lecturas) de los ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico), en este orden de aparición, en una concentración de miligramos/litro.

### **3.5 Variables estudiadas**

- Producción de ácido acético
- Producción de ácido propiónico
- Producción de ácido butírico
- Producción de ácidos grasos totales
- Producción de metano

### 3.6 Diseño experimental

El diseño estadístico utilizado fue en completamente al azar considerando en arreglo factorial con igual número de repeticiones.: dos niveles del factor A y dos del B.(Steel and Torrie,1980)

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

$Y_{ijk}$ = respuesta

$\mu$  = Media

$A_j$ = factor A

$B_j$ = factor B

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

$e_{ijk}$ = error experimental

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo de investigación donde se está evaluando el efecto que tiene el Factor A (coyonoxtle entero cyE y coyonoxtle en trozos cyT) en combinación con el Factor B (con y sin líquido ruminal), en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's) y metano se mencionan a continuación.

#### **4.1 Ácido acético.**

Por lo que respecta al ácido acético, es bien conocido el papel que juega y que es determinante para la producción de leche, ya que ésta puede aumentarse como resultado de un incremento en la absorción de ácido acético a través del rumen, pero no así con el aumento de propiónico o butírico (Rook y Balch, 1964). Esto repercute en la cantidad de leche, el contenido de sus principales componentes y en forma especial de la grasa, ya que aproximadamente el 50% de los ácidos grasos, sobre todo aquellos con menos de 16 carbonos, se originan a partir del ácido acético (Annison y Linzell, 1964).

En el análisis de varianza para la variable ácido acético, considerando el Factor A y el Factor B, se observó una falta de significancia ( $P \leq 0.05$ ) para los factores involucrados.

Sin embargo, en el Cuadro 3 y Figura 7 se puede apreciar el comportamiento que tuvieron las cuatro combinaciones de tratamientos, destaca cyT(b) tanto con y sin líquido ruminal ya que son los más sobresalientes a las 48 h de exposición. El cyT(b) sin líquido ruminal marca una superioridad sobre el resto a partir de las 48 h y continúa esa tendencia hasta las 96 h, aquí se puede observar el efecto que tiene la biopelícula de microorganismos ruminales en el medio con saliva (sin líquido ruminal) lo que indica que los microorganismos adheridos a la biopelícula están trabajando de una manera más organizada y eficiente por consecuente se refleja una mayor producción para este ácido en mención. Así mismo para cyE(b) sin líquido ruminal manifiesta una tendencia a ir incrementando a lo largo de la cinética. En promedio, la combinación de tratamientos de cyT(b) tuvo mejor comportamiento que aquellos tratamientos que incluyen cyE(b) con y sin líquido ruminal a partir de las 48 horas.

Cuadro 3. Producción de ácido acético (mM/l) en tratamientos

Tratamientos	0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
<b>CyE(b)+lr+d</b>	2.64	5.20	14.44	16.02	7.71
<b>CyE(b)+sa+d</b>	2.42	7.16	15.03	18.83	24.11
<b>CyT(b)+lr+d</b>	2.27	5.18	18.67	16.97	26.28
<b>CyT(b)+sa+d</b>	2.24	2.29	28.33	38.49	34.98

cyE= coyonoxtle en entero, cyT= coyonoxtle en trozos, lr= líquido ruminal, sa= saliva artificial d= sustrato

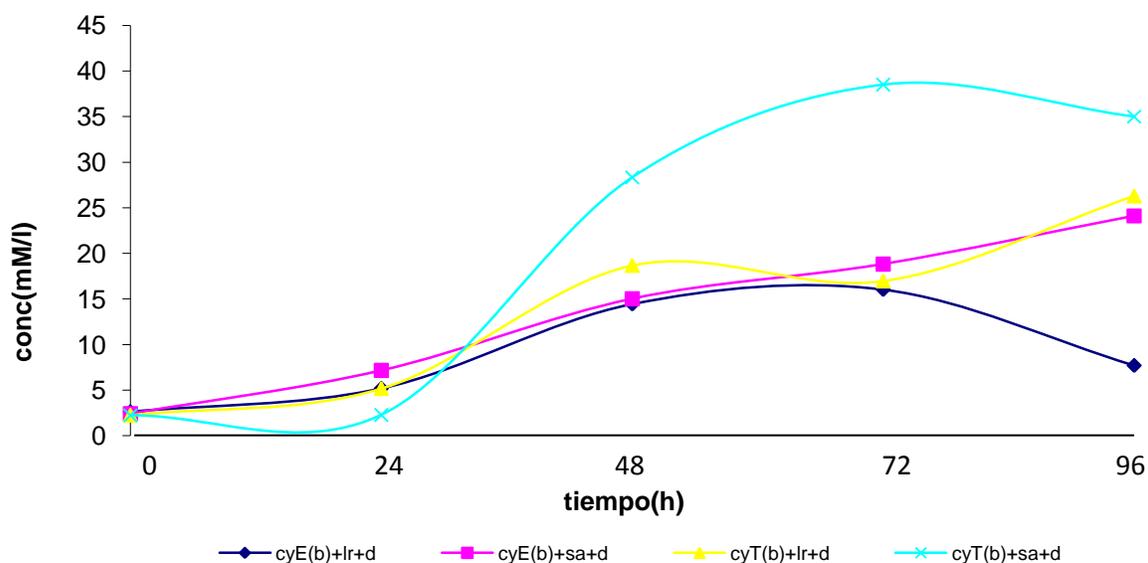


Figura 7. Producción de ácido acético con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal

Así mismo, en la Figura 8 se pueden apreciar las líneas de regresión de las cuatro combinaciones de tratamientos, todas muestran un incremento positivo (ya que los coeficientes de regresión son mayores a cero). Sobresale, la línea de regresión para cyT(b) sin líquido ruminal, su coeficiente de regresión indica que por cada hora de incremento de tiempo de exposición, el ácido acético se incrementa 0.75 mMol/l. Por otro lado, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para todos los tratamientos es mayor de 0.9 lo que indica que la producción de este ácido (y)

depende en un valor superior a 90% del tiempo (x) transcurrido en la cinética. Esto demuestra que la producción de ácido acético va en incremento conforme transcurren los tiempos de la cinética.

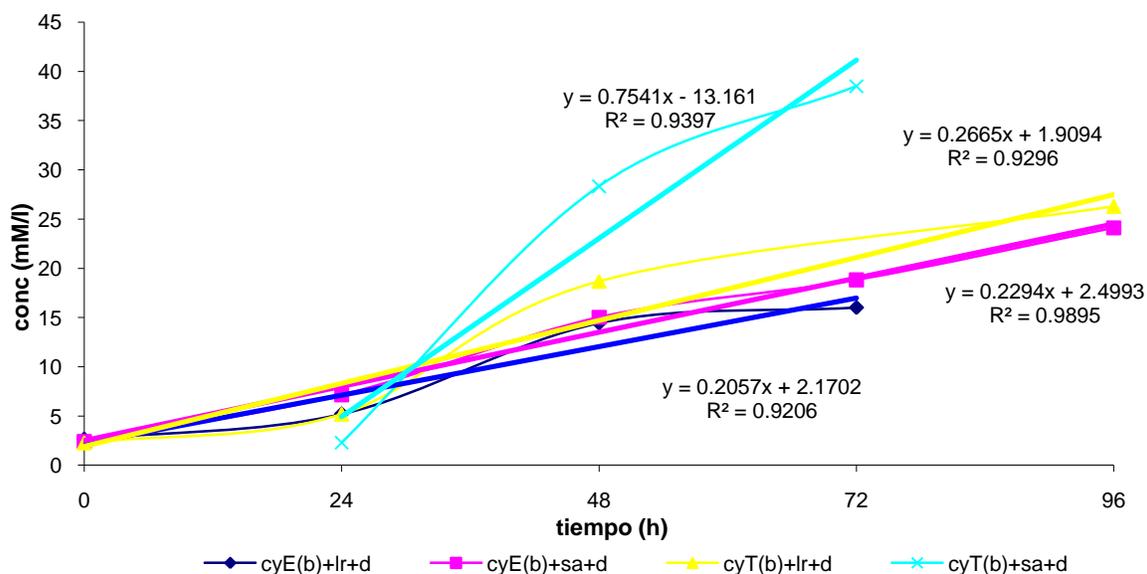


Figura 8. Líneas de regresión para ácido acético de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal

## 4.2 ÁCIDO PROPIÓNICO

Este ácido graso volátil es el único que el hígado puede transformar en glucosa mediante la gluconeogénesis, y se distribuye a través de torrente sanguíneo y llega al músculo y de esta forma está muy ligado con la producción de carne. La proporción de glucosa que se puede obtener a partir del ácido propiónico varía de entre un 19% a 62% (Steel y Leng, 1973).

Para el ácido propionico el análisis de varianza es ilustrado en el Cuadro 1A. Esta variable resultó significativa ( $P \leq 0.05$ ) para el factor A (cyE y cyT) indicando, que las medias de tratamiento para cyE y cyT son diferentes, también se observó

significancia para la interacción del factor A con el factor B (con y sin líquido ruminal) lo cual indica que las medias de los diferentes niveles tuvieron respuestas contrastantes. La producción de ácido propiónico puede ser ilustrada en el Cuadro 4 y Figura 9, en la cual se observan las diferentes combinaciones de tratamiento. Sobresale cyE(b) con líquido ruminal a las 24 h con un valor de 8.29 mMol/l sobre el resto de los tratamientos; sin embargo, a las 48 h. empieza a sobresalir la combinación de tratamiento cyT(b) con líquido ruminal (14.66 mMol/l) y continúa esta tendencia hasta las 96 h, esta misma tendencia se observa para cyE(b) hasta las 72 horas. En este tratamiento se hizo presente la biopelícula con el líquido ruminal con la superioridad antes mencionada, esta condición es más parecida a lo que se tiene en un animal ya que está presente el líquido ruminal, esto demuestra que el trabajo conjunto de los microorganismos pueden ser factor determinante para la producción de ácido propiónico.

Cuadro 4. Producción de ácido propiónico (mM/l) en tratamientos

<b>Tratamientos</b>	<b>0 hrs</b>	<b>24 hrs</b>	<b>48 hrs</b>	<b>72 hrs</b>	<b>96 hrs</b>
<b>CyE(b)+lr+d</b>	0.12	8.29	9.45	11.03	6.26
<b>CyE(b)+sa+d</b>	0.00	0.35	3.06	5.96	6.94
<b>CyT(b)+lr+d</b>	0.00	2.46	14.66	10.65	17.01
<b>CyT(b)+sa+d</b>	0.00	0.00	6.92	8.79	8.06

cyE= coyonoxtle en entero, cyT= coyonoxtle en trozos, lr= líquido ruminal, sa= saliva artificial d= sustrato

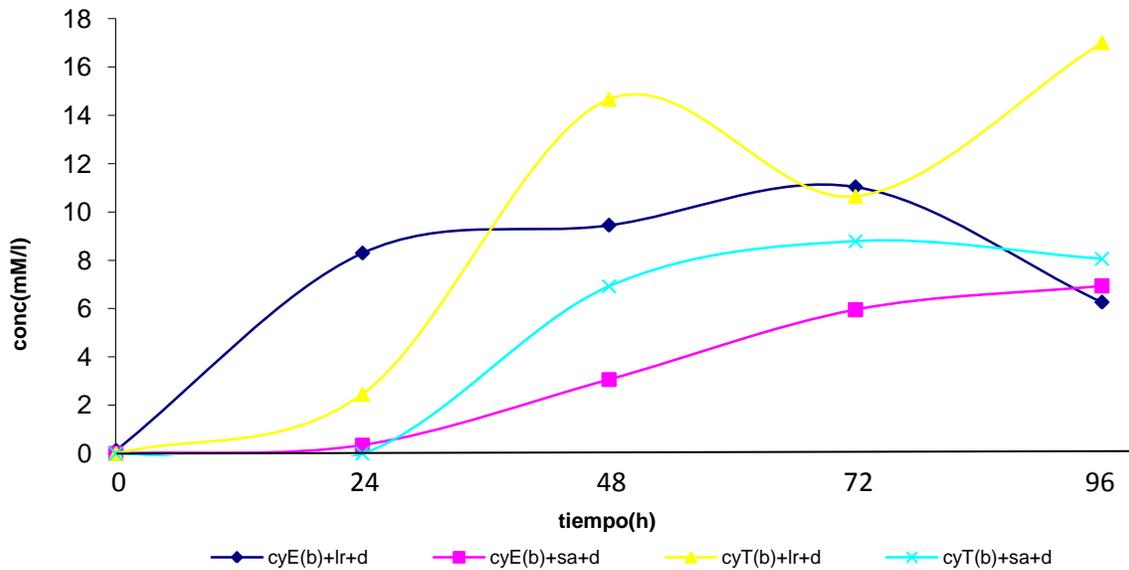


Figura 9. Producción de ácido propiónico con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal

Las líneas de regresión de las cuatro combinaciones de tratamientos para ácido propiónico son ilustradas en la Figura 10 y muestran una tendencia positiva, sobresale por su superioridad la línea de regresión de cyT(b) con líquido ruminal, la cual indica que por cada hora de exposición en la cinética habrá un incremento en el ácido propiónico de 0.19mMol/l, este modelo también se considera confiable ya que su coeficiente de determinación es alto (0.84), sin embargo también se aprecia que para cyT(b) sin líquido ruminal presenta una producción de 0.18 mMol/l en cada tiempo de la cinética, presentando una  $R^2$  de 0.90. Esto indica que para este caso existe una buena tendencia a la producción de este ácido aunque estadísticamente sea inferior al cyE(b) con líquido ruminal.

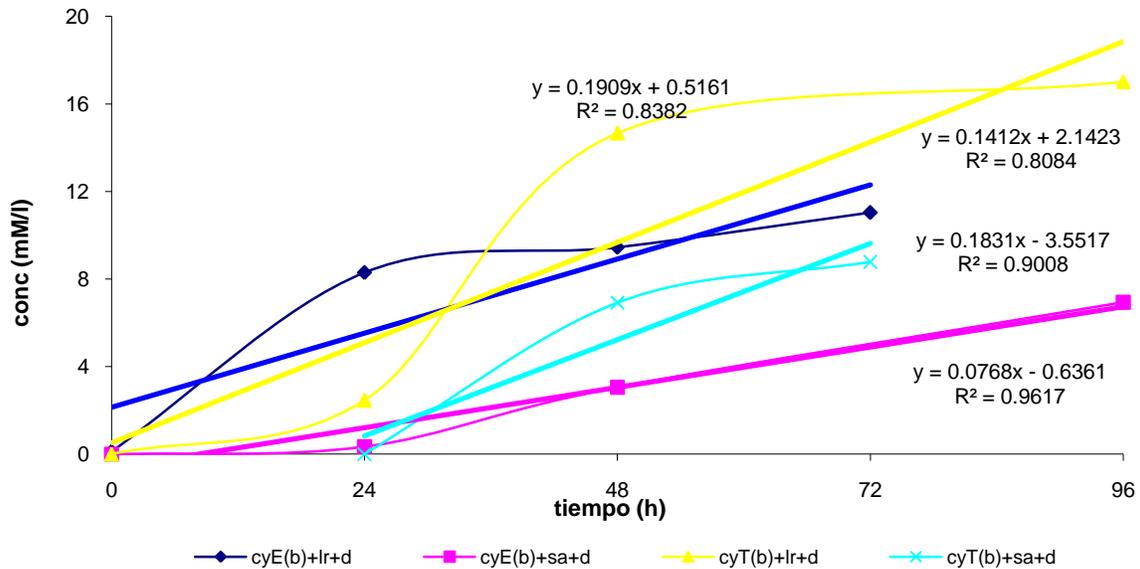


Figura 10. Líneas de regresión para ácido propiónico de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.

### 4.3 ÁCIDO BUTÍRICO

El ácido butírico es de vital importancia para los rumiantes, este es oxidado y absorbido en forma de  $\beta$ -hidroxibutírico en los tejidos para la producción de energía y colabora en la síntesis de las grasas corporales esenciales para la producción de leche. En la glándula mamaria el ácido  $\beta$ -hidroxibutírico se utiliza como fuente de energía, y en combinación con el acetato actúa como precursor de ácidos grasos de cadena corta saturados que se sintetizan en este tejido.

Una de las características de la leche de los rumiantes es la existencia de ácidos grasos que poseen de 4 a 10 carbonos, lo que se debe en parte la incorporación de este ácido  $\beta$ -hidroxibutírico (Leng y Annison, 1964).

En relación al análisis de varianza para ácido butírico, este puede ser apreciado en el Cuadro 3A, donde hubo falta de significancia para los factores A y B, sin embargo, para la interacción del factor A con el factor B se muestra una

significancia ( $P \leq 0.05$ ) para los diferentes niveles de medias de tratamiento y donde esto puede ser apreciado en la Figura 11.

De la combinación de tratamientos que se muestran en el Cuadro 5 y Figura 11 sobresale a las 24 horas el cyE(b) con líquido ruminal pero esta tendencia tiende a disminuir conforme pasa el tiempo de exposición.

Por otro lado en promedio las combinaciones de tratamientos sin líquido ruminal para cyE(b) y cyT(b) muestran superioridad después de las 48 horas de exposición.

Tanto para cyE(b) y cyT(b), la biopelícula por si sola muestra la misma superioridad que se reflejo para el ácido acético y que tiene el mismo efecto (la máxima producción de AGV's) positivo. La biopelícula muestra esta superioridad ya que los microorganismos están establecidos y los hace más eficaces en su metabolismo.

Cuadro 5. Producción de ácido butírico (mM/l) en tratamientos

Tratamientos	0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
<b>CyE(b)+lr+d</b>	0.68	14.29	10.00	12.96	7.89
<b>CyE(b)+sa+d</b>	0.11	5.68	13.84	16.98	14.23
<b>CyT(b)+lr+d</b>	0.45	4.18	12.70	8.81	14.29
<b>CyT(b)+sa+d</b>	0.11	9.07	13.74	15.42	13.78

cyE= coyonoxtle en entero, cyT= coyonoxtle en trozos, lr= líquido ruminal, sa= saliva artificial d= sustrato

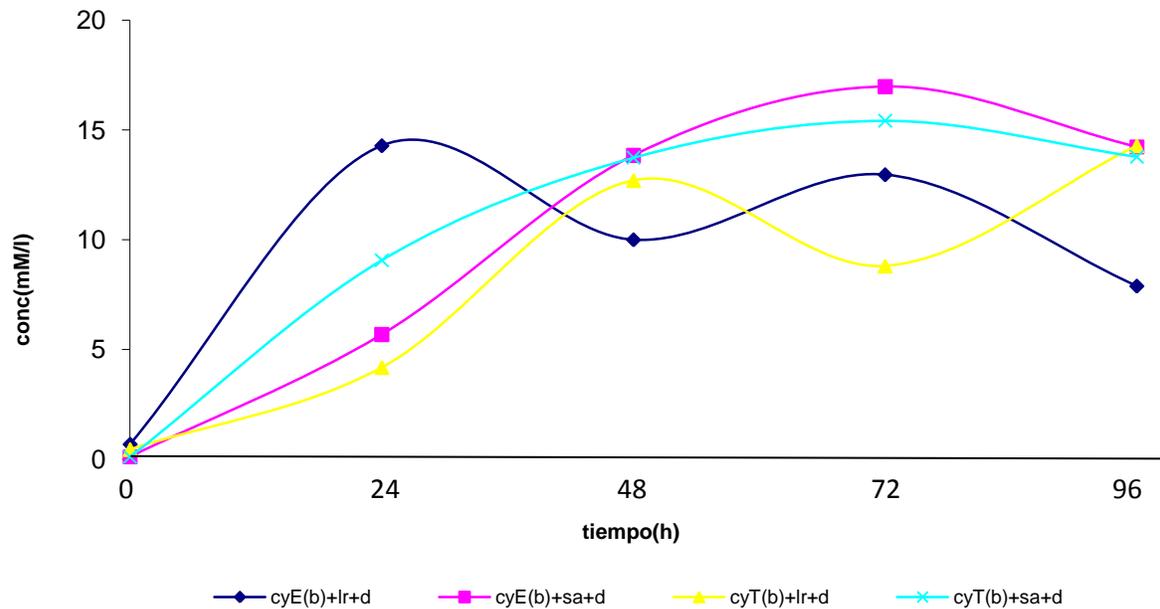


Figura 11. Producción de ácido butírico con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal

En la Figura 12 se presentan las diferentes ecuaciones de regresión para ácido butírico, indicando que todos los coeficientes de regresión son positivos, sin embargo la combinación de tratamiento cyE(b) sin líquido ruminal refleja un incremento en dicho ácido de .24 mMol/l por cada hora de exposición durante la cinética, además la variación atribuida a regresión es explicada en un 97%, la misma tendencia se observa para cyT(b) sin líquido ruminal. Todo esto explica que los microorganismos adheridos dentro de una biopelícula presentan mayor eficiencia para la producción de este ácido.

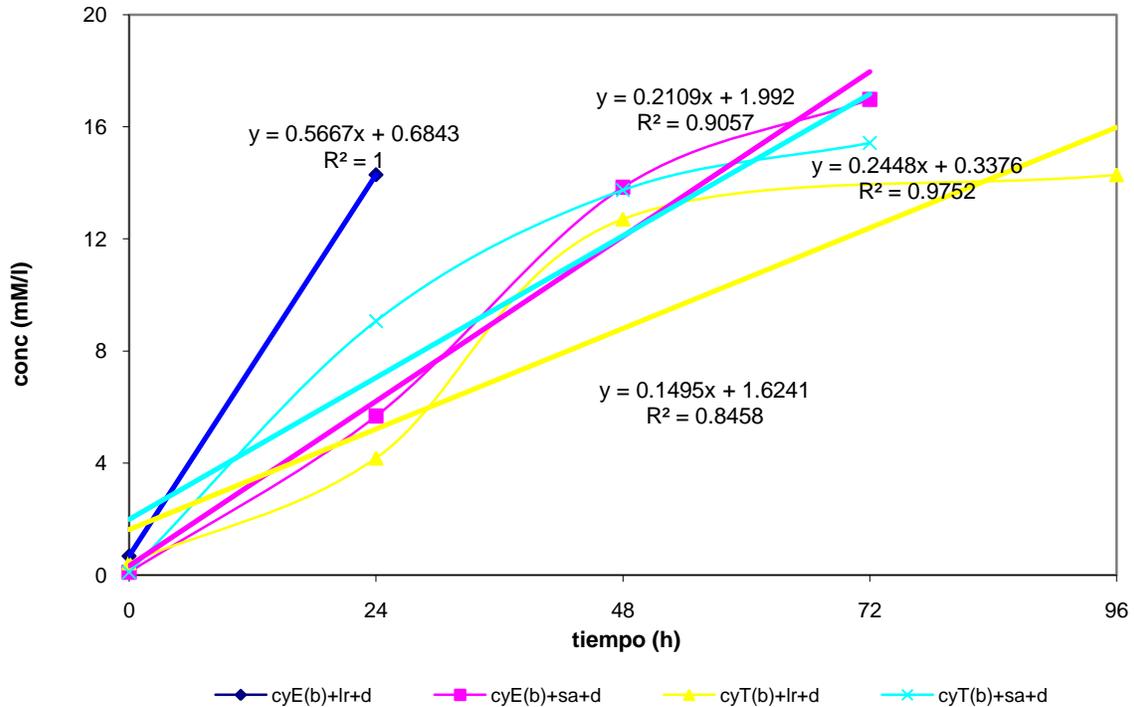


Figura 12. Líneas de regresión para ácido butírico de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.

#### 4.4 METANO

El metano es un producto final de la fermentación ruminal producido por las bacterias metanogénicas y se considera como una pérdida de energía, ya que este gas no es aprovechado ni transformado en AGV's.

Además este gas es expulsado del cuerpo del rumiante mediante eructos voluntarios y también a través de las heces (Blaxter, 1964).

En el Cuadro 5A se puede ver el análisis de varianza para metano, donde sólo el Factor B mostró una alta significancia ( $P \leq 0.01$ ), no siendo así para el resto de las fuentes de variación. Dicha significancia indica que hubo diferentes respuestas en magnitud para el Factor B (con y sin líquido ruminal) (Figura 13).

La producción de metano de las diferentes combinaciones de tratamientos puede ser observada en el Cuadro 6 y Figura 13.

Destacan por sus bajos valores de concentración de metano aquellos tratamientos sin líquido ruminal, con valores de 41.56 y 66.14 mMol/l para cyT(b) y cyE(b), respectivamente a las 72 horas de exposición. Ya que la producción de metano se denomina pérdida de energía estos tratamientos que tienen la biopelícula solo con saliva muestran que el trabajo organizado de los microorganismos es favorable para la producción de AGV's y la disminución de este gas nocivo para el animal, lo cual contribuye a la disminución de enfermedades por la acumulación y al medio ambiente en disminuir las emisiones de gas metano que es participe en el efecto invernadero. Por otro lado, los tratamientos que exhibieron los valores más altos en promedio de metano, fueron aquellos que incluyeron líquido ruminal, por un período desde 0 hasta las 72 horas de exposición tanto en cyE(b) y cyT(b) (Figura 13).

Cuadro 6. Producción de metano (mM/l) en tratamientos

<b>Tratamientos</b>	<b>0 HRS</b>	<b>24 HRS</b>	<b>48 HRS</b>	<b>72 HRS</b>
<b>CyE(b)+lr+d</b>	0.00	36.53	60.21	73.73
<b>CyE(b)+sa+d</b>	0.00	18.58	39.00	66.14
<b>CyT(b)+lr+d</b>	0.41	36.66	62.37	105.00
<b>CyT(b)+sa+d</b>	0.00	19.66	31.11	41.56

cyE= coyonoxtle en entero, cyT= coyonoxtle en trozos, lr= líquido ruminal, sa= saliva artificial d=sustrato

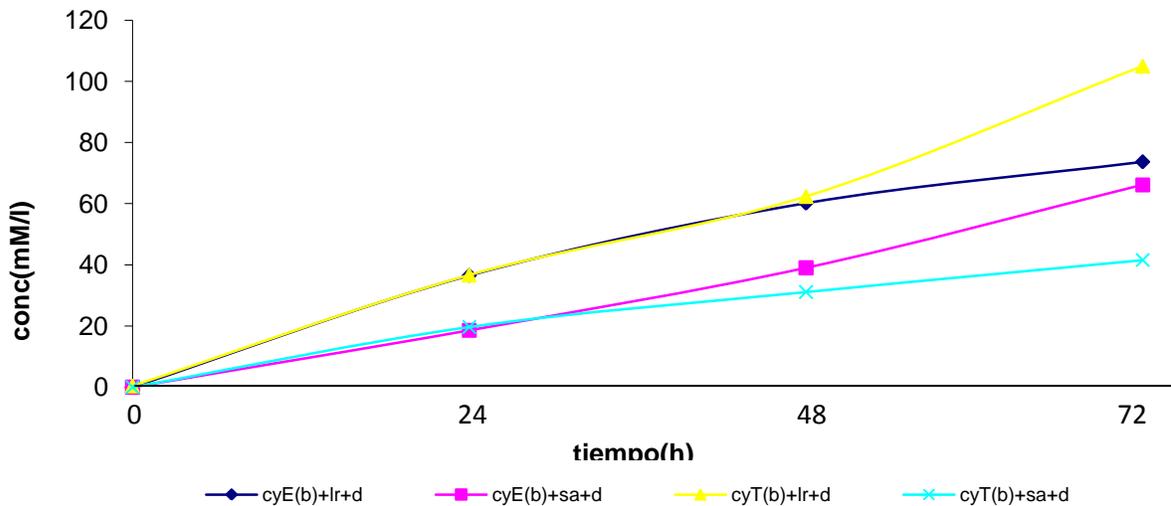


Figura 13. Producción de metano con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal.

Para el gas metano en las ecuaciones de regresión de cyT(b) sin líquido ruminal es la que muestra la menor cantidad de incremento en dicho gas (0.87) en función del tiempo, ya que el resto de las diferentes combinaciones de tratamientos mostraron coeficientes de regresión mayores a 1 (Figura 14).

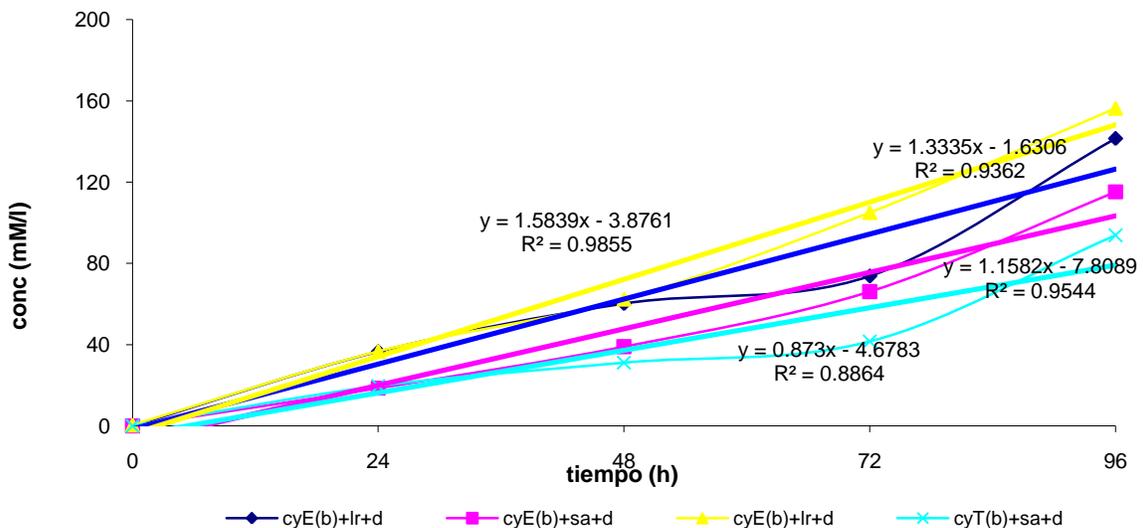


Figura 14. Líneas de regresión para metano de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.

#### 4.5 TOTALES DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV's)

Por lo que respecta al análisis de varianza de ácidos grasos volátiles (AGV's) totales solo el Factor A muestra una significancia al ( $P \leq 0.05$ ) de probabilidad, indicando que la respuesta de los diferentes niveles de tratamiento son diferentes para el cyT(b) y cyE(b) (Cuadro 7A).

La producción de AGV's (ácido acético, propiónico y butírico) es presentada en el Cuadro 7 y Figura 15. A las 24 horas de exposición destacan la combinación de tratamientos que incluyen cyE(b) tanto con y sin líquido ruminal con valores de 27.78 y 13.19 mMol/l. lo contrario se observa a las 48 horas de exposición ya que los valores más altos los tuvo la combinación de tratamientos de cyT(b) con y sin líquido ruminal. Esta tendencia de superioridad en promedio de cyT(b) se reflejó hasta a las 96 horas. Los tratamientos con cyT(b) en trozos presentan una diferencia muy marcada con la biopelícula con saliva artificial, lo que sigue mostrando que la biopelícula trabaja de una manera favorable debido a la asociación de los microorganismos presentes en la misma. Así mismo, es mencionado por la literatura que microorganismos asociados y adheridos formando una biopelícula permiten el intercambio de sus genes lo cual los hace más eficientes en conjunto, por lo tanto se ve reflejado en una mayor respuesta de la biopelícula (Stoodley et, al. 2002).

Cuadro 7. Producción de ácidos grasos volátiles totales (mM/l) en tratamientos

Tratamientos	0 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
<b>CyE(b)+lr+d</b>	3.45	27.78	33.89	40.02	21.86
<b>CyE(b)+sa+d</b>	2.53	13.19	31.93	41.76	45.28
<b>CyT(b)+lr+d</b>	2.71	11.82	46.04	36.43	57.58
<b>CyT(b)+sa+d</b>	2.34	11.36	48.99	62.69	56.82

cyE= coyonoxtle en entero, cyT= coyonoxtle en trozos, lr= líquido ruminal, sa= saliva artificial d= sustrato

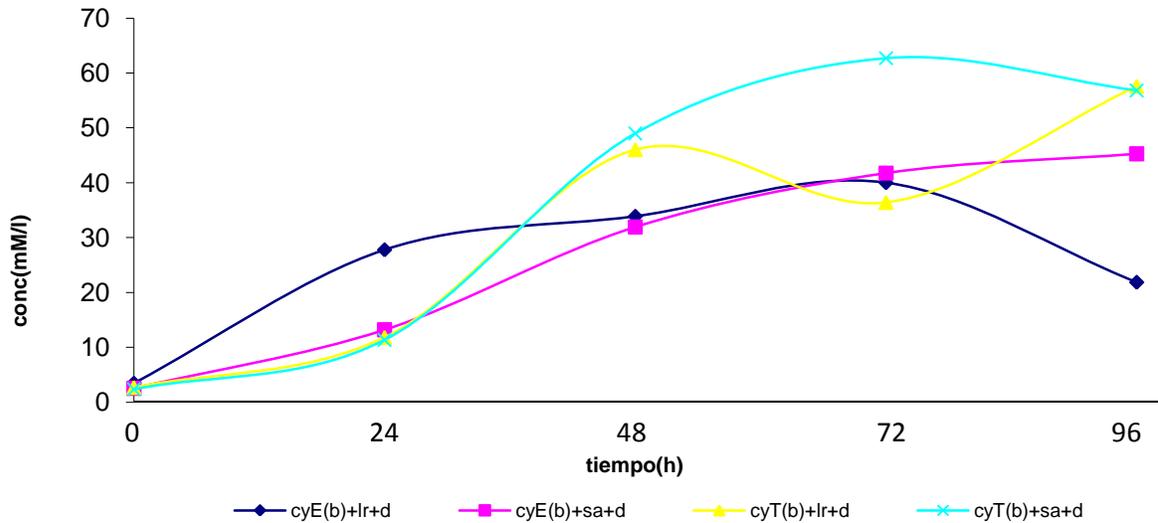


Figura 15. Producción total de agv's con 50% maíz- 50% alfalfa con y sin líquido ruminal.

Para el total de ácidos grasos volátiles (AGV's) la mejor respuesta de tratamiento fue para cyT(b) sin líquido ruminal ya que así la demuestra su línea de regresión que tiene un coeficiente de regresión de .91 mMol/l por cada hora de exposición y la variación debido a la regresión es de 94%, lo cual indica la confiabilidad del modelo (Figura 16).

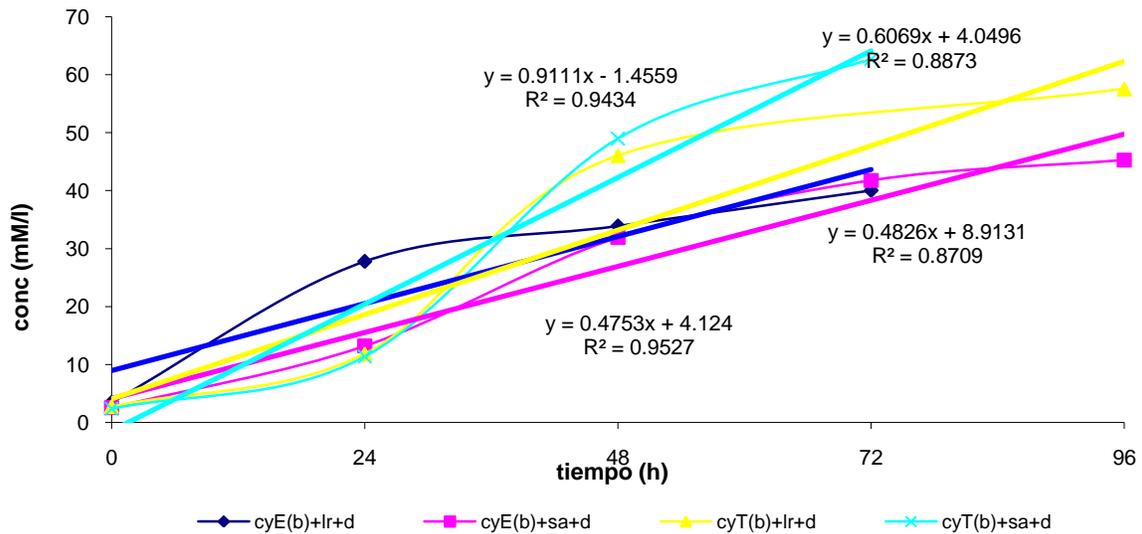


Figura 16. Líneas de regresión para total de agv's de las diferentes combinaciones de tratamiento con 50% maíz-50% con y sin líquido ruminal.

## V. CONCLUSIONES

Las conclusiones más sobresalientes de este trabajo se pueden enumerar de la forma siguiente:

1. Para ácido acético después de las 48 horas se observó una mayor respuesta en aquellos tratamientos sin líquido ruminal. El mejor tratamiento fue cyT(b) sin líquido ruminal a partir de las 48 horas. Aquí se aprecia el papel tan importante de la biopelícula en la respuesta observada
2. Por lo que se refiere al ácido propiónico, se observó lo inverso que en el ácido acético, o sea que los valores promedio para cyE(b) y cyT(b) con líquido ruminal fueron superiores a las combinaciones de tratamiento sin líquido ruminal; esto fue a partir de las 24 horas de exposición. También se observa que a partir de las 48 horas en promedio los tratamientos que involucran cyT(b) fueron superiores a los de cyE(b). En este caso la biopelícula trabaja mejor para la producción de este ácido en conjunto con el líquido ruminal.
3. Se observó que el ácido butírico tuvo el mismo comportamiento que el ácido acético ya que cyE(b) y cyT(b) sin líquido ruminal, teniendo mayor respuesta a partir de las 48 horas y hasta finalizar las 96 horas de exposición excepto a las 24 horas ya que con líquido ruminal se presentaron las máximas lecturas.
4. Todas aquellas combinaciones de tratamientos sin líquido ruminal presentaron las más bajas lecturas de metano contra aquellas que contienen líquido ruminal durante todo el experimento. Esto muestra que la producción excesiva de gas metano está ligada a que los microorganismos que no estén presentes en una biopelícula forman más metano a los que están organizados en una biopelícula.
5. Se observó que para el total de ácidos grasos volátiles (AGV's) después de las 48 horas, las mayores lecturas se presentaron en las combinaciones de tratamiento sin líquido ruminal. La misma tendencia de superioridad se

encontró a las 48 horas en adelante para cyT(b) y cyE(b). Para el caso de totales de AGV's muestra que la biopelícula presente en cyT(b) y cyE(b) sin líquido ruminal juega un papel muy importante para la producción conjunta de estos ácidos importantes para la producción pecuaria. La cual predice que es importante el trabajo conjunto de los microorganismos.

## VI. LITERATURA CITADA

- Allen, M. S. and M. Mertens. 1988 Evaluating constraints on fiber digestion by rumen. *J. Nutr.* 118:261-270.
- Ángeles. S.C 2013. Fermentación ruminal, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. Departamento nutrición animal y bioquímica FMVZ UNAM.
- Annison, E. F. 1965 *Physiology of digestion in the ruminant*. Butterworth, London, 1ª Edición, p. 185..
- Anonymous, 2011 Biofilm formation  
<http://microbialecolgynotes.wordpress.com/tag/microbial-ecology>
- 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.* p. 485,
- Bath, I. H. and J. A. F. Rook. 1963. The evaluation of cattle foods and diets in terms of the ruminal concentration of volatile fatty acids. I. The effects of level of intake, frequency of feeding, the ratio of hay to concentrates in the diet, and of supplementary feeds. *J. Agr. Sci.* 61: 3-11-348.
- Bath, I. H. and J. A. F. Rook. 1965. The evaluation of the cattle foods and diets in terms of the ruminal concentration of volatile fatty acids. II. Roughages and succulents. *J. Agr.* 64: 67-75.
- Bedoya, V, 2010. Biopelículas, Biología tecnológica archivo de blog, [www.biologiatecnologicaiti.blogspot.mx](http://www.biologiatecnologicaiti.blogspot.mx)
- Blaxter K. L. Ph D. 1964. *Energy of the Ruminants*. Director del departamento de nutrición del Hannah Dairy Research Institute.
- Blaxter, K. L. and F. W Wainman. 1964. Utilization of food by sheep and cattle. *J. Agr. Sci.* 57: 419-422.
- Calsamiglia, S. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de especialización FEDNA. Madrid

- Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato, y J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Pág. 595-623 en: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. T. Tsuda, Y. Sasaki, y R.Kawashima, Eds. Academic Press. London.
- Chesson, A., y C. W. Forsberg. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pág. 251-284 en: The rumen microbial ecosystem. P. N. Hobson, Ed. Elsevier, NY.
- Church, D. C. 1974. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Church, D. C. and R. G. Petersen. 1960 Effect of several variables on in vitro rumen fermentation. J. Dairy Sci. 43: 81-92.
- Church, D.C. 1979. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants OSU Boock Stores Inc. Oregon
- Chynoweth D P, Haley P, Owens J, Teixeira A, Townsend T, Xu Q and Choi H. L. 2003. Anaerobic composting for recovery of nutrients, compost, and energy from solid waste during space missions. In: Pullammanappallil P, McComb A, Diaz LF, Bidlingmaier W (eds) Proceedings of the 4th international conference of ORBIT association on biological processing of organics. ORBIT , Perth, pp 126–135
- Confer D. R. and B. E. Logan 1997. Molecular weight distribution of hydrolysis products during biodegradation of model macromolecules in suspended and biofilm cultures.1. Bovine serum albumin. Water Res 31:2127–2136
- Costerton. J. W. 1995. Overwiev of microbial biofilms. J. Indus. Microbiol.15: 137-140.
- Costerton. J. W. K J Cheng, G G, Geesey. T I, Ladd. I J G, Nicke. Dasguptaand. Marrie T J 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41:435–464.
- Díaz R. A., B.J. Galindo, S. R. Bocourt, S. M. Laurenciano, Q. M. Pérez, 2007 Los microorganismos del rumen y su papel en la fisiología digestiva

del rumiante. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Facultad de Agronomía, Instituto de Ciencia Animal La Habana. Cuba

- Donland R.M. 2002 Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*; 8 (9): 881-90.
- Flemming, H. C, and J. Wingender. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)—part I: structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* 43:1–8
- Fondevilla, M., and B. A. Dehority. 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in co-culture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.* 77:541-548.
- Fonty, G and K. N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: Their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. pp. 655-679. In: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (eds.). Academic Press, San Diego.
- Grenet, E.; A. Breton; P. Barry and P. Fonty. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonization as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Technol*, 26: 55-70.
- Harrison, J.J. Raymond J. Turner, Lyriam L. R. Marques y Howard Ceri. 2006. *Biopelículas. Investigación y Ciencia*.
- Hébraud, M. and M. Fèvre. 1988. Characterization of glycosides and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromyces communis*. *J. Gen. Microbiol.* , 134: 1123-1129.
- Hidalgo, M. A. D. 2012. Tesis “Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV’s) *in vitro* en un sustrato (alfalfa-maíz) con la utilización de biopelícula de microorganismos ruminales. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo Coahuila.
- Ho, Y. W., N. Abdullah, y S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134:177-181

- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755-2766.
- Hungate R.E. 1950. The anaerobic mesophilic, cellulolytic bacteria. *Bact. Rev.* 14:1-149
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes.* Academy Press Inc., New York.
- Leng, R. A. and E.F. Annison. 1964. The metabolism of D(-) dhydroxybutyrate in sheep. *Biochem. J.* 90:464-469
- Lindsay, D. and Holy. V.A. 2008. Bacterial biofilms wthit the clinical setting: what health care professional should know. *J. Hosp. Infect,* 64:313-325
- López, J.J y, J. Medina G. 2009. Nopal forrajero: agroecología y manejo sustentable. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro pp 20 – 21
- MacLeod F A, S R. Guiot and J. W. Costerton. 1990 Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in an Up flow Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor *Applied and Environmental Microbiology,* June, p. 1598-1607.
- Marty, R. J. y T. R. Preston.1970 Proporciones molares de los ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV'S) producidas en el rumen de ganado vacuno alimentados con dietas altas en miel. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 4: 189-192,
- McDonald P, E, Edward R.A, J.F.D, Greenhalgh. C.A, Morgan. 1995 *Animal Nutrition* 5<sup>a</sup> Edition, editorial Addison Wesley
- Meyer, J. H.R. Kromann and W. N. Garrett.1965 *Physiology of digestion in the ruminant.* Butterworth, London, 1<sup>a</sup> Edición, p. 262, microbes. *J. Nutr.* 118:261-270.
- Moore, L. A.1964. Nutritive value of forage as affected by physical form. General principies involved with ruminants and effects of feeding pelleted or wafered forage to dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 23: 230-238
- Nava, C. y A. Diaz, 2001. *Introduccion a la digestión ruminal.* Departamento de nutrición animal, FMVZ UNAM.
- Orpin, C. G. 1979. Chemotaxis in rumen ciliate protozoa. *Proc. Soc. Gen. Microbiol.* 7:32-36.

- Orpin, C. G., y L. Bountiff. 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimástix frontalis*. J. Gen. Microbiol. 104:113-122.
- Orskov, E. R., and M. Ryle. 1998. Energy nutrition in ruminants. Chalcombe Publications, Painshall, Church Lane, Welton, Lincoln, LN2 3LT, UK.
- Orskov, E.R. and N.A. MacLeod. 1990. Dietary-induced thermogenesis and feed evaluation in ruminants. Proc. Nutr. Soc. 49. 227.
- Pasture and road plants. 2005. *Opuntia Imbricata*. The cholla. Good well and Texhoma, Oakland
- Phillipson, A. T. 1981. Digestión en el rumiante. En: Fisiología de los animales domésticos. H. H. Dukes y M. J. Swenson (Eds.). Aguilar Editor S.A. México.
- Pond W.G. D.C, Church, K.R y Pond. 2010. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales, segunda edición, traducción Limusa editorial México.
- REA (Real Academia de la Lengua Española). 2011.
- Redondo, P. A., 2003. Anatomía del aparato digestivo de un rumiante. Disponible en: <http://www.inea.uva.es>.
- Relling y Mattioli. 2003. Actualización de los autores del libro "Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes de Editorial EDULP (Ediciones 2002 y 2003).
- Rook, J.A.F and C.C. Balch 1964. The effects of intra ruminal infusions of acetic, propionic and butyric acids on the acid compositions of the milk of the cow. Brit. J. Nutr. 15: 361-369.
- Rotger. A. F. 2004. Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía proteína en terneras en cebo intensivo, tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, Facultad de Veterinaria
- Russell, J. B. 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49:572-579.
- Ryan, R. K. 1964. Concentrations of glucose and low molecular weight acids in the rumen of sheep following the addition of large amounts of wheat to the rumen. Am. J. Veto Res. 25: 646-652,

- Stams A. J. M. and C, M, Plugge. 2009 Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea *Nature Reviews Microbiology* 7, 568-577.
- Steel, J.W. 1973. Effects of plane of nutrition and pregnancy on gluconeogenesis in sheep. The kinetics of glucose metabolism. *Brit. J. Nutr.* 30:451.
- Steel, R.G. and J.H. Torrie.1980. Principles and Procedures of statistics. A Biometrical Approach. Second Edition.
- Stoodley P, K Sauer, DG Davies and JW Costerton. 2002. Review. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
- Tejada, I. 1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. México.
- Teruya. B. M. R. S/F. Aparato digestivo en ruminates. Fisiología Veterinaria 1. Facultad de Ciencias Veterinarias “Jose Benjamín” U.A.G.R.M. Disponible en: <http://slideshare.net>.
- Trei, J. E., W. J. Hale and B. Theurer.1966 Influence of grain processing factors on in vitro fermentation rate. *J. Anim. Sci.* 25: 910 (Resume).
- Universidad Católica de Chile. S/F. Aparato digestivo de los rumiantes. Producción Animal. Disponible en : [www.7.uc.cl\\_edu/prodam/](http://www.7.uc.cl_edu/prodam/).
- Universidad Nacional Autónoma de México(UNAM). S/F. Características generales del ganado bovino. Capítulo 5. Disponible en: [www.fmvz.mx/fmvz/e\\_bovina](http://www.fmvz.mx/fmvz/e_bovina).
- Van L, E. y Reguerio.M. 2008. Digestión en el retículo-rumen. Facultad de Agronomía. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay.
- Varga, G. A., y E. S. Kolver. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. *J. Nutr.* 127:819S-823S.
- Wang and Chen. 2009. Potential o-based biofuels production *Appl. Microbiol. Biotechnology* 83, 1-18

- Weston, R.H. 1968. The digestion of pasture plants by sheep.1. Ruminal production of volatile fatty by sheep of diets of rye grass and forage oats. *Asust. J. Agr.* 19:419-432
- Wetzel R. G. 1991 Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution and interspecific communication. In: Chrorst RJ (ed) *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer, New York, pp 6–28
- Whanger, P.D. and Matrone. G. 1967. Metabolism of latic, succinic and acrylic acids by rumen microorganism from sheep sulfur- adequate and sulfur-deficient diet. *Biochem . acta.* 136:27-35
- Williams, P.E.V. 1989. The mode of action of yeast culture ruminants diets: review of the effect on rumen fermentation patterns. In: T.P. Lyons Eds. *Alltech's 5th Annual symposium on Biotechnology in the Feed Industry*. Nicholasville. K.Y.
- Wolin M J. T, L, Miller and C, S, Stewart. 1997. Microbe–microbe interactions. In *The rumen microbial ecosystem* (ed. PH Hobson and CS Stewart), pp. 467–491. Chapman & Hall, London, UK
- Yokohama, M. T., y K. A. Johnson. 1998. *Microbiología del rumen e intestino*. Pág, 137-158.
- Zavaleta. E. S. S/F. Los ácidos grasos volátiles, fuentes de energía en los rumiantes. Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria. UNAM.

## VII. APÉNDICE

**Cuadro 1A. Análisis de varianza para ácido propiónico para un completamente al azar de 2 x 2.**

### ANALISIS DE VARIANZA

<u>FV</u>	<u>GL</u>	<u>SC</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>P&gt;F</u>
FACTOR A	1	70.389160	70.389160	13.5487*	0.022
FACTOR B	1	34.237854	34.237854	6.5902 <sup>ns</sup>	0.062
INTERACCION	1	46.416565	46.416565	8.9344*	0.041
ERROR	4	20.781067	5.195267		
<u>TOTAL</u>	<u>7</u>	<u>171.824646</u>			

\*, ns = significativo al 0.05 de probabilidad y no significativo

C.V. = 23.83%

**Cuadro 2A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para ácido propiónico.**

### TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR A

<u>FACTOR A</u>	<u>MEDIA</u>
1	6.600000
2	12.532500

### **TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR B**

<u>FACTOR B</u>	<u>MEDIA</u>
1	11.635000
2	7.497500

### **TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB**

#### **FACTOR B**

<u>FACTOR A</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>MEDIA</u>
1	6.2600	6.9400	6.6000
2	17.0100	8.0550	12.5325
MEDIA	11.6350	7.4975	9.5662

### **COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>
2	12.5325 A cyT
1	6.6000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 4.4741

### **COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B DENTRO DEL NIVEL 1 DEL FACTOR A**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>
2	6.9400 A
1	6.2600 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 6.3274

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B DENTRO DEL NIVEL 2 DEL FACTOR A**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
1	17.0100 A	cyT con liq. ruminal
2	8.0550 B	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 6.3274

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 1 DEL FACTOR B**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
2	17.0100 A	cyT con liq ruminal
1	6.2600 B	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 6.3274

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 2 DEL FACTOR B**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>
2	8.0550 A
1	6.9400 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 6.3274

**Cuadro 3A. Análisis de varianza para ácido butírico para un completamente al azar de 2 x 2.**

**ANALISIS DE VARIANZA**

<u>FV</u>	<u>GL</u>	<u>SC</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>P&gt;F</u>
FACTOR A	1	22.579224	22.579224	3.3369 <sup>ns</sup>	0.141
FACTOR B	1	6.919250	6.919250	1.0226 <sup>ns</sup>	0.371
INTERACCION	1	90.989990	90.989990	13.4469*	0.022
ERROR	4	27.066467	6.766617		
TOTAL	7	147.554932			

\*, ns = significativo al 0.05 de probabilidad y no significativo

C.V. = 31.33%

**Cuadro 4A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para ácido butírico.**

**TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR A**

<u>FACTOR A</u>	<u>MEDIA</u>
1	9.982500
2	6.622500

**TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR B**

<u>FACTOR B</u>	<u>MEDIA</u>
1	9.232500
2	7.372500

**TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB**

**FACTOR B**

<u>FACTOR A</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>MEDIA</u>
1	14.2850	5.6800	9.9825
2	4.1800	9.0650	6.6225
MEDIA	9.2325	7.3725	8.3025

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B DENTRO DEL NIVEL 1 DEL FACTOR A**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
1	14.2850 A	cyE con liq ruminal
2	5.6800 B	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 7.2211

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B DENTRO DEL NIVEL 2 DEL FACTOR A**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
2	9.0650 A	
1	4.1800 A	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 7.2211

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 1 DEL FACTOR B**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
1	14.2850 A	cyE con liq ruminal
2	4.1800 B	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 7.2211

**COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 2 DEL FACTOR B**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
2	9.0650 A	
1	5.6800 A	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 7.2211

**Cuadro 5A. Análisis de varianza para metano para un completamente al azar de 2 x 2.**

ANALISIS DE VARIANZA

<u>FV</u>	<u>GL</u>	<u>SC</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>P&gt;F</u>
FACTOR A	1	0.731934	0.731934	0.0283 <sup>ns</sup>	0.868
FACTOR B	1	610.750977	610.750977	23.6109 <sup>**</sup>	0.010
INTERACCION	1	0.460938	0.460938	0.0178 <sup>ns</sup>	0.895
ERROR	4	103.469238	25.867310		
<u>TOTAL</u>	<u>7</u>	<u>715.413086</u>			

\*\* , ns = significativo al 0.01 de probabilidad y no significativo

C.V. = 18.26%

**Cuadro 6A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para metano.**

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR A

<u>FACTOR A</u>	<u>MEDIA</u>
1	27.552500
2	28.157499

TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR B

<u>FACTOR B</u>	<u>MEDIA</u>
1	36.592499
2	19.117500

## **TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB**

### **FACTOR B**

<u>FACTOR A</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>MEDIA</u>
1	36.5300	18.5750	27.5525
2	36.6550	19.6600	28.1575
MEDIA	36.5925	19.1175	27.8550

## **COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B**

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
1	36.5925 A	con liq ruminal + metano
2	19.1175 B	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 9.9834

**Cuadro 7A. Análisis de varianza para ácido grasos volátiles totales para un completamente al azar de 2 x 2.**

### **ANALISIS DE VARIANZA**

<u>FV</u>	<u>GL</u>	<u>SC</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>P&gt;F</u>
FACTOR A	1	1116.753906	1116.753906	8.9376*	0.041
FACTOR B	1	256.738281	256.738281	2.0547 <sup>ns</sup>	0.224
INTERACCION	1	291.851563	291.851563	2.3358 <sup>ns</sup>	0.200
ERROR	4	499.798828	124.949707		
TOTAL	7	2165.142578			

\*, ns = significativo al 0.05 de probabilidad y no significativo

C.V. = 24.63%

**Cuadro 8A. Medias de Factor A, Factor B e interacciones para ácidos grasos volátiles totales.**

**TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR A**

<u>FACTOR A</u>	<u>MEDIA</u>
1	33.570000
2	57.199997

**TABLA DE MEDIAS DEL FACTOR B**

<u>FACTOR B</u>	<u>MEDIA</u>
1	39.719997
2	51.049999

**TABLA DE MEDIAS DE TRATAMIENTOS AB**

**FACTOR B**

<u>FACTOR A</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>MEDIA</u>
1	21.8650	45.2750	33.5700
2	57.5750	56.8250	57.2000
MEDIA	39.7200	51.0500	45.3850

## COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>MEDIA</u>	
2	57.2000 A	cyT+ agv
1	33.5700 B	

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

DMS = 21.9418