



III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013



DIRECTORIO UAEH

Mtro. Humberto A. Veras Godoy

Rector

Mtro. Adolfo Pontigo Loyola

Secretario General

Dr. Otilio A. Acevedo Sandoval

Director del Instituto de Ciencias Agropecuarias

Dr. Miguel Ángel Miguez Escorcía

Secretario Académico del Instituto de Ciencias Agropecuarias

Lic. Marco Antonio Romero Castillo

Subdirector Administrativo del Instituto de Ciencias Agropecuarias

Dr. Armando Peláez Acero

Jefe del Área Académica de MVZ



www.ivconamipe2013.wix.com/iicimpe2013





**DOCUMENTOS EN EXTENSO DE LOS
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN
PRESENTADOS EN LA MODALIDAD
ORAL**



NIVEL DE CUAJILOTE (*Parmentiera edulis*) EN UN MEDIO DE CULTIVO PARA PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN

Ley de Coss A.¹, *De León de León W.², Marroquín Agreda Fco.J.¹, Lerma Molina J.N.¹, Posada Cruz S.¹, Cobos Peralta M. A.³

¹Cuerpo Académico Productividad de Agroecosistemas Tropicales, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV, Universidad Autónoma de Chiapas. ²Graduado y estudiante de la Maestría en Ciencias de Producción Agropecuaria Tropical, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV, UNACH. ³IREGEP-Ganadería, Colegio de Postgraduados.

willians120988@gmail.com

RESUMEN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas con el objetivo de evaluar el Nivel de cuajilote (*Parmentiera edulis*) en un medio de cultivo *in vitro* para mantener vivos a los protozoarios ciliados del rumen. Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones. Las variables evaluadas fueron: concentración de protozoarios, degradación *in vitro* de la materia seca (D/VMS), concentración de ácidos grasos volátiles y pH en los medios. Entre los medios de cultivo adicionados con *P. edulis* (0.1, 0.2 y 0.3 g) no hubo diferencia ($P>0.05$) en la concentración de protozoarios al compararlos con el tratamiento testigo (*A. sativa*). El extracto insoluble de *P. edulis* permitió mantener hasta por 72 h una concentración de 2.3×10^4 protozoarios por mL, además no hubo diferencia ($P>0.05$) en los valores de pH, lo que indica que no hay efecto del pH sobre los protozoarios. La degradación de la MS de *P. edulis* fue total a partir de las 24 h de incubación. El medio de cultivo *in vitro* adicionado con *P. edulis* permite mantener una concentración de protozoarios similar a la del rumen, y con ello se pueden hacer evaluaciones de trabajos de desfaunación.

Palabras clave: Anaerobiosis, desfaunación, cultivo *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Los arbustos forrajeros (AF) representan un potencial de estudio para generar conocimiento, cuando son usados como una fuente de nutrientes en medios de cultivo para microorganismos específicos del rumen (bacterias, hongos y protozoarios). Por otro lado, se han mantenido por 72 h concentraciones de 10^4 protozoarios vivos por mililitro en medios anaerobios (Ley de Coss *et al.*, 2011). El reto es



evaluar el beneficio de los protozoarios hacia el animal, que consumen dentro de su dieta pastos más AF, y verificar las mejoras en la producción. *P. edulis* es un AF se consume sus frutos como alimento, además tiene usos medicinales se conoce poco de sus propiedades nutricionales y se utiliza en alimentación del rumiante.

METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas UNACH. Un medio de cultivo anaerobio, al cual se le adiciono 150 µL de extracto de *A. sativa* (T1: testigo), además de 20000 µL de penicilina y 25 mg de estreptomina (Ley de Coss *et al.*, 2011). Los tratamientos 1, 2 y 3 fueron el medio de cultivo anaerobio (MCA) más antibióticos, pero en lugar de avena se les adiciono 0.1, 0.2 y 0.3 g de *P. edulis*.

El medio de cultivo anaerobio está compuesto por cada 100 mL de: 47 mL de agua destilada, de 30 mL de líquido ruminal clarificado (filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10,000 rpm, por 15 minutos a 4°C, esterilizado 20 minutos a 15 psi, 121 °C), 5 mL de solución mineral I (contenido por 1000 mL 6g K₂HPO₄), 5 mL de solución mineral II (contenido por 1000 mL 6g K₂HPO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g CaCl₂ H₂O), 5 mL de carbonato de sodio, solución 8% (8 g carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada), 5 mL de acetato de sodio al 1.5% (1.5 g acetato de sodio en 100 mL de agua Destilada), 2 mL solución de sulfido-cisteína (2.5 g L-cisteína disuelta en 15 mL de 2N NaOH + 2.5 g Na₂S-9H₂O en 100 mL de H₂O), 0.1 mL al 0.1% de solución resazurina (0.1 mL de resazurina en volumen final de 100 mL calentado hasta que el indicador pierde su coloración) , 0.2 g de tripticasa-peptona y 0.10 g de extracto de levadura.

Para obtener el concentrado de protozoarios, 250 mL de FR fue depositado en un embudo de separación a 38 °C, posteriormente se retiró el sobrenadante y el material precipitado (masa blanquecina) representó el concentrado de protozoarios que se utilizó como inóculo. Posteriormente a la inoculación con 0.5 mL de FR, los tratamientos fueron incubados a 38 °C durante 3, 6, 12, 24, 48, 72 h. Al terminar el periodo de incubación se homogenizó el medio de cultivo y se retiró 1 mL para determinar la concentración de protozoarios mediante una cámara de Neubauer y un microscopio de contrastes de fase (40x), 3 mL de medio fue retirado en cada tiempo para medir el pH con un potenciómetro.



Para determinar la concentración de protozoarios con pipeta Pasteur se extrajo 0.5 mL de medio de cultivo inoculado de cada tratamiento evaluado y se llenaron las dos cámaras Neubauer se realizó el conteo, primero en la cámara uno tomando el número total de los protozoarios de los 5 cuadros, lo mismo fue para cámara dos y los resultados se calcularon y analizaron estadísticamente en el programa Microsoft Excel®.

Para digestibilidad del fruto de cuajilote se realizó la siguiente prueba: en tubos de ensayo de 18 x 150 mm se adiciono 0.2 g de cuajilote previamente esterilizado, se agregaron 9 mL del medio de cultivo, bajo flujo de CO₂ de acuerdo a Cobos y Yokoyama (1995) y se incubaron a 38 °C a 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, después de ser inoculados con 1 mL de FR. Al terminar el tiempo de incubación se determinó la concentración de sustrato no degradado.

Para la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) se tomaron 2 mL de los diferentes periodos de incubación de las pruebas de D/VMS se les adiciono 0.5 mL de ácido metafosfórico al 25 % y se depositaron en viales de plástico se centrifugo a 10,000 rpm por 10 min; y se agito en un vortex para homogenizar las muestras y en seguida se almacenaron a -10 °C, el análisis se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de gases.

El pH se midió respectivamente a las 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h de incubación de los tratamientos. En cada tratamiento se tomaron las medias y fueron ajustados a valores logarítmicos para hacer los promedios.

El diseño estadístico fue un completamente al azar, la concentración de protozoarios se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis (procedimiento GLM) con datos de rangos independientes (Wilcoxon) del programa SAS®.

RESULTADOS

Entre los medios de cultivo de los diferentes tratamientos T1, T2, T3 adicionados con *P. edulis* (0.1, 0.2 y 0.3 g) respectivamente no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) en la concentración de protozoarios, al compararlos con el testigo (*A. sativa*). *P. edulis* permitió mantener hasta por 72 h de incubación una concentración de 2.3×10^4 protozoarios por mililitros de medio de cultivo (Cuadro 1), lo cual fue similar a lo reportado por Ley de Coss *et al.* (2011) donde el sustrato fue *A. sativa*.



Cuadro 1. Concentración de protozoarios en un medio de cultivo con la fracción insoluble de *P. edulis* (10^4).

Trata.	Tiempo de incubación (h)						
	0	3	6	12	24	48	72
1	2.23a	3.00b	4.40a	4.23a	2.50a	2.00a	1.17a
2	1.83a	3.00b	3.53a	4.27a	2.17a	1.93a	1.20a
3	3.83a	3.40ab	4.23a	2.87a	3.90a	1.27a	0.967a
4	4.37a	3.83a	4.30a	3.30a	2.77a	0.967a	2.30a
E.E.M	8.56	1.93	16.22	6.75	9.10	8.02	6.71

a, b, ab valores con diferente letra en la misma hilera, son diferentes ($P < 0.05$). **E. E. M**, Error estándar de la media.

A diferencia de lo reportado por García-Castillo *et al.* (2008). La digestibilidad de la MS de *P. edulis* fue superior, a partir de las 24 h de incubación el valor fue de 100%, este valor coincide con lo reportado por Moctezuma *et al.* (1993), quienes reportan una digestibilidad del 87.8%.

La concentración de AGV totales (cuadro 2) a 72 h de incubación no fue diferente ($p > 0.05$) con 56.26, 52.59 mM L^{-1} para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente, solo el testigo (MCA mas *A. sativa*) tubo la menor concentración con 30.26 mM L^{-1} con diferencia estadística ($p \leq 0.05$) con el resto de los tratamientos. Estos resultados obtenidos coinciden con los datos reportados por Dinius *et al.* (1976) quienes obtuvieron cambios en la relación de acético propionico, mientras que Domestik y Martin (1999) citado por Ley de Coss *et al.* (2011), reportan reducciones en la concentración de AGV totales.



Cuadro 2. Concentración de ácido grasos volátiles (AGV) totales

TIEMPO	AGV totales, mM L ⁻¹						
	0	3	6	12	24	48	72
T1	29.27a	30.43 ^a	30.71 ^a	32.3a	40.93ab	40.14ab	56.26 ^a
T2	28.67a	31.48 ^a	30.48ab	29.41a	46.01a	49.29a	52.59 ^a
T3	33.33a	33.19 ^a	31.80 ^a	26.71a	47.95a	47.72a	57.26 ^a
T4	23.62a	30.76 ^a	29.36b	29.94a	31.59b	31.63b	30.26b
E. E. M	5.29	1.35	0.90	3.76	4.44	4.62	8.68

T1 = 0.1 g de *P. edulis*; **T2** = 0.2 g de *P. edulis*; **T3** = 0.3 g de *P. edulis*; **T4** = 0.2 g de *A. sativa*; **a, b y c** medias con diferente letra en una columna son diferentes ($P < 0.05$); **E. E. M**, Error estándar de la media.

Los valores de pH a las 72 h en el tratamiento 2 y 3 fueron menores a ($P < 0.05$) esto se debe a que la mayor adición de cantidad de *P. edulis* (0.3 gr) y la mayor cantidad de MS fermentable produjo una reducción en el pH. Sin embargo en estos resultados se observa que no hubo reducción drástica del pH (< 5.5), lo que indica que no hay efecto del pH sobre los protozoarios (Ley de Coss *et al.*, 2011).

CONCLUSION

P. edulis después de las 24 horas de incubación alcanza una digestibilidad del 100% y permite mantener una concentración de 2.3×10^4 protozoarios por mL de FR sin alterar el pH en los medios de cultivo. Este medio de cultivo permitirá *in vitro* evaluar la capacidad desfaunante de árboles y arbustos forrajeros que contienen compuestos secundarios (taninos, saponinas, etc.).

LITERATURA CITADA

- Cobos, M. A., and M. I. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* variedad *Ruminantium*: colonization *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Wallace, R. J. and A Lahlou-Kassi (eds). Rumen Ecology Research Planning.
- Dinius, D. A., M. E. Simpson, and P. B. Marsh. 1976. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steer. J. Anim. Sei. 42: 229-234
- García-Castillo, C. G., J. J. Martínez-Tinajero, O. D. Montañez-Valdez, L. Sánchez-Orozco, S. Posada-cruz, F. Izaguirre-flores, y G. Martinez-Priego. 2008. Degradación ruminal de la materia seca del fruto cuajilote (*Parmentiera edulis*). Zootecnia Trop. 26(1): 1-8.

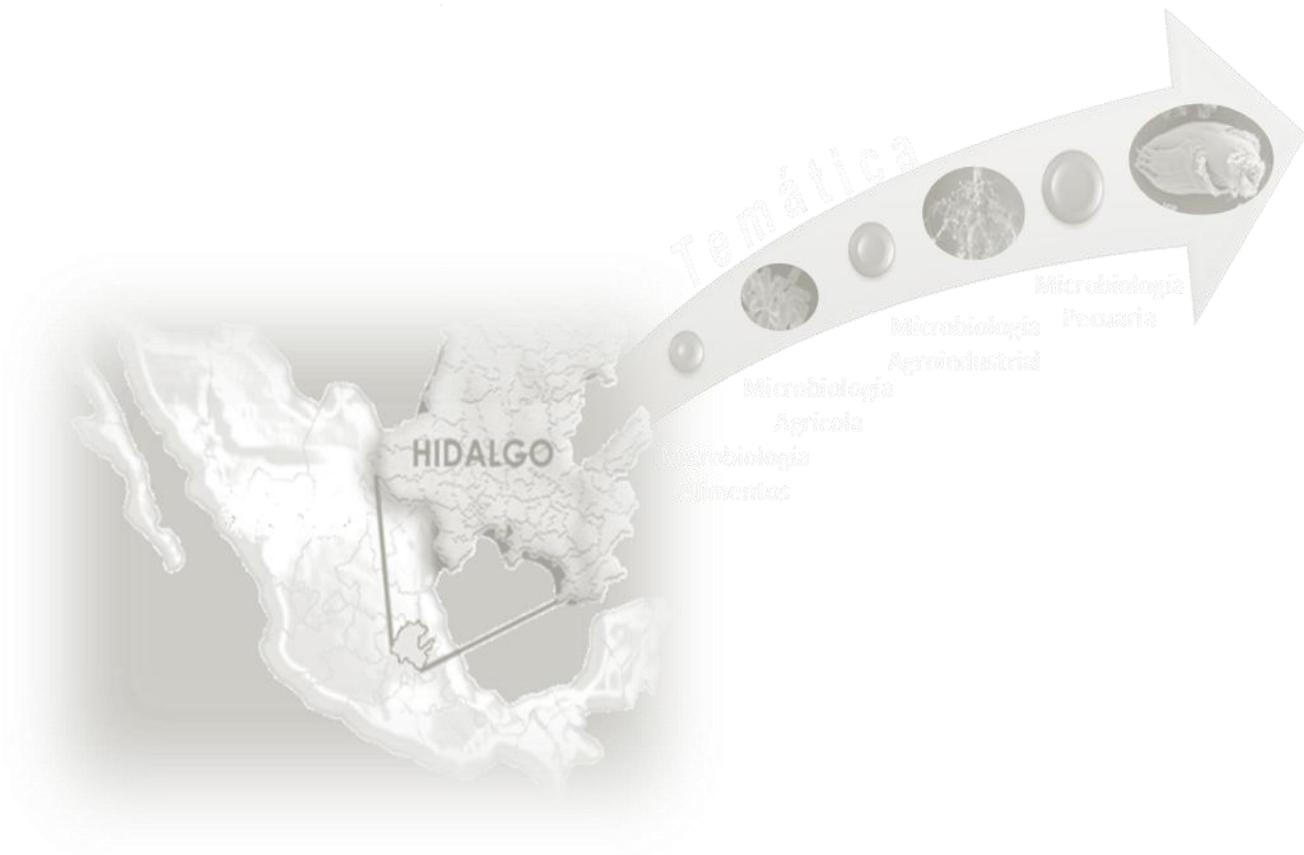


III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013



Ley de Coss, A., M. Cobos-Peralta, Hernández-Sánchez, y E. Guerra-medina. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación in vitro en la capacidad desfaunante del extracto de plantas.

Moctezuma, S. A., C. E. Lerma-Doria, D. R. Martínez, J. Salinas-Chavira, and P. R. Yado. 1993. *In-vivo* digestibility of complete sheep diets with various amounts of chote fruit (*P. edulis*). Reunión Nacional de investigación Pecuaria. Guadalajara, Jal. México.





DETERMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA EN BAJA CALIFORNIA.

BrisuelaRaygosa J.¹, Palacios Torres J.¹, Pujol Manríquez C.³, López Valencia G.², Medina Basulto G. E.*¹.

¹ Laboratorio de Biología Molecular. ² Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis. ³ Laboratorio de Microbiología. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja

California. Mexicali, México.

gerardom@uabc.edu.mx

Resumen

La mastitis en ganado lechero es el problema de salud más importante en los establos dedicados a esta actividad debido a las pérdidas que provoca por la baja calidad de la leche, la merma en la producción, el aumento en la tasa de desecho de animales y el costo de los tratamientos. En el estado de Baja California no se han realizado investigaciones documentadas sobre la identificación y prevalencia de agentes etiológicos que provocan mastitis en bovinos. En el presente estudio se tomaron muestras de leche de vacas en producción positivas a mastitis en 4 establos lecheros de la región, se aislaron los agentes etiológicos, se identificaron por PCR y se determinó su perfil de resistencia a antibióticos. De un total de 1192 animales, el 3.5% fueron positivos a mastitis, y de estos el 66.7 presentaron infección bacteriana. El agente más frecuentemente encontrado fue *Staphylococcus aureus* (65.2%), seguido por *Streptococcus dysgalacteae* (6.5%), *Staphylococcus chromogenes* (4.3%), *Staphylococcus sciuri* (2.2%), *Staphylococcus haemolyticus* (2.2%) y *E. coli* (2.2%). El restante 17.4% de los aislados están en proceso de identificación por secuenciación del gen 16s. Finalmente se determinó que el 87% de los aislados fueron antibiótico multirresistentes, principalmente a penicilinas y cefalosporinas, aunque también a aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y tetraciclinas. El presente trabajo está impactando en los tratamientos a aplicar dentro de los establos participantes, por lo que esperamos que la prevalencia y las pérdidas asociadas a mastitis puedan disminuir a mediano plazo.

Palabras clave: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, identificación por PCR, resistencia a antibióticos.



Introducción

En Baja California no se han realizado investigaciones documentadas sobre los agentes etiológicos que provocan mastitis bovina, sin embargo, habiendo una población ganadera de 46,617 bovinos de leche (SIAP, 2011), se presume que la prevalencia es relativamente alta. La Mastitis subclínica es la principal forma en que se presenta la mastitis en los establos lecheros, afectando generalmente entre el 20 y el 50% de las vacas. Las pérdidas por mastitis subclínica en los establos es muy difícil de cuantificar, sin embargo muchos expertos coinciden en que cuesta en promedio más que la mastitis clínica. Asumiendo una prevalencia del 45%, el costo se ha estimado entre 180 a 320 dólares por caso de vaca con mastitis, siendo aproximadamente 70% de estas pérdidas económicas por la reducción en la producción de leche (Zhao X. y Lacasse P., 2007), y el resto por el incremento en los costos del cuidado de la salud del hato y el desecho prematuro de animales (Bradley, 2002), así como el uso indiscriminado de antibióticos, lo que ha provocado un aumento en la resistencia a éstos.

Debido a lo anterior, el objetivo de esta investigación es determinar la frecuencia relativa de las especies patógenas causantes de mastitis bovina en establos de Baja California y su perfil de resistencia a antibióticos, esto con el fin de que los productores de la región conozcan que agentes etiológicos los están afectando y puedan tomar mejores decisiones en cuanto al manejo de los animales en general y en cuanto a los tratamientos a utilizar en particular.

Material y Métodos

Se realizó un estudio epidemiológico observacional de tipo transversal con un muestreo no probabilístico por conveniencia. El muestreo se realizó en 4 establos lecheros ubicados en distintos municipios del estado. Se tomaron muestras de leche de los cuartos de las vacas que a la prueba de California tuvieron grado 2 o mayor, siguiendo la metodología del Consejo Nacional de la Mastitis (NCM) de los Estados Unidos (2004). 100 µL de cada muestra se cultivaron en medio agar sangre e incubaron a 35°C por 24 a 48 h (MacFaddin, 2003). Se aisló cada tipo de colonia de cada cultivo tomando solo las que fueran más de 10 y no más de tres colonias por caja. Se hicieron antibiogramas de cada bacteria aislada empleando el método de difusión en caja con multidisco para gram positivos y gram negativos (BIO-RAD inc.). Se extrajo DNA de los aislados obtenidos utilizando un paquete comercial (QIAGEN DNeasy®). Posteriormente se realizó la detección e identificación molecular de los patógenos aislados mediante PCR (icycler BIO-RAD inc.) siguiendo la metodología descrita por Riffon *et al.* (2001) y Shomeet *et al.* (2011). Los aislados que no pudieron identificarse con el panel de oligonucleótidos utilizados, el cual puede identificar varias especies del género *Staphylococcus* y *Streptococcus*, así como *Escherichia coli*, se les hizo secuenciación del gen 16S con los



oligonucleótidos UNI8-535 (Negoro E., *et al.* 2012). Finalmente, los datos fueron capturados y analizados en una base de datos en Excel®.

Resultados y Discusión

De un total de 1192 vacas a las que se les realizó la prueba CMT (California Mastitis Test) o conteo de células somáticas, se obtuvieron 71 muestras positivas correspondientes a distintos cuartos afectados de un total de 42 vacas por lo que la prevalencia general fue de 3.5%, sin embargo la prevalencia por establo fue muy diferente, variando desde 1.5% hasta 25% en los diferentes establos muestreados, lo cual puede deberse a que solo se les realizó la prueba de mastitis a los animales en producción, siendo estos una proporción diferente del total de animales en cada establo. Del total de vacas muestreadas, al 66.7% se les aisló un agente patógeno infectante, por lo tanto el otro 33.3% presentaron mastitis subclínica (CMT grado 2 o mayor) posiblemente por razones no infecciosas, como irritación por el desinfectante, traumatismo, malas prácticas en el proceso de la ordeña, o en ese momento tenían tratamiento antimicrobiano. Se obtuvieron 46 aislados en total, de los cuales *Staphylococcus aureus* fue la especie más frecuentemente encontrada la cual estuvo presente en el 65.2% de los aislados, seguida por *Streptococcus dysgalactiae* (6.5%), *Staphylococcus chromogenes* (4.3%), *Staphylococcus sciuri* (4%), *Staphylococcus haemolyticus* (2.1%) y *E. coli* (2.1%). Se aislaron 8 microorganismos más, los cuales están en proceso de identificación por secuenciación del gen 16S. Se encontraron 2 coinfecciones; en una muestra se aisló *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus chromogenes* y en otra se aisló *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus dysgalactiae*.

En los antibiogramas, *S. aureus* presentó mayor resistencia a los antibióticos de la clase penicilinas (60%) y cefalosporinas (56.6%). *S. sciuri* fue resistente a eritromicina, a penicilinas y ceftazidima, *S. haemolyticus* presentó resistencia a la clase de cefalosporinas y penicilinas. *S. chromogenes* fue resistente a aminoglucósidos, penicilinas, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, y a ceftazidima. *E. coli* presentó resistencia a penicilinas (ampicilina) y carboxipenicilinas (carbenicilina). De los 3 aislados de *S. dysgalactiae* uno fue resistente a tetraciclina y gentamicina, en tanto los otros dos fueron sensibles a todos los antibióticos utilizados. El 87% de los aislados mostró ser multiresistente, lo cual puede ser debido al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro en los establos lecheros de la región.



Conclusión

La mastitis es un problema de alto impacto en la producción de leche en la región, afectando a todos los establos muestreados. El principal agente etiológico encontrado fue *Staphylococcus aureus* multirresistente, por lo que se hace necesario reorientar los tratamientos utilizados actualmente en los establos y establecer buenas prácticas de manejo en los hatos para mejorar la salud de los animales, aumentar la productividad y disminuir los costos de producción.

Agradecimientos

Investigación financiada por Convocatoria interna UABC y fundación PRODUCE. Se agradece la colaboración a la Dra. SawakoHori, MVZ Tomas Cárdenas Reina, MVZ Elizama Ponce Barraza, MVZ Fernanda Bermúdez y MVZ Luis Rodríguez.

Literatura citada

- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis an evolving disease. *Vet. J.* 164:116-126.
- Mac Faddin J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición Médica Panamericana, S. A. De C. V. México.
- Negoro, E., H. Iwasaki, K. Tai, S. Ikegaya, K. Takagi, S. Kishi, T. Yamauchi, A. Yoshida, Y. Urasaki, M. Shimadzu and T. Ueda. 2012. Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *International Journal of Infectious Diseases* 17 (2013):271–276.
- NMC. 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. Verona: NMC. p. 47.
- Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, and J. Lagace. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by pcr. *Journal of clinical microbiology*, 39 (7) 2584–2589.
- Shome, B.R., S. Das Mitra, M. Bhuvana, N. krithiga, D. Velu, R. Shome, S. Isloor, S.B. Barbuddhe and H. Rahman. 2011. Multiplex pcr assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of applied microbiology*. 111:1349–1356.



EFFECTO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS EN LA GANANCIA DE PESO Y CONSUMO DE ALIMENTO DE CORDEROS EN FINALIZACIÓN

Almaraz Buendía I.^{1,3*}, Carreón Luna L.², González Muñoz S. S.³, Rivera Martínez J. G.¹, Arias Margarito L.¹, Soriano Robles R.¹, Buendía Rodríguez G.⁴ y Sánchez Meraz J. A.⁵.

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México. ²FMVZ-BUAP, Puebla. ³Colegio de Posgraduados, Montecillo, México. ⁴CENIDFyMA INIFAP, Ajuchitlán, Querétaro, ⁵Universidad de la Cañada, Teotitlán, Oaxaca.

Resumen

La adición de enzimas fibrolíticas (EFE) exógenas en dietas para ruminantes procura una mayor liberación de nutrientes energéticos que los microorganismos del rumen pueden transformar en metabolitos útiles para el rumiante. Por lo tanto el objetivo de este estudio fue evaluar la adición de EFE (3 g kg MS⁻¹) en dietas altas en concentrado en ovinos en finalización sobre la ganancia diaria de peso y el consumo de materia seca. Los resultados se analizaron como medidas repetidas en el tiempo y no se detectó efecto alguno en respuesta a la adición de EFE. Esto puede atribuirse a la especificidad del extracto enzimático en relación a la estructura del forraje.

Palabras clave: ovinos, medidas repetidas, xylanasas

Introducción

La producción nacional de carne ovina cubre aproximadamente 50% del consumo nacional y es uno de los productos pecuarios con menor consumo per cápita en México (SAGARPA, 2004). Los sistemas de engorda de ovinos en corral son recientes y se localizan en la zona centro del país donde hay alto consumo de carne ovina (De Lucas y Arbiza, 2000; Vargas *et al.*, 2004). En estos sistemas los ovinos se alimentan con dietas altas en concentrado y los resultados al adicionar enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) han sido más consistentes que con dietas altas en forraje (Beauchemin *et al.*, 2003). En algunos estudios la adición de EFE en ruminantes ha mejorado la ganancia diaria de peso (Basurto, 2002), pero en otros no (Cano *et al.*, 2003; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). Por tanto el objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de EFE en la ganancia de peso y consumo de alimento de corderos alimentados con una dieta alta en concentrado.



Materiales y métodos

El experimento se realizó en San José Tuzuapan, Municipio de Quecholac, Distrito de Tecamachalco, Puebla. Se utilizaron 48 corderos (17.6 ± 2.5 PV) criollos X ovinos de pelo distribuidos al azar en 10 corrales (8 corrales con 5 corderos y 2 con 4) asignándoles en forma aleatoria una dieta (tratamiento, T): T1 = control, T2 = T1 + 3 g de EFE kg^{-1} MS. Los corderos se trataron con antiparasitarios y recibieron una dosis de vitamina ADE, se identificaron por medio de un arete y se pesaron dos días consecutivos a los 0, 21, 42, 63 y 84 d; el peso inicial se consideró como covariable. La dieta contenía 30% de forraje (15% rastrojo de maíz y 15% heno de alfalfa, ambos molidos con criba de 3.2 cm \varnothing , tamaño de partícula 2 a 4 cm) y 70% de concentrado (maíz molido 30%, sorgo molido 28%, pasta de soya 10.9%, minerales 1%). El alimento se ofreció en forma totalmente mezclada y el consumo fue la diferencia entre lo ofrecido y rechazado. En muestras de cada T se midió MS, PC, cenizas (AOAC, 1985) FDN y FDA. El compuesto enzimático fue específico para rumiantes (Fibrozyme[®], Alltech INC. de México, S. A. de C. V.).

Diseño experimental. Los datos se analizaron usando un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo (Wang y Goonewardene, 2004), con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \zeta_i + \alpha_{j(i)} + d_k + (\zeta d)_{ik} (a + z_j)x_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable de respuesta; μ = media general; ζ_i = efecto fijo del i -ésimo T; $\alpha_{j(i)}$ = efecto aleatorio del j -ésimo cordero dentro del i -ésimo T; d_k = efecto fijo del k -ésimo tiempo; $(\zeta d)_{ik}$ = efecto fijo de la interacción entre T y tiempo; a = coeficiente de regresión del peso inicial del j -ésimo cordero en el i -ésimo T; z_j = desviación de la pendiente del i -ésimo T de la pendiente del coeficiente de regresión del peso inicial del j -ésimo cordero; x_{ij} = peso inicial del j -ésimo cordero en el i -ésimo T; ϵ_{ijk} = error aleatorio; $i = 1, 2$; $j = 1, 2, 3, 4, \dots, 24$; $k = 1, 2, 3, 4$. Se usó PROC MIXED (SAS, 2003) y el enunciado REPEATED; para modelar la estructura de la covarianza se usó la opción ANTE(1) (Wang y Goonewardene (2004). La comparación de medias se realizó con LSMEANS.

Resultados y discusión

La ganancia de peso (GP) y el consumo de materia seca (CMS) no cambiaron por la adición de EFE (Cuadro 1); sin embargo, en la GP se detectó efecto del tiempo ($p \leq 0.001$) y de la interacción tratamiento*tiempo ($p \leq 0.04$). Por lo tanto, la GP se modeló como función polinomial para comparar el efecto de los T en los tiempos de muestreo (Cuadro 2). El coeficiente cuadrático para T1 fue significativo e indica que la GP de los corderos en respuesta a T1 fue mejor al inicio que al final del estudio. El coeficiente cuadrático para T2 no fue significativo e indica que la respuesta a T2 fue lineal.



Cuadro 1. Efecto de EFE en el peso promedio (PP, kg) por tratamiento (T), CMS (g d⁻¹) promedio y diferencia entre T en corderos.

Interacción	Tiempo			
	1	2	3	4
PP				
T1 x tiempo	21.77	27.49	31.36	35.76
T2 x tiempo	21.37	26.31	31.14	35.46
EE	0.32	0.47	0.56	0.61
P	NS	0.08	NS	NS
CMS				
T1 x tiempo	711.1	883.5	1020.9	1063.9
T2 x tiempo	703.0	883.5	1034.4	1063.3
EE	1.25	6.09	7.48	3.24
P	0.003	NS	NS	NS

T1= control; T2 = T1 + 3 g EFE kg⁻¹ MS; el peso promedio a los 21, 42, 63 y 84 d es referido como el tiempo 1, 2, 3 y 4; P = probabilidad; NS = diferencias no significativas; EE = error estándar.



Cuadro 2. Efecto de EFE en la interacción tratamiento x tiempo en el peso promedio (PP, kg) y consumo de materia seca (CMS, g d⁻¹) en corderos.

Parámetro	Aproximado	Probabilidad	EE
T1	15.96	<0.0001	0.67
T2	15.69	<0.0001	0.67
Tiempo*T1	6.56	<0.0001	0.62
Tiempo*T2	5.42	<0.0001	0.62
Tiempo ² *T1	-0.38	0.0023	0.12
Tiempo ² *T2	-0.14	NS	0.12

T1= control; T2 = T1 + 3 g EFE kg MS⁻¹; NS = no significativo; EE = error estándar.

Los resultados del presente estudio coinciden con los reportados por Cano *et al.* (2003) y Pinosrodríguez *et al.* (2008) quienes no reportan incrementos en GP y CMS en novillos y en ovinos alimentados con EFE en la dieta; sin embargo, contrastan con los resultados publicados por Beauchemin *et al.* (1999), quienes reportan aumento en la GP en novillos por la adición de EFE, pero el CMS no cambió. En estudios realizados por Zinn y Salinas (1999), la adición de EFE (7.5 g novillo⁻¹ dos veces al día) en dietas altas en concentrado aumentó el CMS, la ganancia diaria de peso y el peso final de novillos en finalización. Titi y Tabbaa (2004) adicionaron EFE (150 g t⁻¹ forraje consumido) en dietas para bovinos, y mencionan que el peso final de bovinos machos aumentó por la adición de enzimas, no así en las hembras; el CMS no fue diferente en los bovinos de ambos sexos, aunque tendió a aumentar en los animales tratados con EFE.

Conclusión

En las condiciones experimentales descritas en las que se llevó a cabo el presente estudio, la adición de 3 g kg⁻¹ MS de enzimas fibrolíticas exógenas con actividad preferente sobre los xilanos en dietas altas en concentrado (70%), no cambió la ganancia de peso y el consumo de materia seca en corderos en finalización intensiva en corral.



Literatura citada

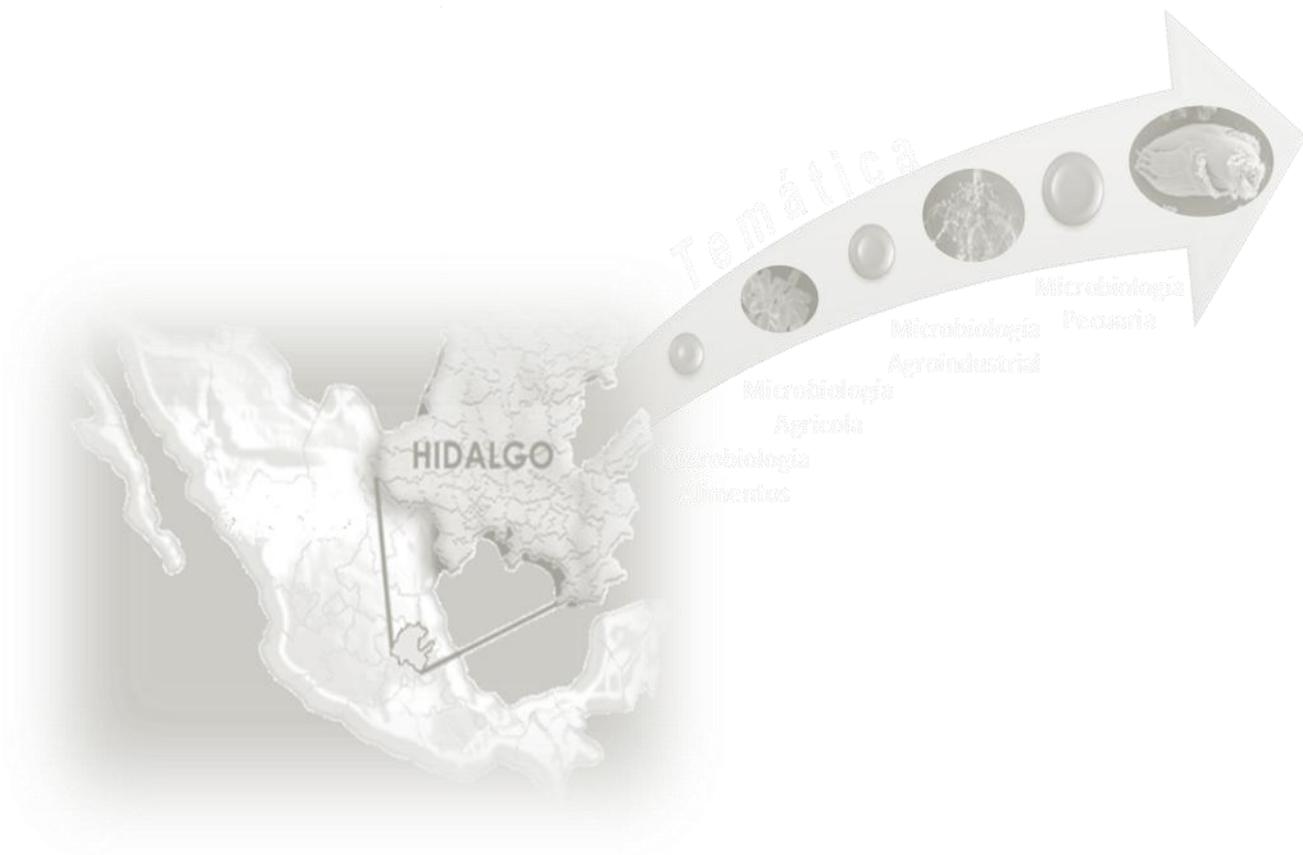
- AOAC. 1985. Official Methods of Analysis (14th Ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C. 1298 p.
- Basurto, K. V. M. 2002. Enzimas, aditivos innovadores en corrales de engorda. XII Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ciencias Agrícolas. Oct. 3 y 4, Mexicali, B. C., México. pp: 160-165.
- Beauchemin, K. A., L. M. Rode, and D. Karren. 1999. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. Canadian Journal of Animal Science 79: 243-246.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavy and W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. Journal of Animal Science 81 (E. Suppl. 2): E37: E42.
- Cano, A. L., E. M. Aranda, G. D. Mendoza, J. Pérez y J. A. Ramos. 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. Técnica Pecuaria México 41(2): 153-164.
- De Lucas, T. y S. Arbiza A. 2000. Producción Ovina en el Mundo y México. Editores Unidos Mexicanos, México. 142 p.
- Pinos-Rodríguez, J. M., R. Moreno, S. S. González, P. H. Robinson, G. Mendoza and G. Álvarez. 2008. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. Animal Feed Science and Technology 142(3-4): 210-219.
- SAGARPA. 2004. Resumen nacional de la producción pecuaria. <http://sagarpa.gob.mx>. Consultado en mayo del 2011.
- SAS. 2003. User' s Guide: Statistics, version 8.0. Ed. SAS Institute, Inc., Cary N. C. En CD-ROM.
- Vargas, L. M, R. Hernández L., J. Gutiérrez P., A. Martínez L., D. Baez S. y J. S. Hernández Z. 2004. Análisis de los componentes de la cadena productiva de ovinos en el Estado de Puebla. *In*: Cavallotti, V. B. A. y V. H. Palacio M. (coords.). La Ganadería: Experiencias y Reflexiones. UACH. México. pp: 179-192.
- Wang, Z. and L. A. Goonewardene. 2004. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. Canadian Journal of Animal Science 84: 1-11.



III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013



Zinn, R. A. and J. Salinas. 1999. Influence of fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78% concentrate growing diet. Lyons T. P. and K. A. Jacques (eds.). Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the 10th–15th, Symposium 1994–1999. Alltech. Nottingham University Press. U. K. pp: 313-319.





ACTIVIDAD DE LACASA COMERCIAL Y DE EXTRACTOS DE *Pleurotusostreatus* CULTIVADO EN RASTROJO DE MAÍZ Y FRACCIONES FDN, FDA Y LDA

Tirado-González D.N.^{1*}, Miranda-Romero L.A.¹, Jaúregui-Rincón J.², Guevara-Lara F.², Tirado-Estrada G.³, Martínez-Hernández P.A.¹

¹Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo,

²Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ³Maestría en Biotecnología Agropecuaria del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes.

deli_gym@hotmail.com

Resumen

Las lacasas son enzimas que actúan en la degradación de la lignina de paredes celulares, su uso podría mejorar la disponibilidad de energía en pajas destinadas a la alimentación de rumiantes. Los objetivos fueron relacionar la actividad de lacasas (AE) de extractos enzimáticos (EE) de *Pleurotusostreatus* (PO) con extractos de rastrojos de maíz H324 y AS951, y con fracciones de la pared celular (FDN, FDA y LDA), y observar el efecto en la actividad de un concentrado comercial (CC) de lacasas, de extractos con y sin hongos ligninolíticos. La actividad de lacasas se determinó por la oxidación de ABTS ($\xi_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se realizaron tres etapas: 1) AE de extractos de PO a los 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 19 y 23 d, en AS951 y H324: el pico de AE ocurrió a los 9 d y AS951 promovió mayor AE (6676 vs. 618 UE/L de EE); 2) AE de extractos de PO a los 3, 5, 7, 10, 13 y 16 d, en FDN, FDA y LDA (de AS951): la mayor AE fue en los EE de LDA (23846 vs. 1000.3 y 949.1 UE/L de EE) a los 10 d; y 3) AE del CC en presencia de extractos con y sin hongos: los medios afectaron negativamente la AE del CC. Los medios con mayor cantidad de FDA y LDA podrían mejorar la actividad de lacasas de PO, sin embargo, parte de esta actividad podría verse afectada por las características químicas de los medios de cultivo.

Palabras clave: lignina, fenoloxidasas, rastrojo de maíz, fracciones FDN, FDA y LDA.

Introducción

El rastrojo de maíz, es ampliamente utilizado en la alimentación de rumiantes en México. Sin embargo, gran parte de su composición corresponde a la proporción de paredes celulares, las cuales están compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Tanto la celulosa, como el heteropolímero de la hemicelulosa representan fuentes potenciales de energía para los



microorganismos de los rumiantes, pero su baja disponibilidad está relacionada principalmente con la lignificación que ocurre durante el desarrollo de las plantas (Hatfiel y Fukushima, 2005). Dependiendo del tipo y estado fenológico de las plantas, cada unidad de lignina disminuye aproximadamente en dos unidades la degradabilidad de la pared celular (Delgado *et al.*, 2002).

Las lacasas (E.C. 1.10.3.2; benzenodiol: oxígeno reductasas), son enzimas producidas por muchos hongos de pudrición blanca, son polifenoloxidasas y juegan un papel multifuncional en la degradación de la lignina. Su uso en la industria (Ponce y Pérez, 2002) y en programas de biorremediación (Eibeset *al.*, 2006), ha sido exitoso. Por lo que es posible que su utilización en el pretratamiento de rastrojos, pueda mejorar la disponibilidad de energía para la alimentación de rumiantes (Tricarico y Dawson, 2005; Eun y Beauchemin, 2007). Los objetivos del presente trabajo fueron relacionar la actividad enzimática de lacasas del hongo *Pleurotus ostreatus* con extractos de sustratos completos de H324 y AS951, y de fracciones de la pared celular (FDN, FDA y LDA) y observar los efectos de los mismos extractos, tratados y no tratados con cultivos de hongos ligninolíticos, sobre la actividad de un concentrado comercial de lacasas.

Material y Métodos

Se utilizaron dos variedades de ciclo intermedio de rastrojo de maíz (AS951, de germoplasma de origen subtropical y H324, de valles altos, cosechadas a los 170 d), proporcionadas por el Campo Experimental del INIFAP en Pabellón de Arteaga, Aguascalientes (a 1920 msnm, 22°10' LN y 102°20' LW). Las muestras de rastrojo de maíz se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C y se molieron en un molino Thomas Willey con una malla de 1.0 mm de diámetro. Se obtuvieron las fracciones de FDN, FDA, LDA, celulosa (Cel), hemicelulosa (Hem) y Cenizas (Cen) de acuerdo a lo descrito por Van Soest *al.* (1991). La cepa de *Pleurotus ostreatus*, proporcionada por la Universidad Autónoma de Aguascalientes (identificada molecularmente: cepa 7980), inoculó un medio líquido rico en glucosa (Glucosa Malta Levadura: GYM). A los 5 d de incubación en GYM, se tomó 1g del hongo y se inocularon medios líquidos (25 mL) que contenían uno de los sustratos (AS951, H324 o alguna de las fracciones FDN, FDA o LDA de AS951), disueltos en un buffer de fosfato de potasio (2% p/v, pH=6.0); el cultivo se mantuvo a 28°C y agitación constante a 4 rpm. Se observaron las actividades de lacasas de extractos enzimáticos (EE) obtenidos en los días 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 19 y 23 de los cultivos con extractos de rastrojo completo, y a los 3, 5, 8, 11, 15 y 17 d, de los cultivos de extractos de FDN, FDA y LDA. Para la obtención de los EE en condiciones estériles, se tomaron muestras de 2 mL/d de muestreo. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles, se centrifugaron a 1,000 x g por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante (EE). La actividad de lacasas se determinó a temperatura ambiente (33 ± 1°C), por la oxidación de 2-2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato (ABTS), pH 5.0 y



$\xi_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Caballaziet *al.*, 2004). El volumen de reacción estuvo constituido por 400 μL de extracto de la enzima, 500 μL de un buffer de acetato de sodio (pH 5.0, 0.1 M) y 100 μL de ABTS (1mM). La unidad enzimática se definió como 1 UE = la cantidad de extracto enzimático necesario para oxidar 1 μmol de ABTS⁺ por min; la actividad enzimática (AE) se refiere a la cantidad de UE contenidas en 1 L de extracto enzimático (EE).

Para observar el efecto de los extractos sobre la actividad de las lacasas, se realizaron extractos completos y de fracciones FDN, FDA y LDA (E), semejantes a los medios de cultivo de los hongos, pero sin inocular y se obtuvieron muestras de cultivos de 16 d de extractos completos de rastrojo y de las fracciones de fibras inoculados de la forma ya descrita con una mezcla de hongos ligninolíticos (*Bjerkandera adusta*, *Trametes troglitii*, *Sporotrichum pulverulentum* y *Pleurotus ostreatus*), sus posibles enzimas presentes se inactivaron calentándolos a 90°C por 15 min (EI). Se utilizó agua destilada como testigo para esta prueba (Testigo). La actividad de las lacasas se realizó de la manera ya referida, sólo que el volumen de reacción estuvo constituido por 300 μL del EC (4% p/v), 300 μL de buffer de acetato de sodio (pH 5.0, 0.1 M), 300 μL de extractos de medios de cultivo o de Testigo y 100 μL de ABTS (1mM). En éste caso, se consideró la actividad enzimática relativa (ARel) como el porcentaje de actividad observada con respecto al Testigo (ARel= AE tratamiento/AE Testigo*100).

El análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete SAS (v. 9.0, 2002). Para el perfil de actividades enzimáticas a través del tiempo, se utilizaron modelos de diseños completamente al azar con arreglos factoriales; mientras que el efecto del sustrato sobre la actividad enzimática se analizó utilizando un diseño completamente al azar. Se utilizó la prueba de Tukey (P<0.05) para la comparación de las medias de los tratamientos.

Resultados y Discusión

El rastrojo de la variedad AS951, de origen subtropical, mostró mayores contenidos de FDA, Cel y LDA, que H324, de valles altos (50 vs. 45.5; 43 vs. 39; y 3.8 vs. 2.6; P<0.05). Los picos de actividad máxima se observaron a los 9 y 10 d (P<0.05; Figura 1). AS951 y LDA promovieron mayor actividad de lacasas (Figura 1a y 1b). El tiempo del cultivo y condiciones del sustrato (Caballaziet *al.*, 2004) son factores que afectan la expresión de genes que codifican para la producción de cada enzima como respuesta adaptativa del hongo (Cohen *et al.*, 2002). Los presentes resultados sugieren que mayor cantidad de FDA y LDA puede estimular la producción de lacasas.

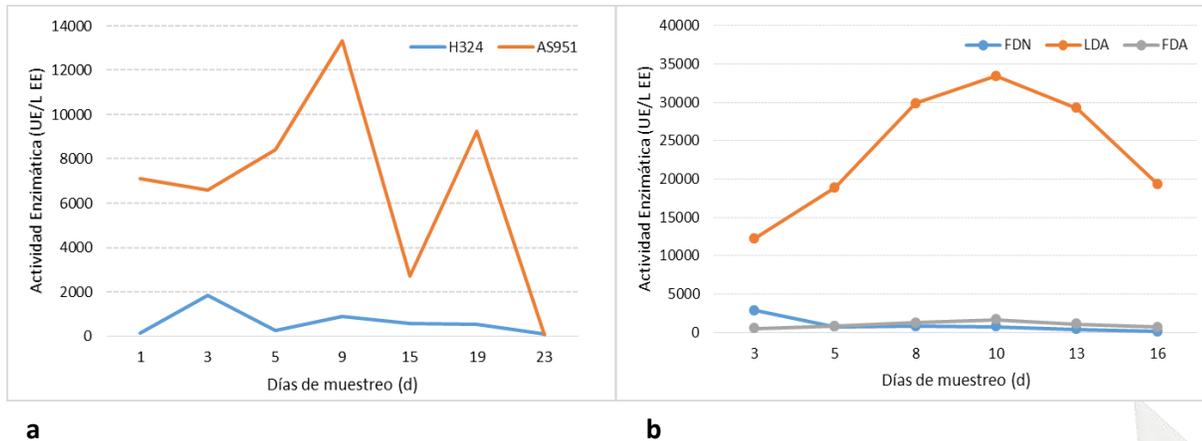


Figura 1. Actividad de lacasas de *Pleurotusostreatus* cultivado en medios líquidos con rastrojo de maíz de las variedades AS951 y H324 (a) y las fracciones de fibra (FDN, FDA y LDA) de AS951 (b).

Cuadro 1. Actividad de un concentrado de lacasa comercial (4% p/v) en extractos de sustratos con y sin pretratamiento de hongos ligninolíticos.

SUSTRATO	HONGO	Actividad Enzimática (UE/L EE)	Act. Enz. Relativa (%)
H324	SH	2.8 ^c	9.4 ^e
AS951	SH	3.1 ^c	10.6 ^e
FDN	SH	16.6 ^b	60.9 ^b
FDA	SH	12.5 ^{bc}	42.1 ^{bcd}
LDA	SH	10.9 ^{bc}	33.6 ^{cde}
H324	MH	9.2 ^{bc}	32.9 ^{cde}
AS951	MH	7.7 ^{bc}	23.5 ^{de}
FDN	MH	16.6 ^b	60.7 ^b
FDA	MH	13.4 ^{bc}	46.4 ^{bcd}
LDA	MH	15.6 ^b	56.4 ^{cd}
Testigo	SH	28.41 ^a	100 ^a

*Medias sin letras en común son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$); H324 y AS951, variedades de rastrojo de maíz; SH y MH, sin y con cultivo de hongos; EE, extracto enzimático; UE, es la unidad de enzima = la cantidad de extracto enzimático que oxida 1 μmol de ABTS^+ /min; Actividad enzimática, es la cantidad de unidades de enzima contenidas en 1 L de extracto enzimático; Act. Enz. Relativa, es la actividad enzimática en relación a la del testigo.



Todos los sustratos evaluados afectaron negativamente la actividad enzimática del concentrado comercial de lacasas (Cuadro 1). Los extractos de FDN, FDA y LDA tuvieron la mayor actividad enzimática relativa al Testigo, el tratamiento con hongos en los extractos completos de H324 y AS951 mejoró la ARel. Ya que las lacasas requieren de la presencia inicial de ciertos metabolitos (O_2 , H_2O_2 y Mn^{2+}) que funcionan como parejas redox y posteriormente de mediadores (Höfer y Schlosser, 1999; Rochefort *et al.* 2002), los efectos negativos observados en el presente trabajo, podrían deberse a la ausencia inicial de alguno de éstos en los extractos, o bien, a la presencia de algún secuestrador (catecol, tiourea, azide de sodio o benzoato de sodio) de especies activas de O_2 , H_2O_2 y OH^- , que pueden provocar una disminución sustancial en la actividad de lacasas y en la mineralización de ligninas artificiales y naturales (González *et al.*, 2003).

Conclusiones

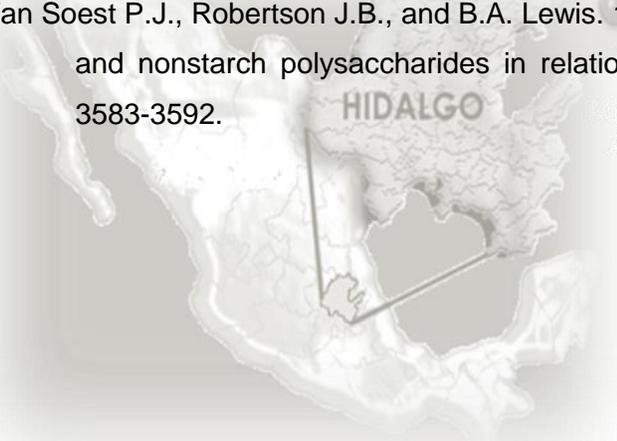
El extracto de la variedad de rastrojo AS951, con mayores contenidos de FDA, Cel y LDA, promovió mayor actividad de lacasas. De igual manera se observaron mejores actividades enzimáticas en los medios con el sustrato de fracción LDA. Todos los sustratos evaluados afectaron la actividad del concentrado comercial de lacasas. Lo anterior sugiere que hay mayor potencial de producción de lacasas del hongo *Pleurotus ostreatus* en medios con altos contenidos de FDA y LDA, aunque las características químicas de algunos sustratos pueden esconder parte de la actividad enzimática de lacasas.

Literatura Citada

- Caballazzi, P, M. Almeida y M. Megumi. 2004. Laccase production by *Lepistasordida*. Brazilian Journal Microbiology 35: 261-253.
- Cohen R., O. Yarden y H. Yitzhak. 2002. Lignicellulose affects Mn^{2+} regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 68 (6): 3156-3158.
- Delgado N.J., Casler, M.D., Grau, C.R., Jung, H.G. 2002. Reactions of smooth Bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration to three fungal pathogens. Crop Science. 42: 1824-1831.
- Eibes G., T. Cajthaml, M. Moreira, G. Feijoo, J. M. Lema. 2006. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothophene y pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. Chemosphere. 64: 408-414.
- Eun J. S., and K.A. Beauchemin. 2007. Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. Journal of Dairy Science. 90(6): 2839-2851.



- González R.L., Falcón S.M.A., y R.F. Peratelo. 2003. Papel de la lacasa, agentes reductores y sustanciasquelantes de Fe⁺⁺ en la degradación de lignina por *Petriellidiumfusoideum*. *Revista Amazónica de Investigación* 2(2):45-66.
- Hatfield, R. and R.S. Fukushima. 2005. Can lignin be accurately measured?. *Crop Sci.* 45:832-839.
- Höfer, C., and D. Schlosser. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn² a Mn³ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters.* 451: 186-190.
- Ponce, T. y A.O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* 21. pp. 273-277.
- Rocheftort, D., Bourbonais, R., Leech, D., and M.G. Paice. 2002. Oxidation of lignin model compounds by organic and transition metal-base electron transfer mediators. *Chem. Comun.* 2002:1182-1183.
- Tricarico J. M., and K.A. Dawson. 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. *Archives of Animal Nutrition*, 59(5): 325-334.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science.* 74: 3583-3592.





NiTS_{spa}: SOFTWARE DE CÓDIGO ABIERTO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Staphylococcus aureus* por *spa*-typing.

Moreno G¹, Valdez-Alarcón J. J², Ortiz-Orozco A. P¹, Carmona-Gasca C. A².

¹Universidad Tecnológica de Morelia, Morelia, Michoacán. ²Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tarímbaro, Michoacán, México.

carmonagasca@yahoo.com.mx

Resumen

Staphylococcus aureus es un patógeno versátil capaz de causar infecciones en humanos y animales con diferentes tipos de patologías. El gen *spa* de *S. aureus* presenta secuencias cortas repetidas (SSR's) que se utilizan en la técnica de *spa*-typing para la caracterización molecular de aislados del patógeno con fines epidemiológicos. Las bases de datos y los programas disponibles para *spa*-typing son poco amigables y presentan la información fragmentada. En este trabajo se diseñó un software alternativo que relaciona de forma amigable la información de *spa*-typing con la información presente en las bases de datos globales de epidemiología molecular de *S. aureus*. El software se denominó NiTS_{spa} (Nicolaita Tecnológica-Software para *spa*-typing) fue diseñado en lenguaje python para identificar *spa*-tipos de *S. aureus* y fue comparado con las herramientas disponibles en línea utilizando secuencias de *spa* encontradas en bases de datos internacionales. A diferencia de las herramientas de internet, este software presenta simultáneamente el análisis de los *spa*-tipos junto con los datos epidemiológicos sobresalientes, en forma ordenada, no redundante y en un solo formato de salida visualmente amigable.

Palabras claves: *Proteína A*, *spa*-tipos. SSR's, *Secuencias Cortas Repetidas*

Introducción

Staphylococcus aureus es un patógeno exitoso gracias a que existen diferentes genotipos de y cada genotipo contiene variantes de un conjunto de factores de virulencia (Baizabal Aguirre et al., 2009). Uno de estos es la Proteína A (Spa), que es la más abundante de la pared celular. Para su mejor estudio, Spa se divide en diferentes regiones funcionales: una región involucrada en su secreción (S), 5 dominios (E, D, A, B y C) de unión a inmunoglobulinas isotipo G (IgG) y una región denominada región X. Esta se encuentra subdividida a su vez en una región constante (Xc), la cual es responsable de interactuar con la pared de *S. aureus* sirviendo como anclaje y la región (Xr), la cual está compuesta por un número variable secuencias cortas repetidas (SSR's) con un tamaño variable de 21



a 30 pares de bases y que promueve procesos inflamatorios de una manera dependiente de la longitud de los SSR's (Garofalo et al., 2012). La región Xr se encuentra delimitada por dos secuencias consenso que la flanquean y que se denominan secuencias "firma" (signature sequences). Las firmas en los extremos 5' (RCA MCA AAA) y 3' (TAY ATG TCG T), se utilizan así para identificar y delimitar la región de SSR's en Xr. La variabilidad en la longitud y en el polimorfismo de secuencias de las SSR's se ha aprovechado para utilizar a la región Xr como un marcador molecular en la caracterización de este patógeno, con la técnica llamada *spa*-typing (Harmsen et al., 2003). A la combinación de SSR's en la región Xr se le denomina *spa*-tipo y a la técnica se le conoce por su nombre en inglés *spa*-typing. En internet existe un sitio para *spa*-typing conocido como Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de/>). Este sitio un curador asigna un número de repetido (r) a cada SSR y al conjunto del número de repetidos le asigna un *spa*-tipo (t). El conjunto de *spa*-tipos reportados por los usuarios ha sido recopilado en esta base de datos internacional de libre acceso. Actualmente, se han reportado más de 616 repetidos distintos y 12,000 *spa*-tipos derivados de las combinaciones de repetidos cuyo número continúa en aumento. De manera alterna, para designar el *spa*-tipo de forma rápida y sin tener que esperar a la evaluación del curador, existen herramientas en internet como SPA Searcher (PeiXe<software>; <http://seqtools.com/>) y Spa Typer/Identifier (<http://fortinbras.us/cgi-bin/spaTyper/spaTyper.pl>) destinados exclusivamente para la identificación de los *spa*-tipos y de las firmas que flanquean a la región Xr. Estas dos herramientas dependen de la base de datos en la página de Ridom SpaServer. Sin embargo, no manejan los datos epidemiológicos presentes en Ridom SpaServer. A la fecha no existen programas de código abierto para el análisis de los *spa*-tipos y de la información epidemiológica relevante a los aislados, por lo que en el presente trabajo se creó, hasta donde sabemos, el primer programa bioinformático de código abierto para la búsqueda de *spa*-tipos que permita usar la base de datos internacional de *spa*-typing.

Material y Métodos

NiTSspa se desarrolló como una aplicación de escritorio en la plataforma Ubuntu 12.04 y con el Lenguaje de Programación Python en su versión 2.7.3, en tanto que la parte de la interfaz gráfica fue desarrollada con la biblioteca PyQ4 versión 4 y la herramienta para desarrollo de interfaces gráficas Qt Designer versión 4.81, todas estas herramientas con variantes de licencia libre. La implementación realiza una búsqueda inicial de lo que se conoce como firmas 5' y 3', y una vez detectadas y sobre la cadena resultante realiza una búsqueda exhaustiva de los repetidos y así finalmente se puedan localizar los *spa*-tipos contenidos en la secuencia analizada. Para las búsquedas se recurrió a la estructura de datos denominados Listas y a algunas funciones de manejo de cadenas contenidas en



Python. Este software se compone de dos archivos principales, int3i que contiene la interfaz gráfica y itf0000000000 que es donde está implementada la técnica *spa*-tipos.

Resultados y Discusión

NiTS*spa* procesa la información obtenida de la secuenciación de la región Xr para la búsqueda e identificación independiente de las secuencias firma 5' y 3' que flanquean la región de SSR's y la secuencia correspondiente a cada uno de los *spa*-tipos disponibles en la base de datos recuperada de Ridom SpaServer (Figura 1). Para validar el software diseñado, se analizaron secuencias obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas. Las secuencias se analizaron con el software de NiS*spa* y se compararon con lo obtenido en SPA Searcher (SeqTools) (<http://seqtools.com/>) y Spa Typer/Analyzer (<http://fortinbras.us/cgi-bin/spaTyper/spaTyper.pl>) SPA Searcher y Spa Typer/Analyzer siendo estas las herramientas de las que depende el análisis de *spa*-typing en internet. NiTS*spa* ocupa la base de datos de Ridom SpaServer (<http://spa.ridom.de/>) que aunque concentra la información de los *spa*-tipos no permite al usuario realizar comparaciones. Un aporte fundamental de Ridom SpaServer es que incluye datos epidemiológicos de los aislados y una relación de los perfiles genéticos obtenidos por las distintas técnicas utilizadas en *S. aureus* como Multi-locus Sequencing Typing (MLST) (<http://saureus.mlst.net/>), la identificación por la secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S (SRV`s) (<http://www.ridom-rdna.de/>), SCC*mec* typing (<http://www.staphylococcus.net/>) y de perfiles de macro-restricción en electroforesis de campos pulsados (PFGE; <http://www.harmony-microbe.net/microtyping.htm>). SPA Searcher y Spa Typer/Analyzer son herramienta que solamente manejan el análisis de secuencia de repetidos pero no ligan la base de datos de Ridom SpaServer con su información epidemiológica, al análisis de la secuencia de la región Xr. NiS*spa* aporta en una sola ventana el *spa*-tipo de la secuencia problema y toda su información epidemiológica relacionada encontrada en la base de datos internacional.

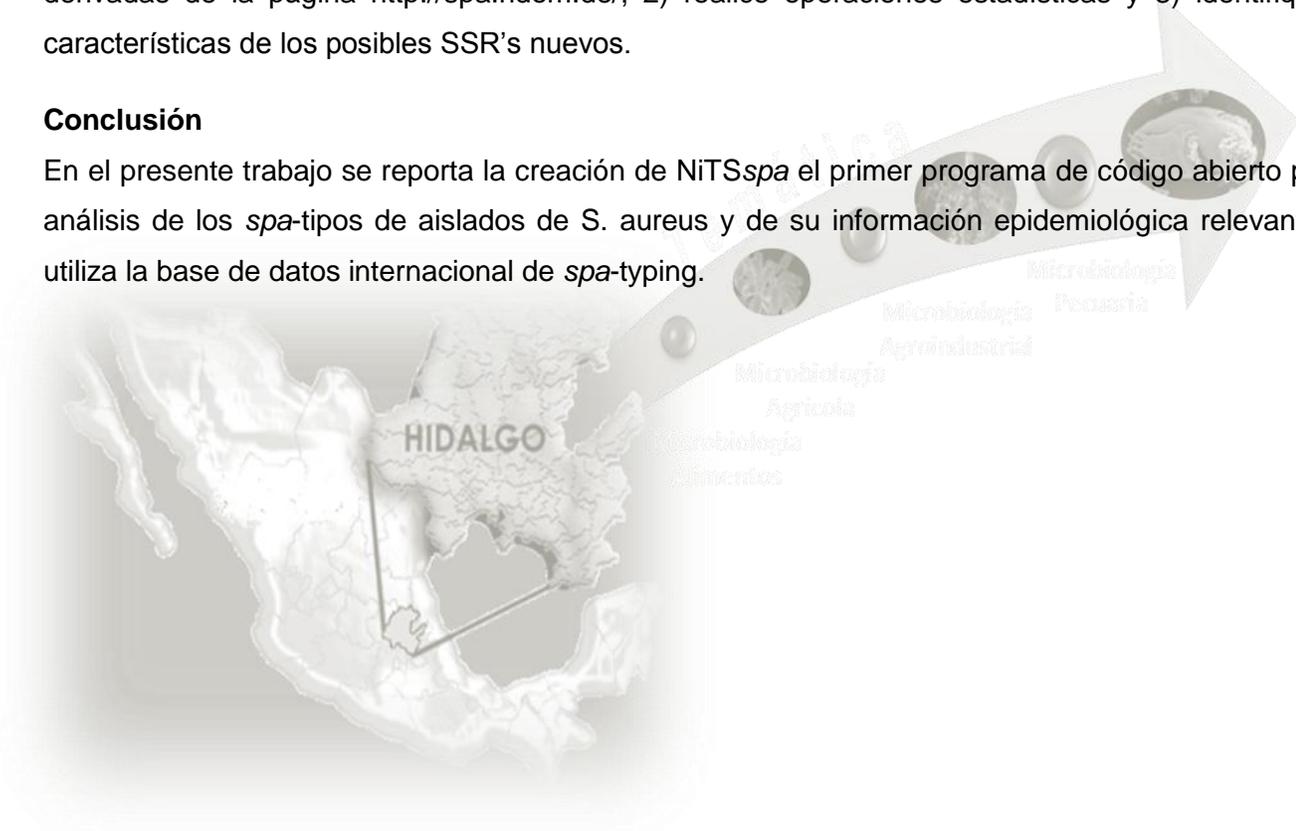
Para realizar la comparación de la información generada con la información contenida en las bases de datos es necesario utilizar programas bioinformáticos especializados. En la actualidad existe un aumento en la tendencia a crear programas de uso libre. Existen pocos programas especializados para el análisis global de datos de epidemiología molecular, como los *spa*-tipos en *S. aureus*. Hasta donde sabemos ninguno de ellos es de código abierto por lo que NiTS*spa* será el primer programa distribuido y desarrollado libremente cuya función principal será la detección del *spa*-tipo a partir de una secuencia curada de la región Xr del gen *spa* de *S. aureus* y que puede mostrar en una sola ventana la información epidemiológica relacionada, y permite la identificación de *spa*-tipos pudiendo trabajar sin necesidad de una conexión continua al internet.



La aplicación tiene como principales características el ser una aplicación de tipo escritorio, lo que no hace necesaria una conexión a Internet para su funcionamiento. Dado las herramientas en las que fue desarrollado le hacen ser un software libre y puede ser ejecutado tanto en plataformas Linux (Ubuntu), Windows y Mac OS. Los requerimientos del hardware son mínimos en cuanto a velocidad del procesador, memoria RAM mínima de 512 MB, y solamente requiere 4 MB de espacio en disco duro. En su etapa de desarrollo actual de NiTSspa se están desarrollando los códigos para incrementar las capacidades del software de manera que: 1) realice actualización automática de las bases de datos derivadas de la página <http://spa.ridom.de/>; 2) realice operaciones estadísticas y 3) identifique las características de los posibles SSR's nuevos.

Conclusión

En el presente trabajo se reporta la creación de NiTSspa el primer programa de código abierto para el análisis de los spa-tipos de aislados de *S. aureus* y de su información epidemiológica relevante que utiliza la base de datos internacional de spa-typing.



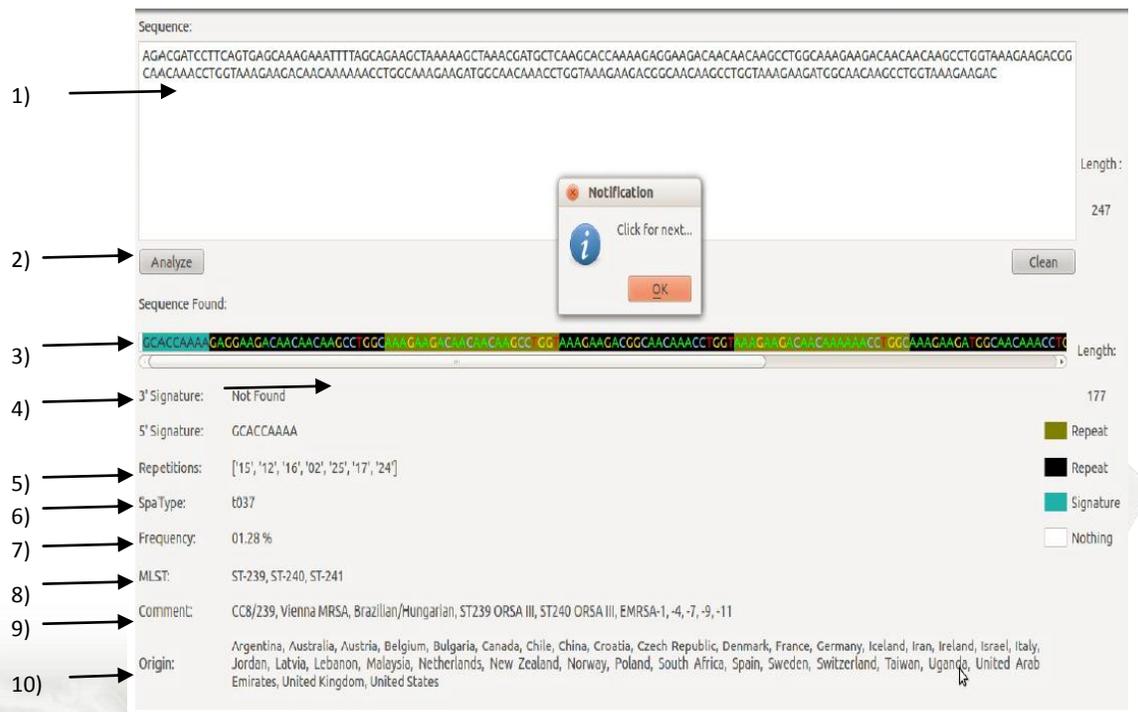


Figura 1. Imagen del cuadro de diálogo de NiTSspa. En ella se muestran los siguientes elementos: 1) ventana para insertar la secuencia a analizar; 2) botones para las acciones buscar/limpiar, con los que se activa la búsqueda, la limpieza de la ventana para insertar una nueva secuencia o la salida del software; 3) secuencia del *spa*-tipo delimitada por las firmas y que marca secuencias de los repetidos por colores; 4) marcas indicadoras de la integridad de las secuencias firma 5' y 3'; 5) indicador de la secuencia de repetidos; 6) indicador el *spa*-tipo encontrado, seguido de 7) frecuencia del *spa*-tipo encontrado; 8) la secuencia-tipo (MLST) asociada; 9) comentarios derivados de la base de datos de Ridom SpaServer y 10) origen reportado de los aislados.

Literatura citada

- Baizabal Aguirre, V., J. Oviedo Boyso, J. Valdez Alarcón, A. Bravo-Patiño, and M. Cajero-Juárez. 2009. Caracterización funcional de la interacción entre estructuras conservadas de *Staphylococcus aureus* y receptores celulares. . Mensaje Bioquímico 33:181-200.
- Garofalo, A., C. Gai, S. Lattar, N. Gardella, M. Mollerach, B. C. Kahl, K. Becker, A. S. Prince, D. O. Sordelli, and M. I. Gomez. 2012. The length of the *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection. J Infect Dis 206(1):81-90.



PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE *Phanerochaete chrysosporium* y *Fomes* sp. CULTIVADOS EN RASTROJO DE MAÍZ

Carrillo-Díaz M.I.¹, Alonso-Meneses T.L.², Miranda-Romero L.A.³

¹Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. ²Ingeniería en Biotecnología, Universidad Tecnológica de Tecamac. ³Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo.

Isabel_2224@live.com.mx

Resumen

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal componente de la pared celular de las plantas, representa una fuente de carbono con potencial para solucionar los problemas de energía actuales. Dentro de los diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la celulosa se encuentran los hongos ligninolíticos, puesto que degradan el material lignocelulósico a través de la producción de enzimas extracelulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de celulasas y xilanasas de los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Fomes* sp. cultivados por fermentación en estado sólido en rastrojo de maíz con y sin mazorca, con 20% de salvado de trigo como aditivo. El extracto crudo enzimático (ECE) se analizó para medir la actividad enzimática de celulasas y xilanasas con el reactivo DNS. Los dos hongos y los dos sustratos se evaluaron en un diseño completamente al azar 2x2 con arreglo factorial con una comparación de medias con la prueba de Tukey con el programa estadístico SAS 9.0. La mayor producción de celulasas y xilanasas se obtuvo con *Phanerochaete chrysosporium*. En el caso de de celulasas, el mejor sustrato fue el rastrojo de maíz sin mazorca, presentando el mayor pico de producción en el día 12. *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo con un alto potencial para degradación de materiales fibrosos. Los sustratos con alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina favorecen la producción de enzimas fúngicas que hidrolizan estos materiales.

Palabras Clave: Celulasas, Xilanasas, Hongos ligninolíticos.



Introducción

Los residuos, desperdicios, desechos agrícolas y de la industria de alimentos constituyen una proporción importante, ya que llegan a alcanzar más del 30% del total de la productividad agrícola mundial (Ugwuanyi *et al.*, 2009); estos materiales representan un gran potencial para solucionar los problemas de nutrición animal si se implementan tecnologías adecuadas para el uso apropiado de dichos desechos. En la actualidad existen productos comerciales obtenidos a partir de hongos que son utilizados ampliamente para mejorar la digestibilidad de forrajes o granos (Beauchemin *et al.*, 2004). Entre los aditivos para aumentar la digestibilidad de los alimentos lignocelulósicos, las enzimas exógenas fibrolíticas, al agregarse a estos materiales, pueden mejorar la utilización de los polisacáridos de los forrajes (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002). Los hongos de pudrición blanca han sido ampliamente estudiados, ya que son capaces de producir enzimas hidrolíticas, como las celulasas, xilanasas y lacasas; las cuales han sido probadas para su aplicación en la industria textil, del papel y en la producción de alimentos y biocombustibles (Rodrigues *et al.*, 2008). Se han utilizado diversas cepas de hongos como *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus humicola*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* y *Fomes fomentarius* (Pérez *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2008; Ovando y Waliszewski, 2005) para la obtención de extractos enzimáticos en la degradación de materiales fibrosos. En diversas investigaciones realizadas con tratamientos enzimáticos sobre la degradación de los materiales fibrosos, se ha observado un comportamiento favorable, ya que se incrementa la digestibilidad de manera considerable (Colombatto *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad enzimática producida por los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Fomes sp.* cultivados en rastrojo de maíz con y sin mazorca.

Material y Métodos

Para el cultivo del hongo se utilizó caldo papa dextrosa (24 g L^{-1}) y agar bacteriológico (15 g L^{-1}), en cajas Petri en las cuales se resembró el hongo para su crecimiento. Las cajas Petri con el hongo se dejaron incubando a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 días. Para la medición de la actividad enzimática de celulasas y xilanasas, se obtuvo un cultivo por fermentación en estado sólido utilizando como sustrato rastrojo de maíz con y sin mazorca, con 20% de salvado de trigo. La humedad de estos materiales fue ajustada al 80%. Los cultivos se prepararon en cajas Petri de vidrio conteniendo 14 g de sustrato. Estos materiales se esterilizaron a 121°C por 40 minutos. A cada caja Petri se le añadieron 4 discos (10 mm de diámetro) de micelio de cada hongo crecido en PDA y se incubaron a 35°C hasta su lectura. Las lecturas enzimáticas se realizaron a los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días de incubación. Para obtener el extracto enzimático, se traspasó el cultivo en estado sólido a matraces Erlenmeyer de 250 mL y se añadieron



70 mL de agua destilada a cada matraz, posteriormente se colocaron en un baño de hielo sobre una agitadora orbital y se agitaron a 120 rpm por 30 minutos. El líquido fue centrifugado a 7,000 rpm en tubos cónicos de 15 mL. Posteriormente se tomaron 2 mL para colocarlos en una centrífuga refrigerada a 4°C a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para la medición de actividad enzimática, denominado extracto crudo enzimático (ECE). Para la medición de celulasas y xilanasas se utilizó el método descrito por Miller *et al.*, (1960). Para celulasas se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich) al 1%, disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.0). Para xilanasas, se utilizó como sustrato una solución de xilano de madera (Sigma-Aldrich) al 0.5%, el cual fue disuelto en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.3). Para ambas enzimas, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro LAMBDA 35 PerkinElmer a 595 nm. El diseño experimental fue un completamente al azar con arreglo factorial 2x2x6. Se realizó un análisis de varianza para comparar la actividad enzimática de los sustratos, utilizando la prueba de Tukey con el procedimiento GLM para realizar la comparación de medias, con el paquete estadístico SAS 9.

Resultados y Discusión

Para la producción de celulasas, hubo diferencias significativas respecto al hongo utilizado ($p < 0.01$) ya que *Phanerochaete chrysosporium* obtuvo los valores más altos. Además se observó que el sustrato sin mazorca de maíz tuvo la mejor respuesta para la producción de esta enzima ($p < 0.01$). El mejor día para producción de enzima fue el día 12 ($p < 0.01$) como se observa en la figura 1. Respecto a xilanasas, también hubo diferencia para los hongos estudiados ($p < 0.05$), ya que *Phanerochaete chrysosporium* obtuvo los valores más altos. Para esta enzima no se presentaron diferencias entre los sustratos utilizados.

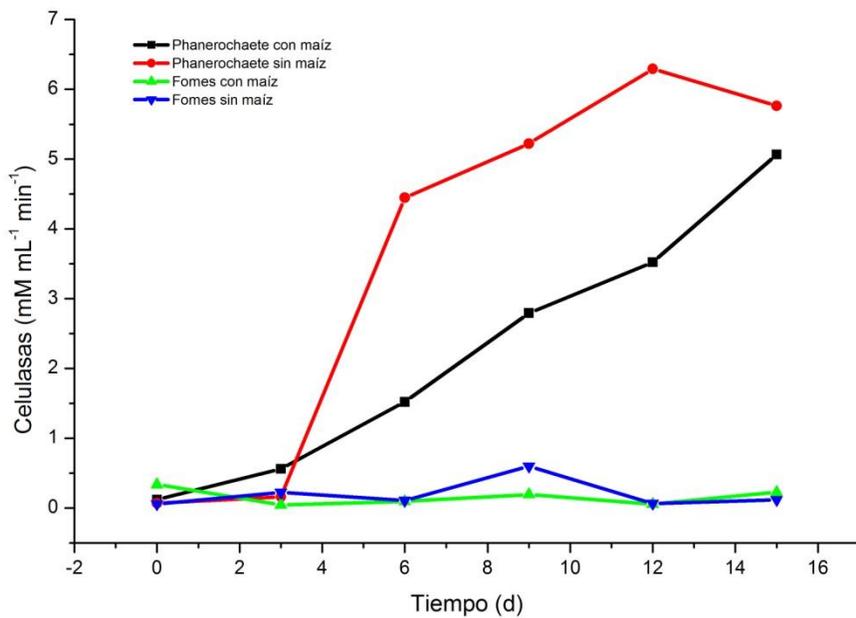


Figura 1. Producción de celulasas de *Phanerochaete chrysosporium* y *Fomes* sp. Cultivados en rastrojo de maíz.

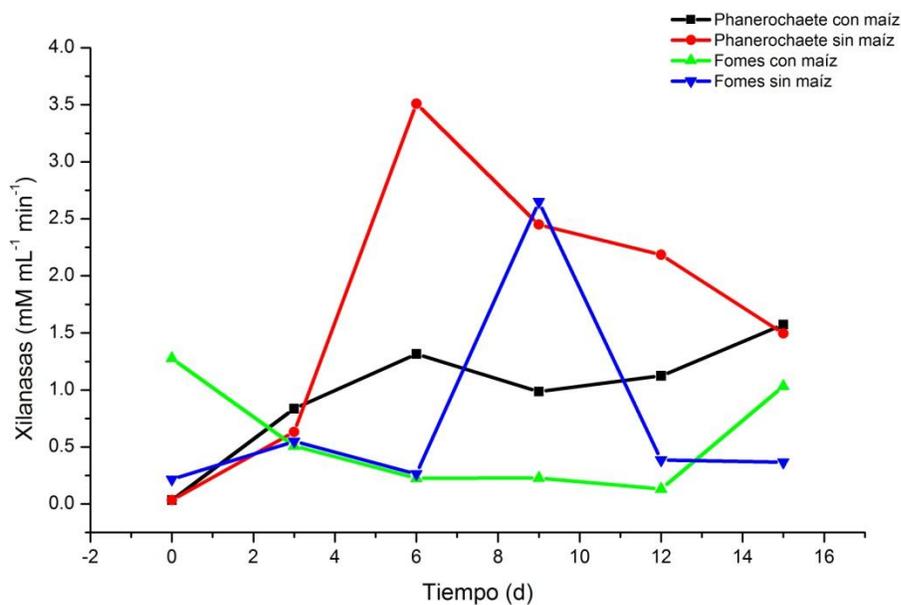


Figura 2. Producción de xilanasas de *Phanerochaete chrysosporium* y *Fomes* sp. Cultivados en rastrojo de maíz.



Los resultados de producción de celulasas y xilanasas concuerdan con otros autores, ya que *P. chrysosporium* es uno de los más eficientes en degradar lignina de la madera, además de liberar varios tipos de celulasas (Pérez *et al.*, 2002), lo cual puede permitir que haya una mayor hidrólisis del complejo lignocelulósico de los materiales fibrosos. Estudios similares realizados con este hongo cultivado en rastrojo de maíz por fermentación en estado sólido, indican que la mayor hidrólisis de este material fibroso se obtuvo en el día 9 (Zhang *et al.*, 2012). Probablemente esta diferencia se deba a una mayor cantidad de sustrato utilizada en el presente estudio.

Conclusiones

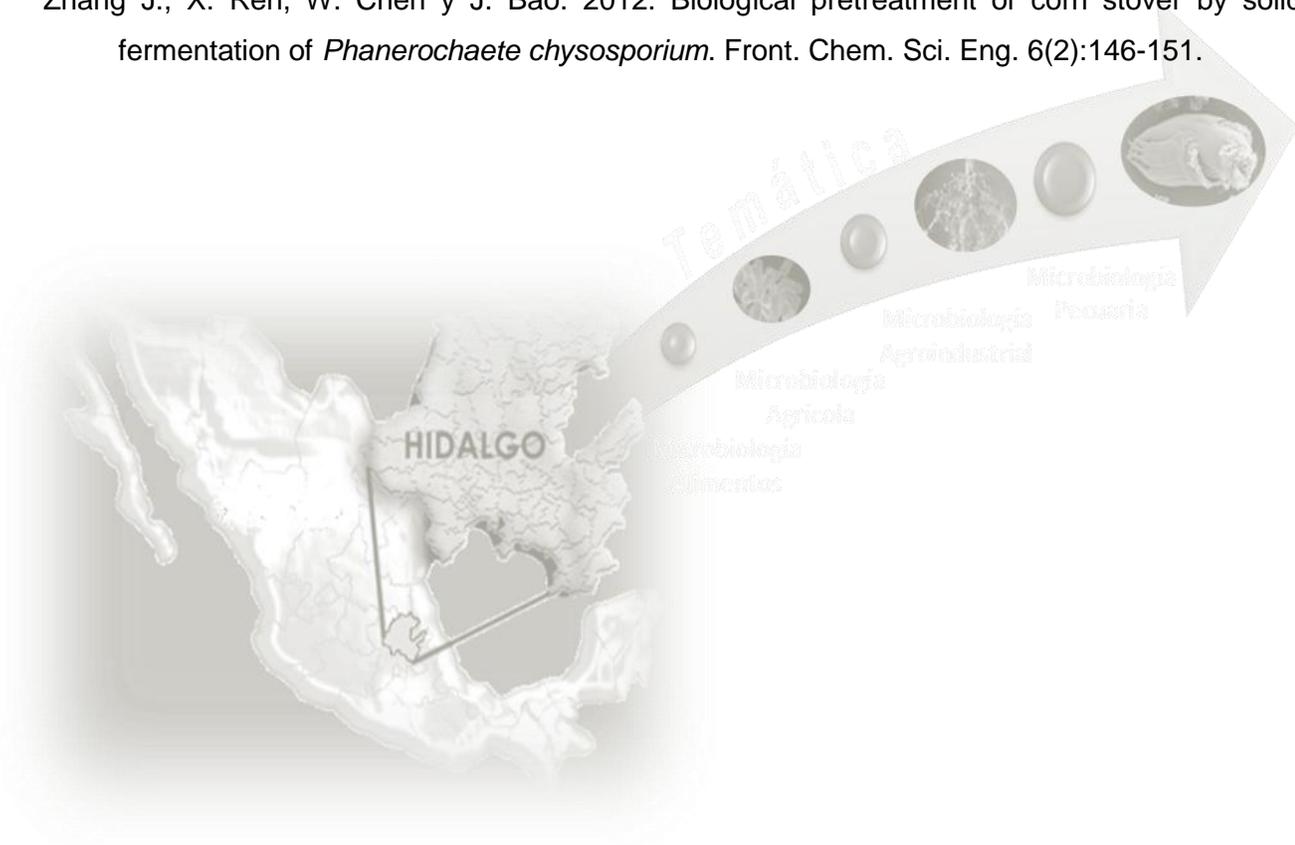
El hongo *Phanerochaete chrysosporium* puede ser utilizado para la producción de enzimas que favorecen la degradación de los materiales lignocelulósicos. El rastrojo de maíz sin mazorca promueve una producción de celulasas por los hongos ligninolíticos.

Literatura citada

- Beauchemin, K.A., D. Colombatto and D.P. Morgavi., 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 84(1): 23-35.
- Colombatto, D., F. L Mould., M. K. Bhat and E. Owen. 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. and Tech.* (137):150-162.
- Pérez J., J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia y J. Martínez. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* (5): 53–63
- Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, R. Bárcena, M. A. Cobos, A. Hernández y M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science.* (80): 3016-3020.
- Miller, G. L., R. Blum, Glennon, W. E., Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry.* (2): 127-132.
- Ovando C.S.L. y K.N. Waliszewski. 2005 preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.* (21):42;113-122.
- Pinos-Rodríguez J. M., S. González., G. Mendoza., J. C. García., L. Miranda., G. A. De La Cruz., y V. De Lerma. 2005. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación *in vitro* de ingredientes alimenticios, y en la producción de leche de vacas holstein. *Interciencia* (30):12.



- Rodrigues M.A.M., P. Pinto, R.M.F. Bezerra, A.A. Dias, C.V.M. Guedes, V.M.G. Cardoso, J.W. Cone, L.M.M. Ferreira, J. Colaco y C.A. Sequeira. 2008. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology* (141): 326–338.
- Ugwuanyi, J. O., B. McNeil, and L. M. Harvey. 2009. Chapter 5 Production of Protein-Enriched Feed Using Agro-Industrial Residues as Substrates *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Part II, 78-103.
- Zhang J., X. Ren, W. Chen y J. Bao. 2012. Biological pretreatment of corn stover by solid state fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Front. Chem. Sci. Eng.* 6(2):146-151.





CINETICA DE DEGRADACIÓN DE ONCE VARIEDADES DE NOPAL DEL ESTADO DE PUEBLA

Vazquez Mendoza P.^{1*} Miranda Romero L. A.¹, Aranda Osorio G.¹, Burgueño Ferreira J. A.²

¹Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-
Texcoco, CP 56230, Chapingo, México. ²Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CP
56130. El Batán, Texcoco, Estado de México
vazmepa@gmail.com

Resumen

La evaluación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes a través de técnicas como la de producción de gas *in vitro* es importante debido a su facilidad y que permite determinar la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido, por lo que el objetivo de la investigación fue determinar la cinética de degradación de once variedades de nopal del Estado de Puebla. Se detectaron diferencias estadísticas significativas entre variedades de nopal ($P < 0.05$), la variedad Roja Vigor fue la que presentó el mayor volumen de gas durante el periodo de incubación, la tasa de degradación y el tiempo de retardo también presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre variedades. La cinética de fermentación nos permitió conocer que la variedad Roja Vigor, seguida de la variedad Villanueva son las que presentaron una mayor producción de gas y que mantuvieron este comportamiento en el volumen fraccional a la hora 16, 38 y 72. La mayor producción de gas se da durante las primeras 16 horas debido a la naturaleza de los componentes del nopal, para el caso de todas las variedades.

Palabras clave: *técnica de producción de gas, nopal, cinética de degradación*

Introducción

La evaluación del valor nutritivo de alimentos para rumiantes es importante, debido a que de ellos depende la productividad de animales que los consuman. Existen diferentes técnicas para determinar el valor nutritivo de los alimentos, una de ellas es la técnica de producción de gas, ésta es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación de algún alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou *et al.*, 1994). Una de las ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Pell *et al.*, 1993), además de la relación con el



crecimiento de la población microbiana. El objetivo de la investigación fue determinar la cinética de degradación de once variedades de nopal de San Sebastián Villanueva, Acatzingo, Puebla.

Material y Métodos

Material vegetal: durante el mes de Marzo de 2013 se colectaron cladodios de nopal de las variedades Roja Vigor, Xoconostle, Villanueva, Sangre de Cristo, Milpa Alta, Burrón, Atlixco, Cristalina, Roja San Martín, Ceniza Roja, Roja Pelota de la comunidad de San Sebastián Villanueva, Acatzingo y Puebla. Los cladodios se cortaron en finas rodajas, se secaron a 65 °C, hasta obtener peso contante y se molieron en molino Willey (1 mm).

Fermentación y digestibilidad *in vitro* por consorcios microbianos ruminales de ovinos: se estimó indirectamente por la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994). Se obtuvo líquido ruminal de tres ovinos con cánula ruminal, el líquido se manejo de manera individual y se filtro con ayuda de una gasa, los ovinos eran alimentados con una dieta a base de 100% ensilado de maíz. El líquido ruminal de cada animal se mezcló de manera individual con una solución mineral en una proporción 1:9 v/v (Menke y Steingass, 1998; Krishnamoorthy *et al.*, 2005). Se adicionaron 90 mL del inóculo diluido bajo un flujo constante de CO₂, a frascos color ámbar de 120 mL de capacidad, los cuales contenían 0.5 g de MS de una variedad de nopal. Los frascos se taparon herméticamente y se colocaron en baño María a 39 °C. La presión de gas se registro con un manómetro (1 kg cm⁻²) a 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 38, 50 y 72 h de incubación y posteriormente fueron transformadas a volumen de gas con la ecuación de regresión ($V=p/0.019$).

Variables y análisis estadístico: se determinaron los parámetros volumen máximo (V_m , mL g⁻¹) y volumen fraccional a la hora 16, 38 y 72, tasa de producción (S , h⁻¹) y tiempo de retardo (L , h) de la cinética de producción de gas, usando los datos de volumen de gas acumulado (V_o) con respecto al tiempo de incubación (T) y el modelo logístico $V_o=V_m/(1+\exp(2-4*S*(T-L)))$. El diseño fue completamente al azar con tres repeticiones y la prueba de comparación múltiple de medias con Tukey ($\alpha = 0.05$).



Resultados y Discusión

La cinética de degradación de un alimento puede describirse a través del volumen total de gas producido, la tasa de producción de gas y el tiempo de retardo. El volumen máximo de gas fue diferente entre variedades ($P < 0.05$), la variedad Rojo Vigor produjo 36% más gas que el promedio de las demás variedades (Cuadro 1).

La tasa de producción de gas presentó diferencias estadísticas significativas entre las variedades de nopal estudiadas ($P < 0.05$), la variedad Villanueva seguida de la Roja San Martín, presentaron las tasas más altas, seguidas de las variedades Burrón, Roja Vigor, Xoconostle, Roja Pelota y Cristalina, la de menor tasa de producción fue la variedad Milpa Alta. El tiempo de retardo también fue diferente entre variedades ($P < 0.05$), la variedad Ceniza Roja fue la de menor tiempo de retardo y la de mayor tiempo la Roja Vigor.

El volumen fraccional durante las primeras 16 horas fue diferente entre variedades ($P < 0.05$), la variedad Roja Vigor y Villanueva fueron las que produjeron más gas, manteniendo un comportamiento similar a la hora 38 y 72, lo que se reflejó en un mayor volumen de gas, en los promedios de volumen máximo. Sin embargo, aunque produjeron más gas todas las variedades muestran un comportamiento similar, esto puede deberse a que el nopal es considerado como una buena fuente de carbohidratos no fibrosos rápidamente fermentables (Batista *et al.*, 2009). En el nopal, las fracciones de carbohidratos rápidamente fermentables (azúcares y ácidos orgánicos) y medianamente fermentables (almidón) constituyen el 42 y 19 %, respectivamente, del total de carbohidratos (Batista *et al.*, 2003), lo que genera condiciones para el desarrollo de microorganismos amilolíticos como *Bacteroides amylophilus* y *Streptococcus bovis*.



Cuadro 1. Valores promedio de la cinética de fermentación de variedades de nopal.

Variedad	V_m (mL g ⁻¹ MS)	S (h ⁻¹)	L (h)	V₁₆ (mL g ⁻¹ MS)	V₃₈ (mL g ⁻¹ MS)	V₇₂ (mL g ⁻¹ MS)
Roja vigor	378.33 ^a	0.0400 ^{abc}	2.834 ^a	224.40 ^a	134.65 ^a	51.52 ^a
Xoconostle	289.90 ^b	0.0406 ^{abc}	2.720 ^a	174.04 ^{bc}	102.13 ^b	38.47 ^{abc}
Villanueva	305.03 ^b	0.0456 ^a	1.851 ^{abc}	204.36 ^{ab}	93.98 ^b	35.73 ^{abc}
Sangre de cristo	266.33 ^b	0.0353 ^{bc}	0.864 ^{bcd}	159.94 ^{bc}	86.39 ^b	48.75 ^{ab}
Milpa alta	244.40 ^b	0.0320 ^c	0.281 ^d	139.12 ^c	83.50 ^b	44.86 ^{abc}
Burrona	254.93 ^b	0.0410 ^{abc}	0.946 ^{bcd}	165.35 ^{bc}	77.96 ^b	37.26 ^{abc}
Atlixco	241.20 ^b	0.0356 ^{bc}	1.823 ^{abc}	135.47 ^c	87.60 ^b	38.87 ^{abc}
Cristalina	244.80 ^b	0.0383 ^{abc}	0.799 ^{cd}	151.36 ^c	81.14 ^b	34.89 ^{bc}
Roja San Martin	235.13 ^b	0.0426 ^{ab}	1.863 ^{abc}	151.25 ^c	75.86 ^b	30.12 ^c
Ceniza roja	248.00 ^b	0.0360 ^{bc}	0.000 ^d	152.11 ^c	77.77 ^b	44.79 ^{abc}
Roja pelota	271.77 ^b	0.0400 ^{abc}	1.993 ^{ab}	169.25 ^{bc}	85.98 ^b	48.67 ^{ab}
EEM	14.29	0.0017	0.226	1.05	1.12	1.26

V_m = volumen máximo a 72 h de incubación, S = tasa de producción de gas, L = tiempo lag, V₁₆ = volumen fraccional a la hora 16, V₃₈ = volumen fraccional a la hora 38, V₇₂ = volumen fraccional a la hora 72, EEM= error estándar de la media. Literales diferentes en columnas indica diferencias significativas (P < 0.05).

El volumen fraccional a la hora 38 mostró diferencias (P < 0.05) entre variedades, y siguió un patrón de comportamiento similar al de volumen máximo para cada variedad y el volumen fraccional a la hora 72 fue diferente estadísticamente entre variedades (P < 0.05), siguiendo el patrón de comportamiento de las primeras 16 y 38 horas. Sin embargo, el volumen de gas producido en el intervalo de tiempo de 32 horas (hora 72) fue bajo comparado con las primeras 16 horas de fermentación, relacionado posiblemente con la degradación de los componentes de fibra (celulosa y hemicelulosa) cuya degradación es más baja que las fracciones solubles (Van Soest, 1994).

En la Figura 1 se puede observar el comportamiento de la producción de gas de las variedades a través de 72 horas de incubación, la variedad Roja Vigor es la que presenta el volumen más alto de producción de gas, manteniéndose en esta posición hasta el final del periodo de incubación, sin embargo todas las variedades presentaron el mismo comportamiento. Todas las variedades en



promedio produjeron, durante las primeras 16 horas de incubación, el 63% del total de gas producido durante 72 horas de incubación.

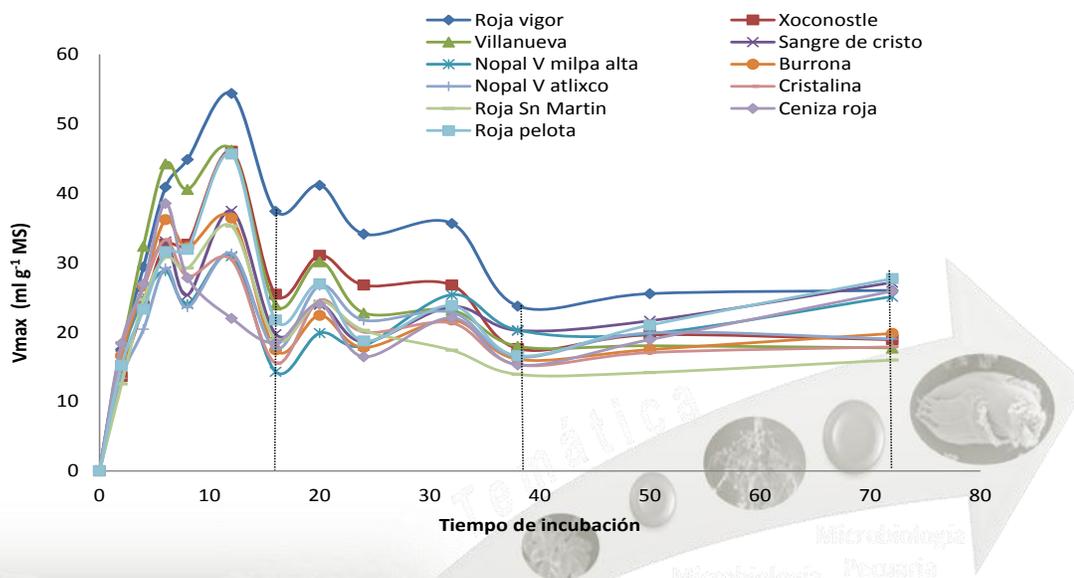


Figura 1. Volumen fraccional de variedades de nopal a 72 horas de incubación.

Conclusiones

La cinética de fermentación permitió conocer que la variedad Roja Vigor, seguida de la variedad Villanueva, son las que presentaron una mayor producción de gas y que mantuvieron este comportamiento en el volumen fraccional a la hora 16, 38 y 72. La mayor producción de gas se da durante las primeras 16 horas debido a la naturaleza de los componentes del nopal, para el caso de todas las variedades.

Literatura Citada

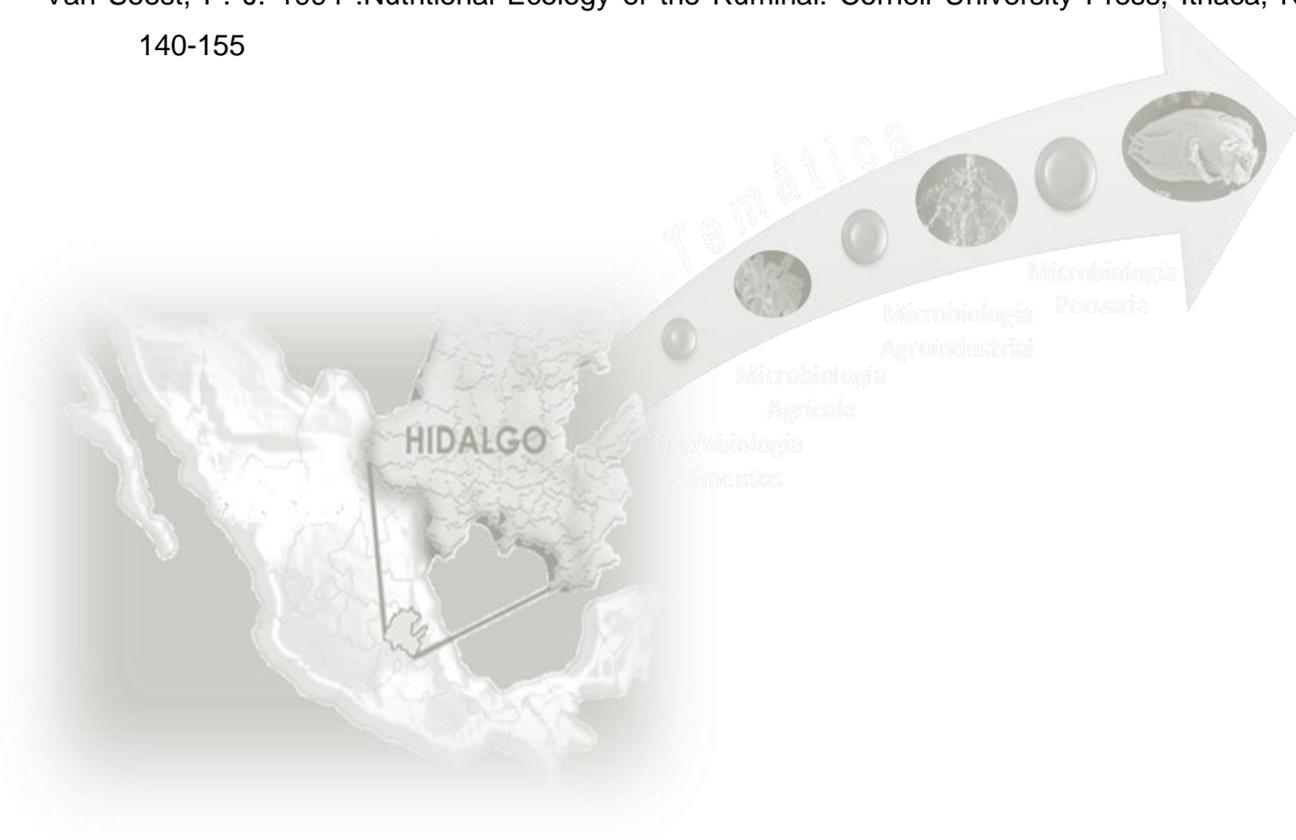
- Batista, A. M., A. F. Mustafa, T. McAllister, Y. Wang, H. Soita, and J. J. McKinnon. 2003. Effect of variety on chemical composition, in situ nutrient disappearance and *in vitro* gas production of spineless cacti. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 440-445.
- Batista, A. M., A. C. Ribeironeto, R. B. Lucena, D. C. Santos, J. B. Dubeux Jr, and A. F. Mustafa. 2009. Chemical composition and ruminal degradability of spineless cactus grown in Northeastern Brazil. *Rangeland Ecology and Management*. 62:297-301.
- Krishnamoorthy, U., Rymer, C., Robinson, P.H. 2005. The *in vitro* gas production technique: limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology* 123-124:1-7.



III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013



- Menke, K. H., Steingass, H. 1998. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*. 28:7-55.
- Pell, A. N. and Schofield P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 76: 1063-1073.
- Theodorou, M. K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Feed Science and Technology*. 48: 185-197.
- Van Soest, P. J. 1994 .Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY. pp. 140-155





DEGRADABILIDAD DE CAROTENOIDES EN *Cynodon plectostachyus* DETERMINADO CON TÉCNICA *IN SITU* DE BOLSAS MÓVILES EN BOVINOS

Cruz-Monterrosa R.G.¹Ramírez-Bribiesca J. E.²Guerrero-Legarreta I.³

¹ Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Lerma. ² Posgrado en Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. ³ Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa
r.cruz@correo.ler.uam.mx

Resumen

Se seleccionó pasto Estrella (*Cynodon plectostachyus*) como material de estudio para ser evaluada en 4 novillos Holstein (384±60 kg) cánulados en rumen y duodeno. La disminución de los nutrientes durante el paso por el intestino se determinó mediante la técnica de bolsas móviles, la cual consistió en colocar en bolsas de nylon una cantidad conocida del forraje, se introdujeron a través de la cánula del rumen e incubaron por un tiempo determinado. Las bolsas se retiraron, se introdujo un total de 20 bolsas en lotes de 5 a través de la cánula del duodeno. Las bolsas se recolectaron de las heces; se analizó el contenido de carotenoides totales y de materia seca (MS). Se observó una disminución significativa de carotenoides ($P<0.001$) en el rumen durante las primeras 12 h; posteriormente, entre 24 y 72 h, esta disminución no fue significativa ($P=0.71$). Alrededor de 53% de carotenoides contenidos en *Cynodon* spp. en las bolsas duodenales (no incubadas previamente en rumen) disminuyó cuando se introdujeron en el intestino delgado. Las bolsas con más tiempo de incubación en el rumen contenían menor concentración de carotenoides, por lo tanto, la cantidad total degradada en el intestino delgado se redujo significativamente ($P<0.001$). Los resultados de este estudio mostraron que una proporción alta de carotenoides no fueron degradados a través de rutas metabólicas microbianas en el rumen. Se concluyó que el tiempo de incubación es un factor que contribuye a la variación en la biodisponibilidad de los carotenoides.

Palabras clave: *Materia seca, rumen, pasto estrella*



Introducción

Una de las principales limitantes en la producción de carne de bovino en México es la pigmentación amarilla del tejido adiposo en las canales de bovinos, cuando son engordados en pastoreo. Este problema disminuye la comercialización tanto en el mercado nacional como en el extranjero. El color de la grasa está determinado por pigmentos ingeridos durante el pastoreo. Específicamente, el problema radica en el consumo de forrajes verdes, los cuales contienen abundantes pigmentos, incluyendo a los carotenoides y pigmentos naturales liposolubles.

El β -caroteno, uno de los carotenoides más abundantes en la naturaleza, también es el que se encuentra en mayor proporción en tejido adiposo de los rumiantes, dando la coloración amarilla a este tejido (Mora, 1999). Aunque los carotenos son una fuente importante de Vitamina A, no todo el β -caroteno ingerido y absorbido es transformado a esta vitamina; una cantidad considerable puede circular en la sangre y se deposita en el tejido adiposo e hígado, dando como resultado el depósito de β -carotenos no transformados. Como consecuencia, se presenta el color amarillo en la grasa de las canales de bovinos finalizados en pastoreo. El objetivo del presente estudio es estudiar la desaparición y digestibilidad de los pigmentos carotenoides en el canal digestivo de rumiantes utilizando la técnica de bolsas móviles en bovinos cánulados.

Metodología

Se utilizaron 4 novillos Holstein (384 ± 60 kg), con cánula ruminal y duodenal, alojados en corraletas individuales de 2.42 x 3.74 m, el estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados. Los animales contaban con libre acceso a agua, la ingesta de materia seca de alfalfa henificada se calculó en 3% del peso corporal; se alimentaron diariamente a las 8 y 18 horas.

Incubación de forraje en el rumen

Se emplearon bolsas de nylon de 20 x 10 cm y de 5 x 3 cm, ambas de 47 μ de tamaño de poro; cada bolsa fue pesada e identificada; a las de mayor tamaño se les colocó en su interior 7 g y a las de menor tamaño 1.2 g de muestras de pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*). Para obtener muestras a la hora cero, se separaron 10 bolsas de 20 x 10 cm conteniendo pasto estrella antes de la incubación en el rumen; se lavaron con agua corriente y se almacenaron en congelación (-20°C) hasta su análisis. El resto de las bolsas conteniendo al forraje se fueron introduciendo a incubación por 12, 24, 48 y 72 h en el rumen, empleando 10 repeticiones para las bolsas de mayor tamaño y 20 repeticiones para las de menor tamaño (2 repeticiones por cada animal). Las bolsas se introdujeron unidas a una cadena con el objetivo que flotaran en el fluido ruminal; estas se retiraron tirando de la cadena. Las bolsas de



nylon de 20 x 10 cm se lavaron repetidamente con agua corriente hasta que eliminar todo residuo de líquido ruminal; las bolsas de 5 x 3 cm se emplearon para continuar con el estudio de digestibilidad.

Incubación de forraje en el intestino

La desaparición de nutrientes durante el paso por el intestino se determinó mediante la técnica de bolsas móviles, reportada por De Boer y col. (1987). Terminada la incubación en el rumen por 12, 24, 48 y 72 h de las bolsas móviles de 5 x 3 cm, estas se introdujeron en condiciones que simulaban la digestión abomasal. Se introdujeron 5 bolsas en la cánula del duodeno cada 15 min hacia el intestino delgado, totalizando 20 bolsas. Estas bolsas fueron recuperadas y recolectadas después de 12 a 14 h en las heces; se colocaron en recipientes con agua fría (aproximadamente 6-10°C) con el objeto de detener la actividad microbiana y se lavaron para retirar los residuos externos. Las muestras de forraje de las bolsas recolectadas en las heces se conservaron en frascos ámbar a -20°C hasta su análisis. Para la cuantificación de los carotenoides totales se empleó una modificación de la técnica reportada por Bruinsma (1963). Se empleó un espectrofotómetro Spectronic 20 (Milton Roy, Rochester, Estados Unidos), las muestras se leyeron a 454 nm utilizando como blanco éter de petróleo.

Resultados y Discusión

1. Desaparición de MS y carotenoides totales en el rumen

La Figura 1 muestra la desaparición de la MS y carotenoides presentes en el pasto Estrella durante su incubación en el rumen. Cuarenta y tres por ciento de MS y carotenoides totales desaparecieron durante las primeras 12 h ($P < 0.001$). De 12 a 72 h de incubación, la MS alcanzó una desaparición de 62%, mientras los carotenoides de 73% ($P < 0.0001$).

El coeficiente de correlación entre la desaparición de la MS y los carotenoides totales fue $r = 0.997$ ($P < 0.001$). Considerando la MS, la concentración de carotenoides totales y la disminución de la concentración de estos dos componentes durante el periodo de estudio, se obtuvieron los siguientes modelos:

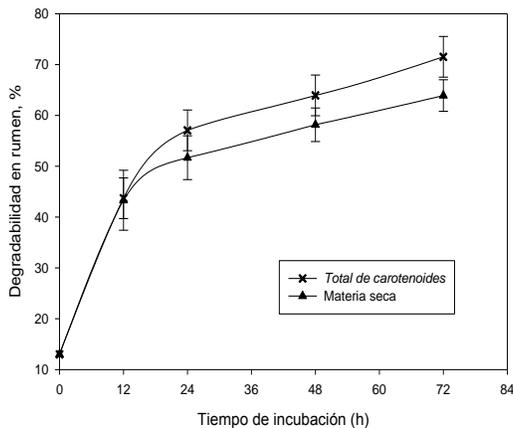


Figura 1. Desaparición *in situ* de MS y carotenoides totales de pasto Estrella (25 días de rebrote) en el rumen de novillos Holstein

Materia seca desaparecida

$$\text{MSD (\%)} = 13.7487 + 2.9919X - 0.066X^2 + 0.0005 X^3$$
$$(r^2 = 0.99)$$

Carotenoides totales desaparecidos

$$\text{CT (\%)} = 13.2506 - 3.227X - 0.689X^2 + 0.0005X^3$$
$$(r^2 = 0.99)$$

Los resultados obtenidos por Mora y col. (1999) coinciden con los obtenidos en este estudio respecto a la desaparición en el rumen de carotenoides del forraje. Las diferencias en la desaparición de carotenoides en el rumen pueden ser debidas a las características de la población microbiana, influida por las dietas integrales o pastoreos (Rode y col., 1990).

2. Desaparición de carotenoides en el intestino

Se observó una desaparición de 53% (Cuadro 1) de carotenoides en las bolsas no incubadas e introducidas en el intestino delgado. En cambio, en las bolsas incubadas previamente en el rumen, aquellas con más tiempo de incubación contenían menos carotenoides y, por lo tanto, la desaparición en el intestino delgado se redujo ($P < 0.001$) (Cuadro 1).



Cuadro 1. Desaparición de carotenoides totales en *Cynodon plectostachyus* en el canal digestivo de novillos Holstein

Incubación ruminal (h)	Degradabilidad de carotenoides (%)		
	Rumen	Post-ruminal	Total del canal
0	-----	0.532 ± 0.097 ^a	0.532 ± 0.097 ^a
12	0.437 ± 0.095 ^{a (*)}	0.278 ± 0.086 ^b	0.717 ± 0.101 ^b
24	0.570 ± 0.062 ^b	0.192 ± 0.043 ^c	0.762 ± 0.096 ^b
48	0.639 ± 0.079 ^{b,c}	0.214 ± 0.049 ^{b,c}	0.852 ± 0.096 ^{b,c}
72	0.715 ± 0.055 ^c	0.221 ± 0.018 ^{b,c}	0.934 ± 0.049 ^c

(*) Medias con superíndices diferentes en la misma columna difieren

(□□0.05)

El tiempo de incubación es un factor que contribuye a la variación en la biodisponibilidad de los carotenoides; en muestras que no se incubaron, solamente 53.2% de los carotenoides desapareció y 46.8% se excretó en la materia fecal. Posteriormente, al incubar el pasto Estrella de 12 a 72 h, los carotenoides desaparecieron progresivamente en el rumen y en el intestino delgado ($P < 0.0001$). Los resultados hacen suponer un ataque de microorganismos ruminales a la MS y, en consecuencia, ocurre mayor disponibilidad y desaparición de los carotenoides. Esto ocasionó que la desaparición de carotenoides alcance 93.4% cuando las bolsas fueron incubadas por 72 h (Cuadro 1). Es posible que en paralelo ocurriera un cambio químico de los carotenoides en el rumen relacionado con reacciones parciales de hidrogenación, sin llegar a una saturación de las dobles ligaduras (Bloomfield, 1997).

Conclusión

La degradabilidad *in situ* del pasto estrella mostró una alta disponibilidad de carotenoides en el rumen, asociada estrechamente con la degradabilidad de la materia seca. Es importante que en futuros estudios se considere la tasa de degradabilidad de carotenoides tomando en cuenta la época del año, y los estados fenológicos de los forrajes.



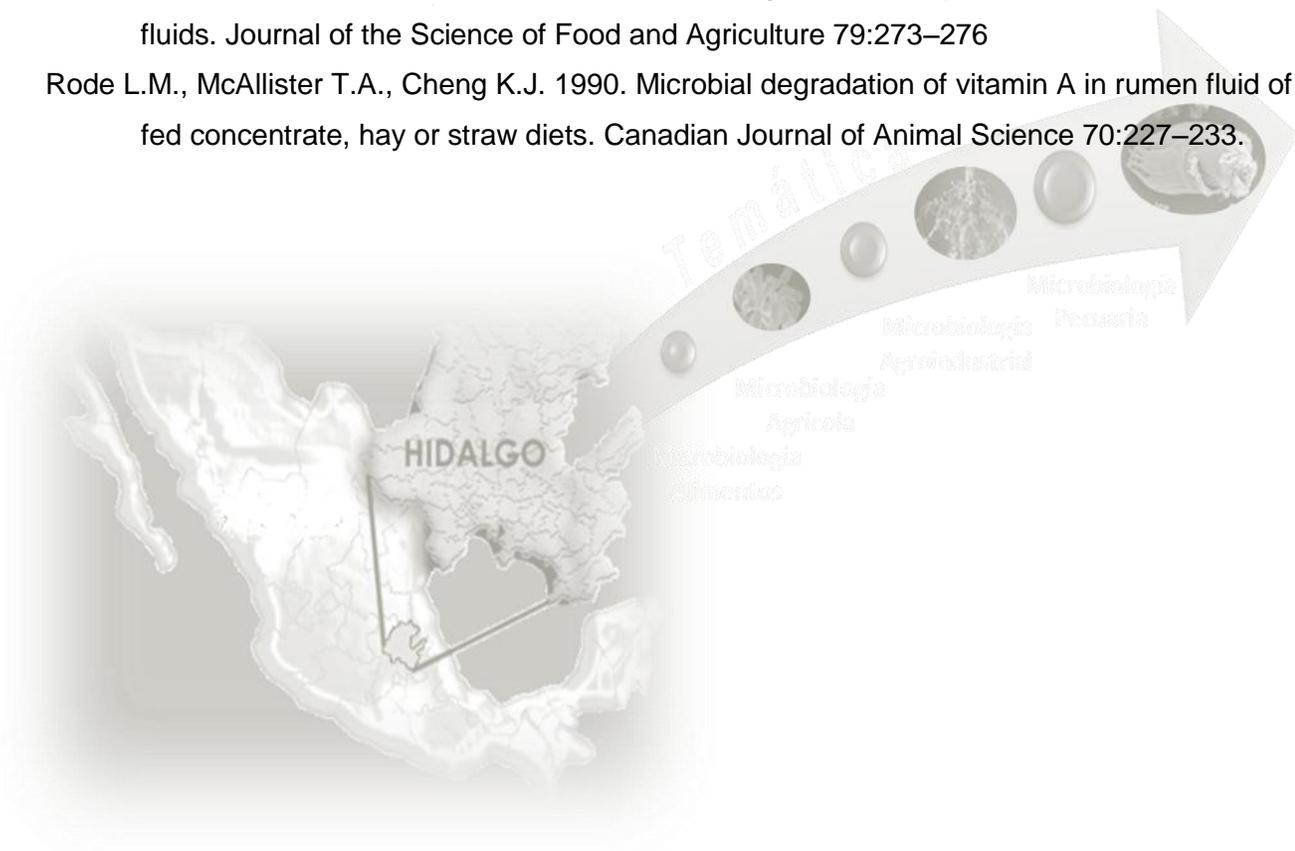
Literatura citada

Bloomfield, M. 1997. Química de los Organismos Vivos. Editorial LIMUSA, México D.F.

de Boer G., Murphy J.J., Kennelly J.J. 1987. Mobile nylon bag for estimating intestinal availability of rumen undegraded protein. *Journal of Dairy Science* 70:977–982

Mora O., Romano J.L., González E., Ruiz F.J., Shimada A., 1999. *In vitro* and *in situ* disappearance of betacarotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:273–276

Rode L.M., McAllister T.A., Cheng K.J. 1990. Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid of steers fed concentrate, hay or straw diets. *Canadian Journal of Animal Science* 70:227–233.





PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA FORRAJERA USANDO MUCILAGO DE CAFÉ ENRIQUECIDO CON MELAZA Y UREA COMO MEDIO DE CULTIVO

Piloni Martini J.^{1*}, Cobos Peralta M. A.²; Torres Cardona M. G.¹, Meza Nieto M.¹, Del Razo Rodríguez O. E.¹, Quintero Lira A.¹, Güemes Vera N.¹

¹Area Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ²Posgrado en Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

chipiloni@hotmail.com

RESUMEN

El mucílago es uno de los residuos que genera alta contaminación, dentro de su composición química, el 35,8% son sustancias pécticas totales, 17% celulosa y cenizas, 45,8% azúcares totales, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos y minerales, por lo que el mucílago puede ser un excelente medio de cultivo para levaduras. El término proteína unicelular (PUC) ha sido empleado para referirse a microorganismos tales como bacterias, levaduras, hongos filamentosos y algas, que son empleados con fines alimenticios, principalmente por su alto contenido proteico, por volumen de producción, las levaduras son los microorganismos más importantes, y ampliamente utilizados en la industria. Para la producción de la proteína unicelular se utilizaron dos levaduras (LP12 y la MMH4) en diferentes medios de cultivo elaborados con mucílago de café más melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0%). Ambas levaduras fueron inoculadas en medios de cultivos con una concentración inicial de 13% w/w de ART. A las 24 h de fermentación las dos levaduras degradaron más del 90% de ART no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Comparando estadísticamente las dos levaduras se puede decir que LP12 reportó la mayor producción de biomasa ($p \leq 0.05$) con un promedio de 7.5 g/L en base seca, mientras que la producción de biomasa obtenida por la levadura MMH4 ($p \leq 0.05$) fue de 4.1 g/L en base seca.

Palabras Claves: *levaduras, fermentación, azúcares reductores directos y totales*

INTRODUCCIÓN

México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial como productor de café cereza, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam. A nivel nacional se cultiva en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, Tabasco, Morelos, Querétaro y Michoacán (Roousos *et al.*, 1989; SAGARPA, 2013). La planta del café pertenece a la



familia *Rubiáceas* y al género *Coffea* el cual comprende diferentes especies. Existen más de 40 especies de este género las más comercialmente cultivadas son: *Coffea arabica*, *Coffea canéphora* (robusta), *Coffea arabusta*, *Coffea liberica* y *Coffea excelsa*. Todas ellas producen un fruto llamado café o cereza de café (Adams y Dougan, 1981). La cereza de café está compuesta por dos semillas rodeadas por una membrana delgada llamada “pergamino”, seguida del endocarpo, que es una cubierta dura llamada “vitelo”, en la parte externa se encuentra el mesocarpo pulposo o mucílago, el cual está cubierto por el exocarpo que se refiere a la piel o pulpa del fruto (Arunga, 1973; Zuluaga *et al.*, 1989; Avallone *et al.*, 2001). En la producción del grano de café se han establecido, a nivel mundial dos procesos importantes (seco y húmedo) donde en el proceso seco consiste en secar al sol las cerezas de café y en el húmedo se utiliza grandes cantidades de agua generando subproductos (mucilago 22% y pulpa 39% del peso del fruto fresco) que son comúnmente desechados al medio ambiente (Arunga, 1973; Zuluaga *et al.*, 1989; Roassos *et al.*, 1989; Avallone *et al.*, 2001). El mucílago es uno de los residuos que genera alta contaminación, dentro de su composición química, el 35,8% son sustancias pécticas totales, 17% celulosa y cenizas, 45,8% azúcares totales, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos y minerales, por lo que el mucílago puede ser es un excelente medio de cultivo para levaduras (Arunga, 1973; Cieves, 1995; Zuluaga *et al.*, 1989; Gómez, Morales, & Adalid, 2006). Las levaduras pectinolíticas tales como: *Saccharomyces marxianus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces* sp. son las predominantes en la fermentación natural de la cereza de café. Este tipo de levaduras fueron aisladas de la superficie de la cereza de café por Agate and Baht, (1966) donde observaron su participación en la degradación del mucílago después de ser eliminado del grano. El objetivo de este trabajo fue utilizar mucílago de café, melaza y mezcla de ambos (3:1) enriquecido con diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0%) como medio de cultivo para la producción de proteína unicelular usando dos levaduras aisladas de fuentes diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de mucilago de café fueron proporcionadas por productores de la Sierra Norte de Puebla de los municipios de Xilozochico y Cuetzalan, donde se encuentra el Beneficio Tosepan Titataniske. La toma de muestras se realizó el mismo día que se despulpó la cereza de café en recipientes de plástico lavados y desinfectados con cloro y enjuagadas con agua destilada los cuales fueron colocadas en una hielera y transportadas al laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Al mucílago fresco se le determino pH, °Bx y azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART) por el método 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1958) antes de ser congelado a -20°C . Se utilizó la levadura marcado



como LP12 aislada de mucilago de café ya que presento la mayor producción en ensayos previos y la levadura MMH4 aislada de agave tequilero. Los medios de cultivo fueron a base de mucilago de café y melaza en relación 3:1, se mezclaron y se le agregó 1% de HCl, se esterilizó a 121°C por 30 min posteriormente se dejó enfriar y se ajustó el pH entre 6.0 con CaCO₃ 2M. Se determinaron ART por la técnica de DNS y se ajustó a 13% w/w. Después fue centrifugado a 10,000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar residuos, se colocaron 200 mL en matraces Erlenmeyer con diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0, 2.0%), los cuales fueron inoculados con las levaduras por separado a una concentración de 10⁶ UFC/mL, posteriormente se colocaron en un agitador orbital a 200 r.p.m. a 30°C durante 6 días en los cuales se tomaron muestras cada 24 por horas para determinar pH y consumo de los azúcares. Al termino de los 6 días se centrifugo el medio de cultivo para obtener el paquete celular y lavarlo con H₂SO₄ al 0.5%, finalmente se determinó la producción de biomasa en peso seco. Este ensayo se realizó por triplicado. El diseño fue completamente al azar y la comparación de medias se hizo la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey (SAS, 1998).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

La muestra 1 reportó un pH de 4.5, 1.0°Bx, una concentración de 0.7% w/w de ARD y 0.8% w/w de ART teniendo un aumento de 0.1% w/w de azúcares reductores por hidrólisis ácida (Cuadro 1), para el caso de la muestra 2 reportó un pH de 4.7 con 3.5°Bx, una concentración de 3.5% w/w de ARD y 2.7 de ART teniendo un aumento de 0.3% w/w de azúcares reductores por hidrólisis ácida y la muestra 3 reportó un pH de 5.0 con 5.0°Bx una concentración de 3.2% w/w de ARD y 3.8% w/w de ART teniendo un aumento de 0.5% w/w de azúcares reductores por la hidrolisis ácida. También puede observarse que existe un incremento correlativo de los °Bx, con respecto a pH, ARD, ART y el % de liberación de azúcares reductores por una hidrolisis ácida. En el caso de los azúcares, la mayoría se encuentran presentes como reductores libres y un porcentaje muy bajo son azúcares no reductores, por lo que se tuvo que enriquecer con melaza para aumentar la concentración de azucars reductores. Gualtieri y Sánchez (2003) reportan que el efecto combinado de elevada temperatura (75 a 98°C) y elevada concentración de ácido (2 a 3%), transforma los azúcares en furfurales, los cuales inhiben la actividad microbiana, y no son detectados por el método utilizado por lo que sugieren que para obtener azúcares solubles a partir de desecho, se deben aplicar las siguientes condiciones de hidrólisis, empleando una temperatura media de 75°C; un tiempo de 20 minutos y una solución de ácido sulfúrico al 2%.



Cuadro 1. Determinación de pH, °Bx, ARD, ART y porcentaje de incremento de azúcares reductores por hidrólisis ácida en muestras de mucílago de café.

Número de muestras	pH	°Bx	ARD (% w/w)	ART (% w/w)	% de incremento de AR por hidrólisis ácida
1	4.5	1.0	0.7	0.8	0.1
2	4.7	3.5	2.4	2.7	0.3
3	5.0	5.0	3.2	3.8	0.6

En la figura 1 se muestra el cambio de pH en los medios de cultivo elaborados con mucílago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0%) durante la fermentación (6 días) con la levadura LP12. A las 0 h de incubación el pH de los medios de cultivo utilizados fue de 6.0. A las 24 horas el pH de todos los medios de cultivo disminuyó en un rango de 5.2 a 5.8 mientras que para las 48 h en medios de cultivo con 0 y 0.5% de urea permanecieron constantes mientras que en los medios de cultivo con 1.0 y 2.0% el pH aumentó 6.2 y 5.9 respectivamente después de las 48 h de fermentación el pH de todos los medios de cultivo aumentaron hasta los 6 días de fermentación para el caso del medio de cultivo sin urea el pH final fue de 6.5, para el medio de cultivo con 0.5% de urea el pH final fue de 6.6, mientras que para los medios de cultivo con 1.0 y 2.0% de urea el pH final fue de 7. Existen diferencias significativas por tratamiento (0, 0.5, 1.0 y 2.0% urea) reportando el mayor pH ($p \leq 0.05$) del promedio de los 6 días de fermentación fue el medio de cultivo con 1.0% de urea de 6.4, mientras que el medio de cultivo que registró el menor pH ($p \leq 0.05$) fue sin urea de 5.9. En la figura 2 se muestra el cambio de pH en los medios de cultivo elaborados con mucílago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0%) durante la fermentación (6 días) con la levadura MMH4. A las 0 h de incubación el pH de los medios de cultivo utilizados fue de 6.0. A las 24 h de fermentación el pH de los medios de cultivo sin urea y 0.5% disminuyó a 5.6 mientras que para el medio de cultivo 1.0% de urea se mantuvo constante y el medio de cultivo con 2.0% de urea aumentó a 6.3. A las 48 h de fermentación el pH de todos los medios de cultivo disminuyó en un rango de 5.2 a 6.0, después de las 24 h hasta las 96 h el pH aumentó en todos los medios de cultivo en un rango de 6.1 a 6.7, mientras que el pH de los medios de cultivo con 0 y 0.5% de urea disminuyó 5.9 y 6.2 respectivamente mientras que el pH del medio de cultivo con 2.0% de urea se mantuvo constante y el pH del medio de cultivo con 1.0% de urea aumentó a 6.9, finalmente a los 6 días de fermentación el pH en todos los medios de cultivo aumentaron en un rango de 6.2 a 6.9. En base al diseño estadístico existen diferencias significativas por tratamiento (0, 0.5, 1.0 y 2.0% urea) reportando el mayor pH



($p \leq 0.05$) del promedio de los 6 días de fermentación fue el medio de cultivo con 1.0% de urea de 6.3, mientras que el medio de cultivo que registro en menor pH ($p \leq 0.05$) fue sin urea de 5.8. En ambas levaduras el pH registrado más alto fue en medios de cultivo con 1.0% de urea mientras que el pH mas bajo fue en medios de cultivo sin urea.

El efecto de la concentración de azúcares reductores totales en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0%) durante la fermentación (6 días) con las levaduras LP12 y MMH4 se muestra en las figuras 3 y 4. Ambas levaduras se inocularon en medios de cultivos con una concentración inicial de 13% w/w de ART. A las 24 horas de fermentación ambas levaduras degradaron más del 90% de ART, las cuales no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Resultados similares reportaron Cori de Mendoza *et al.*, (2006) usando suero lácteo desproteinizado como medio de cultivo.

En la figura 5 se muestra la producción de biomasa en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0%) durante la fermentación (6 días) con las levaduras MMH4 y LP12. Para el caso de la levadura MMH4 la mayor producción se reportó en medios de cultivo sin urea de 5.8 g/L en base seca, mientras que la menor producción se obtuvo en el medio de cultivo con 2.0% de urea de 1.7 g/L en base seca, la producción de biomasa disminuye con forme aumenta la concentración de urea. Para la levadura LP12 se observa mayor producción de biomasa en el medio con 1.0% de urea de 8.5 g/L en base seca, mientras que la menor producción se registró en el medio de cultivo con 2.0% de urea de 6.6 g/L en base seca. Comparando las dos levaduras se observa que LP12 reporto la mayor producción de biomasa ($p \leq 0.05$) con un promedio de 7.5 g/L en base seca, mientras que la producción de biomasa por la levadura MMH4 ($p \leq 0.05$) fue de 4.1 g/L en base seca. Resultados superiores fueron reportados por Gualtieri y Sánchez (2003) ya que obtuvieron 9 g/L de biomasa en base seca de un consorcio de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schwannomyces castelli*) a los 32 h de fermentación usando desechos de harina de maíz precocida, enriquecida con urea, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de malta, aireación controlando temperatura (30°C) y pH (4.5), condiciones que no se tomaron en cuenta en este trabajo. Cori de Mendoza *et al.*, (2006) reportan una producción de biomasa de 4,6 g/L en base seca (*Kluyveromyces marxianus*) a las 10 h de fermentación usando suero lácteo desproteinizado como medio de cultivo suplementado con fuentes de nitrógeno y vitaminas a pH 4,5; 32 a 35°C con agitación y aireación. Gualtieri *et al.*, (2007) usaron un medio de cultivo a base de pulpa de café hidrolizada (tamaño de partícula ≤ 2 mm) con una solución de ácido sulfúrico al 2%, enriquecida con urea, fosfato ácido de potasio, extracto de malta, y melaza, obteniendo 10g/L de biomasa a las 8 h de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*.

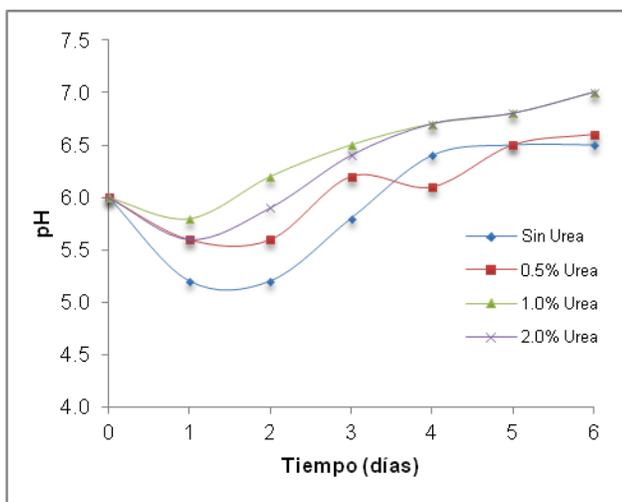


Figura 1. Efecto del pH en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0) durante la fermentación (6 días) con la levadura LP12

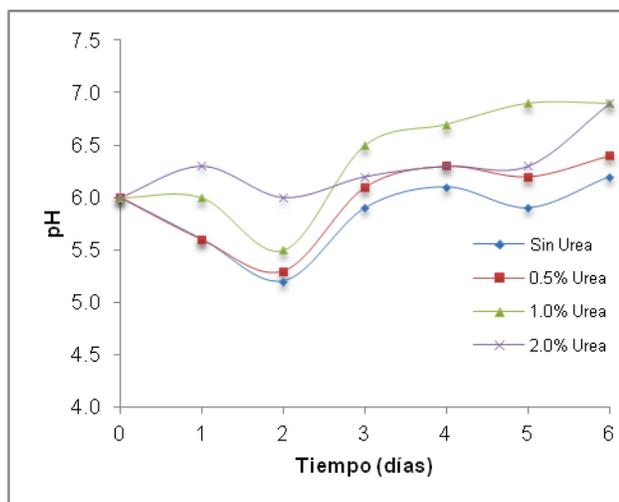


Figura 2. Efecto del pH en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0) durante la fermentación (6 días) con la levadura MMH4

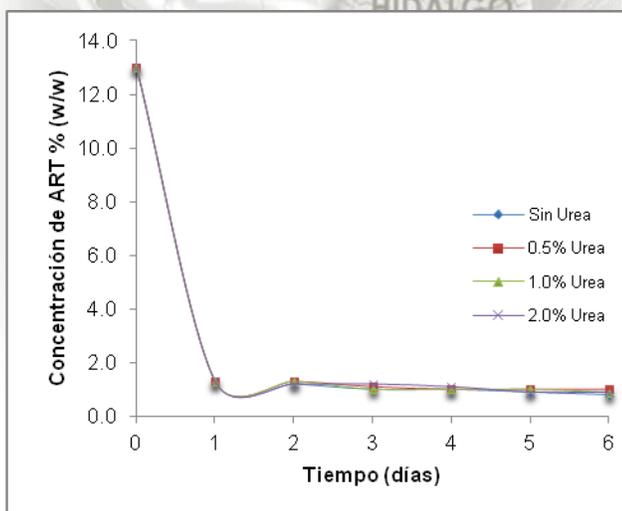


Figura 3. Efecto de la concentración de azúcares reductores totales en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0) durante la fermentación (6 días) con la levadura LP12

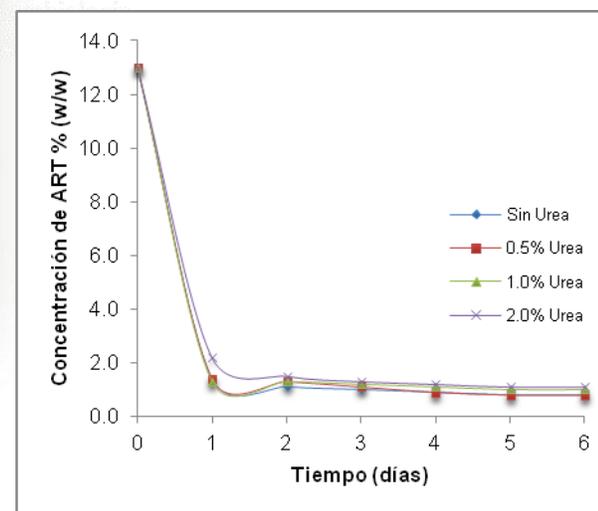


Figura 4. Efecto de la concentración de azúcares reductores totales en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0) durante la fermentación (6 días) con la levadura MMH4

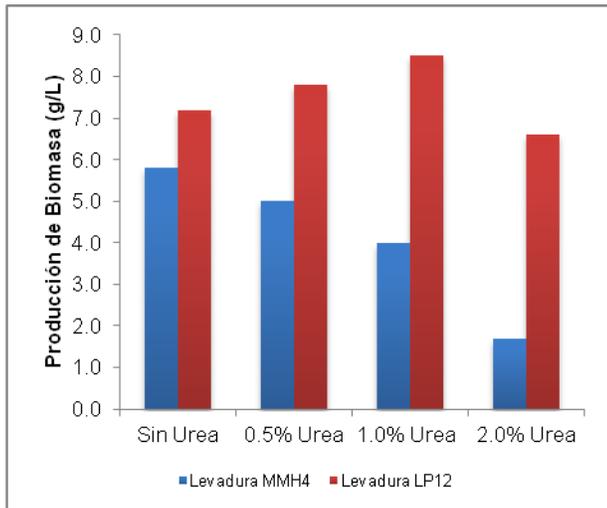


Figura 5. Producción de biomasa en medios de cultivo elaborados con mucilago de café y melaza a diferentes concentraciones de urea (0, 0.5, 1.0 y 2.0) durante la fermentación (6 días) con la levadura LP12 y MMH4

CONCLUSIONES

Los azúcares presentes en el mucilago de café son muy diversos por lo que se pueden aislar diferentes microorganismos como son bacterias, levaduras y hongos que tienen una función en la degradación natural del mucilago.

El mucilago de café constituye un medio de cultivo adecuado para obtener biomasa o proteína unicelular debido a su composición química (glucosa, fructosa, celulosa, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos y minerales) que podría usarse como suplemento en la alimentación animal.

La adición de urea no es necesaria para la producción de la biomasa usando la levadura MMH4, ya que al aumentar la concentración de esta disminuye la producción de biomasa, mientras que para la levadura LP12 los mejores resultados se obtuvieron en medios de cultivo con 1.0% de urea.

Recomendaciones

Comparando nuestros resultados de producción de biomasa con lo reportado por otros autores, es recomendable enriquecer el medio de cultivo de mucilago de café más melaza con vitaminas, extracto de malta, extracto de levadura y algunas sales así como mantener un pH, aireación, agitación y concentración de fuente de carbono y nitrógeno constante.



Literatura citada

- Adams M. R., Dougan J. 1981. Biological management of coffee processing waste. *Trop. Sci.* 23(3):177-196.
- Agate A D, Bhat J V. 1966. Role of Pectinolytic Yeasts in the Degradation of Mucilage Layer of *Coffea robusta* Cherries. *American Society for Microbiology.* 14(2):256-260.
- Arunga O R. 1973. Coffee, Kenya Industrial Research and Development Institute, Nairobi, Kenya, 259-273.
- Avallone S, Guyot B, Brillouet J, Olguin E, Guiraud J. 2001. Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. *Current Microbiology, An International Journal.* 42:252-256.
- Avallone S, Guyot B, Brillouet J, Olguin E, Guiraud J. 2001. Fate of Mucilage Cell Wall Polysaccharides during Coffee Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 49:5556-5559.
- Cievas R. 1995. Desmucilaginado mecánico vs Fermentación natural. CINECAFE, Colombia.
- Cori de Mendoza M E, Rivas N, Dorta B, Pacheco de Delahaye E, Bertsch A. 2006. Attainment and Characterization of Two Protein Concentrates from Biomass of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* Grown in Deproteinized Whey. *Revista Científica.* 16(3):315-324.
- De la Torre M, Flores-Cotera L B. 1992. Proteína unicelular, *Biotecnología Hoy*, Ed CIATEJ pp. 11-28.
- Gualtieri A M J, Villalta R C, Díaz T L E, Medina G, Lapenna E, Rondón M E. 2007. Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.* 38(2):1-12.
- Gualtieri M, Sánchez J. 2003. Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz precocida (*Zea mays*). *Revista de la facultad de farmacia.* 45:17-22.
- Medigan M, Martinko J M, Parker J. 1998. *Biología de los Microorganismos "Brock"*, 8ª ed., Prentice Hall, España. p 454-455.
- Miller G. L. 1959. *Analytical Chemistry.* 31: 426-429.
- Roussos S., Aquihuatl A., Cassaigne J., Favela E., Gutiérrez M., Hannibal L., Huerta S., Nava G., Raimbault M., Rodriguea W., J. Salas A., Sánchez R., Trejo M., Viniegra-González G. 1989. Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. *Ist. Inter. on Biotechnology in coffee Industry*, Xalapa, México.
- SAS System for Windows. 1998. *User's Guide Statistics*, SAS Inst. Inc. Cary North Carolina USA. 542 p.
- Zuluaga J. V. (1989). Aprovechamiento de los principales subproductos del café. *Primer Inter. Symp. on Biotechnology in coffee Industry*, pp: 63-75.



PRODUCCIÓN TOTAL DE GAS, METANO Y ACIDOS GRASOS VOLATILES *IN VITRO* EN PASTAS DE CANOLA PARA SU USO EN RUMIANTES

¹Ramírez-Briebesca J. E., ¹Lira-Casas R., ²Cruz-Monterrosa R. G., ³Del Razo-Rodríguez O. E.,
³Almaraz-Buendia I.

¹Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados. ²Dpto. de Ciencias de los Alimentos, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma. ³Area Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuaria Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

efrenrb@colpos.mx

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la producción de metano de tres tipos de pasta de canola (PCs) usada en la industria de alimentos. La pasta de canola napus (PCN), juncea (PCJ) y prensada en frío (PCPF), fueron usadas en este estudio. El gas producido por PCJ fue superior ($P < 0.05$) que la de PCPF y PCN a las 24 y 48 h de incubación. El contenido de metano en la producción total de gas fue diferente entre PCs. La PCPF produjo menos metano que PCJ ($p < 0.05$) y hubo una tendencia a disminuir el metano contenido en PCPF que el de PCN ($P = 0.08$). Las concentraciones de los AGV fueron más altas para PCJ que para PCPF y PCN ($P < 0.05$). La PCPF tiene mayor producción molar de propionato ($P < 0.05$) a las 12, 24, y 48 h de incubación. Como conclusión, la PCPF disminuye la producción de metano y mejora la producción de ácido propiónico.

Palabras clave: Pasta de canola, metano, ácidos grasos volátiles *in vitro*.

Introducción

La canola es la variedad de colza desarrollada en Canadá, en 1979. Estas variedades de Brassica son fuentes de colza obtenidas por modificación genética tal como *B. carinata*, *B. juncea* y *B. napus*, estas semillas son consideradas el mayor cultivo de oleaginosas, contiene aproximadamente 42 – 43 % de aceite que es extraído para usarse como aceite vegetal comestible (Uppstrom 1995). La pasta de canola residual es un subproducto de la extracción de aceite es ampliamente utilizada como fuente de proteína para el ganado e industrias de alimento (Bonnardeaux, 2007). El prensado en frío es otro tipo de canola que se está comenzando a obtener en la industria de la manufacturación. Esta es obtenida



de una combinación de diferentes variedades de canola y el proceso involucra la baja producción de calor. La introducción de calor en el proceso involucrado en la producción de aceites por prensado frío puede reducir el daño a la esencia del aceite, color así como su importancia en la dieta. Esta es la razón principal porque el aceite prensado en frío es generalmente superior comparando aceites producidos a través de otros procesos, tal como aplicación de calor. Por lo tanto, el prensado frío de la pasta de la canola debe mejorar el valor nutritivo y posiblemente generar menos producción de metano en los rumiantes. El objetivo del presente estudio fue la evaluación de los tres tipos de pasta de canola, estudiando su composición química en la producción de gas y ácidos grasos volátiles.

Materiales y métodos

Determinación de la fermentación ruminal de la canola por incubación de lote de cultivo

Para la incubación *in vitro*, fueron pesados 0.5 g MS en una bolsa con PCs sellada ANKOM® (modelo F57). Cada bolsa fue colocada en una botella equipada con 60 mL de suero ámbar con tapón de goma. Cuatro corridas de incubación fueron completadas en diferentes días, de manera que cada tipo de canola se llevó a cabo con cinco repeticiones en cada hora de muestreo (0, 4, 12, 24, 48 h). En cada corrida de incubación, fueron incubados blancos para cada tratamiento para corregir los valores de producción de gas por gas liberado. El inóculo para la incubación *in vitro* fue obtenida de dos vacas canuladas ruminalmente con una alimentación a una dieta en una relación de 65:35 (forraje:concentrado), colado por 4 capas de gasa y centrifugada a 1000 x g por 10 minutos para remover partículas de alimento. Los inóculos fueron preparados por mezcla de líquido ruminal y de un amortiguador mineral con una solución con 0.05 % de sulfato de cisteína en una proporción de 1:3. El inóculo fue transferido a viales de (25 mL) precargados, precalentados a (39 °C) y con una corriente de O₂ libre de gas N. los viales fueron sellados y colocados en una orbital cremallera de agitación a 90 oscilaciones por minuto en un incubadora de 39°C.

La producción neta de gas de cada frasco se midió a las 4, 12, 24 y 48 h de incubación con un aparato de desplazamiento de agua (Fedorak y Hrudey, 1983). Se toman muestras de gas del espacio superior de cada vial previo a la medición con una jeringa de 20 mL e inmediatamente transferido a 5.9 mL evacuado a un Exteiner (Lab co Ltd, High Wycombe, Buckinghamshire, Reino Unido), la cual fue analizada la concentración de metano por cromatografía de gases (Holtshausen *et al.*, 2009). El metano (CH₄) fue expresado como mg de CH₄/g de MS incubada que desapareció, y el gas neto total producido como mL/g de MS incubada después de diferentes tiempos (4, 12, 24, y 48 h) de incubación de gas fue muestreado para CH₄ y el total de gas producido fue medido, los viales de fermentación se



abrieron. Submuestras de (1.5 mL) de cada vial fue colectado, acidificado con 300 μ L de ácido metafosfórico (0.25; w/v) y se centrifugó como se describe para el análisis de N amoniacal. El sobrenadante fue congelado a -20 °C para medir la concentración de AGV. A las 0 horas las muestras también fueron analizadas para N amoniacal y producción de AGV.

El gas total y contenido de metano fueron calculados por el método no lineal, de acuerdo al Sigma Plot (Ver. 10.0.1, 2007). El desarrollo del modelo fue el procedimiento de Ørskov y McDonald (1979) de la siguiente forma:

$$P = a + b(1 - e^{-ct})$$

Donde P es el volumen de la producción de gas después del tiempo t; 'a' es la intercepción de la curva de producción de gas al tiempo cero; 'b' el potencial de la producción de gas sobre el tiempo, 'c' el la constante proporción de gas producida 'b' a 't' horas; y 't' tiempo de incubación.

Análisis estadísticos

La caracterización física y química de canola fue analizada por análisis de una vía y los datos *in vitro* se analizaron utilizando los valores medios de cuatro corridas *in vitro* se ejecuta para cada réplica y se analizó como un diseño de bloques completos al azar utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS Inc. (2007). Con tratamientos como efectos fijos. Las diferencias entre las medias se compararon en cada punto de tiempo de incubación. Las diferencias entre tratamientos se diferenciaron usando LSMEANS con la opción PDIFF. Las relaciones entre las variables se obtuvieron mediante la realización de análisis de regresión.

Resultados y discusión

La producción de gas y metano obtenido de las PCs incubadas en lotes de cultivo son presentados en la Tabla 1. La producción de gas de PCJ fue superior ($P < 0.05$) que la de PCPF y PCN a las 24 y 48 h de incubación. El contenido de metano en la producción total de gas fue diferente entre PCs. PCPF produjo menos metano que PCJ ($P < 0.05$) y hubo una tendencia a disminuir ($P = 0.08$) el metano contenido en PCPF vs PCJ y PCN, particularmente en el último momento de la incubación. Significativamente, estos resultados exploran la posibilidad que PCPF puede ser usado como un ideal ingrediente en dieta para rumiantes para reducir la emisión de metano. Aunque la alta producción de metano está asociada con la fermentación de fibra y la grasa cruda de la mezcla total de la ración tiende a disminuir la producción total de metano (Getachew *et al.*, 2005); tal vez esta es la razón



porque PCPF tiende a producir menos metano en la fermentación *in vitro*. Estimaciones de MSD, PG y los parámetros de la cinética de metano fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) en PCJ vs. PCPF y PCN.

Tabla 1. Producción de gas y metano *in vitro* en tres tipos de pasta de canola incubados en líquido ruminal amortiguado

	Tipos de PCs			
	Presión Fría	Juncea	Nupus	EEM
Producción de gas (mL/g MS)				
4 h	25.78 h	28.89	22.49 h	4.10
12 h	56.11 f	50.37 f	37.39 g	3.94
24 h	82.59 e	120.37 c	96.27 d	3.94
48 h	132.62 b	163.41 a	125.24 bc	3.75
Parámetros cinéticos				
a + b	102.63 b	102.39 a	75.25 b	2.45
C	0.98	0.97	0-96	
Metano (mL/g MS)				
4 h	13.00 f	15.18 e	12.37 f	0.74
12 h	13.00 f	15.18 e	12.37 f	0.74
24 h	23.40 d	25.99 c	23.2 d	0.74
48 h	27.17 bc	32,96 a	28.99 b	0.70
Parámetros cinéticos				
a + b	29.17 b	36.86 a	32.61 b	0.55
C	0.93	0.95	0.95	

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

EEM: Error estándar de la media.

Los ácidos grasos volátiles *in vitro* son enlistados en la Tabla 2. La concentración AGV totales fueron mayores ($P < 0.05$) para PCJ que para PCPF y PCN. Estos valores se esperaban porque PCJ contiene más carbohidratos (24.7 vs 12.9 y 15.6 %) que las otras dos pastas. PCPF produjo AGV con menor proporción molar de acetato ($P < 0.05$), pero una mayor proporción molar de propionato a las 12, 24 y 48 h de incubación. PCJ tiene una proporción molar similar de acetato y propionato a las 24 y 48 h ($P < 0.05$). Por otra parte, la proporción de acetato:propionato fue mejor para PCPF que la de PCJ y PCN a las 12, 24 y 48 h ($P \leq .05$) de incubación.



Tabla 2. AGV de muestras de tipos de pasta de canola incubadas en líquido ruminal

	Tipos PCs			
	Presión Fría	Juncea	Napus	EEM
Acetato (mol/100mol)				
4 h	61.83 ab	61.27 b	62.47 a	0.30
12 h	57.65 d	58.99 c	59.61 c	0.30
24 h	55.58 fg	57.4 d	57.61 d	0.30
48 h	54.83 g	56.46 e	55.93	0.30
Propionato (mol/100mol)				
4 h	20.49 fc	20.92 f	20.20 g	0.16
12 h	24.59 c	22.83 d	22.28 e	0.14
24 h	26.68 a	24.23 c	24.26 c	0.15
48 h	26.05 b	24.27 c	24.15 c	0.14
Butirato (mol/100mol)				
4 h	11.55 bc	11.98 a	11.50 bc	0.14
12 h	10.71 ef	11,78 ab	10.93 de	0.12
24 h	9.88 i	11.17 cd	10.28 gh	0.13
48 h	9.67 i	10.52 fg	9.98 hi	0.12
Total VFA (mM)				
4 h	40.81 g	40.48 g	41.96 g	1.66
12 h	68.83 e	64.82 e	61.05 f	1.54
24 h	94.22 c	92.74 c	85.45 d	1.58
48 h	110.54 b	116.84 a	109 b	1.54
Acetato:Propionato				
4 h	2.99 b	2.93 b	3.09 a	0.02
12 h	2.34 e	2.58 d	2.67 c	0.02
24 h	2.10 f	2.37 e	2.37 e	0.02
48 h	2.12 f	2.33 e	2.31 e	0.02

Tipos de interacción de PCs y horas: Acetato, $P < 0.005$; Propionato, $P < 0.0001$.

E total de AGV, $P < 0.001$, Acetato:Propionato, $P < 0.0001$

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). EEM: Error estándar de la media.



Conclusiones

Este estudio confirma que PCPF disminuye la producción de metano.

Literatura citada

- Bonnardeaux, J. 2007. Uses for canola meal. A report of the Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia.
- Fedorak, P. M. and Hrudey S. E. (1983) A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Envir. Technol. Lett.* 4, 425--432.
- Getachew, G., DePeters E.J., Robinson, P.H., Fadel, J.G. 2005. Use of an in-vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feed and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 547-559.
- Holtshausen, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R., Benchaar, C., 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 2809–2821.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Res. (Cambridge)* 92, 499–503.
- SAS, User's Guide: Statistics, Version 9.6th Edition. 2007. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II Carbohydrate and protein availability. *J Anim. Sci.* 70:3562-3577.
- SigmaPlot, 10.0.1 Systat Software, Inc. 1735 Technology Drive Ste 430A San Jose, CA 95110, USA.
- Upstrom, B. (1995). Seed chemistry. In D. Kimber, & D. I. McGregor (Eds.), *Brassica oilseeds: Production and utilization*. UK: CAB International.



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* EN PASTAS DE CANOLA PARA SU USO EN RUMIANTES

¹Ramírez-Briebesca J.E., ¹Lira-Casas R., ²Cruz-Monterrosa R.G., ³DelRazo-Rodríguez O.E.,
⁴Hernández-Díaz R., ⁵Jimenez-Badillo R.

efrenrb@colpos.mx

¹Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados. ²Dpto. de Ciencias de los Alimentos, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma. ³Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuaria Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. ⁴Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. ⁵Centro Universitario UAEM Amecameca

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar el valor nutritivo de tres tipos de pasta de canola (PCs) usadas en la alimentación de rumiantes. La pasta de canola napus (PCN), juncea (PCJ) y prensada en frío (PCPF), fueron usadas en este estudio. El contenido de proteína de las PCs varió de 36.1 a 41.0%. PCJ tuvo alto contenido de proteína y bajo contenido de FDN. El contenido de NIDA y NIDN varió de 1.03 a 2.27 % y 4.4 a 4.6 %, respectivamente. El contenido de lípidos de las muestras de pasta de canola varió de 2.5 (PCN, PCJ) a 14 % (PCPF). PCJ y PCN tuvo más de 60% de partículas menores a 1.0 mm. La PCJ fue menor en PC de intermedia degradación (PB2: 21.4 %) y ligeramente con mayor en PC de rápida degradación (PB1: 22.23 % y 21.9 %, $P < 0.05$). La PCPF también tuvo la proporción más baja de la fracción A (14.01 %). La desaparición *in vitro* de MS de PCJ fue más alta ($P < 0.05$) que la de otros tipos de canola a las 4, 24 y 48 h. La PCPF tuvo el nivel más bajo ($P < 0.05$) de la desaparición después de las 48 h de incubación. Como conclusión, la PCPF tiene una buena fuente de proteína de sobrepaso para la alimentación de rumiantes.

Palabras clave: Pasta de canola, fracciones proteínicas, degradabilidad *in vitro*.

Introducción

La canola es una variedad de la colza que fue desarrollada en Canadá en 1979 (Bell, 1884). Estas variedades de Brassica son fuentes de colza obtenidas por modificación genética tal como *B. carinata*, *B. juncea* y *B. napus*, estas semillas son las oleaginosas más cultivadas y contienen aproximadamente el 43 % de aceite que es extraído para usarse como aceite vegetal comestible (Uppstrom 1995). La



pasta de canola residual es un subproducto de la extracción de aceite es ampliamente utilizada como fuente de proteína para el ganado e industrias de alimentos (Bonnardeaux, 2007). Específicamente, el valor biológico de la proteína es esencial para la alimentación de rumiantes y la proteína degradable en rumen (PDR) proporciona nitrógeno a los microorganismos por medio de la síntesis de proteína microbiana, mientras la proteína no degradable en rumen (PND) y las secreciones endógenas proporcionan componentes de nitrógeno y aminoácidos del animal. La dinámica de la degradación de las fracción proteínica C es no disponible. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de tres tipos de pasta de canola en la composición química y digestibilidad *in vitro*.

Materiales y métodos

Características físicas y químicas de la canola: La pasta de canola *napus* (PCN), *juncea* (PCJ) y presionada en frío (PCPF) fue obtenida de la industria de manufacturera. El tamaño de partícula se determinó en 50 g de muestra duplicada (como base fresca). Se usaron tamices de 2,36 mm, 2,0 mm, 1,7 mm, 1,18 mm y 1,0 mm. La fibra detergente ácido (FDA) y la fibra neutro detergente (FND) fueron determinadas por el método de Van Soest *et al.* (1991). El nitrógeno total (N) fue medido por análisis de combustión (Na 1500, Carlo Erba Instruments) El N insoluble ácido detergente (NIAD) y N insoluble detergente neutro (NIDN) fueron determinados de acuerdo a los procedimientos de Licitra *et al.* (1996).

Fermentación ruminal de la canola por incubación: La incubación *in vitro* se realizó pesando 0.5 g MS en una bolsa con PCs sellada ANKOM[®] (modelo F57). Cada bolsa fue colocada en un frasco de 60 mL ámbar con tapón de goma y se incubaron a 39 °C. Cuatro corridas de incubación se realizaron en diferentes días, de manera que cada tipo de canola se llevó a cabo con cinco repeticiones en cada hora de muestreo (0, 4, 12, 24, 48 h). El inoculo para la incubación *in vitro* fue obtenida de dos vacas canuladas ruminalmente con una alimentación a una dieta en una relación de 65:35 (forraje:concentrado), el fluido se filtró con 4 capas de gasa y se centrifugó a 1000 x g por 10 min para remover las partículas de alimento. Las bolsas ANKOM[®] con los residuos fueron removidos los viales de las botellas, se enjuagaron con agua destilada, secados a 65 °C por 24 h a peso constante y pesado para estimar la desaparición de materia seca *in vitro* (DMSIV).



Cálculos: Las fracciones proteínicas fueron calculadas usando las siguientes ecuaciones:

$$PA (\%MS) = NNP * 0.0001 SOL P * PC \quad PB1 (\% MS) = SOL P * PC * 0.01 - PA$$

$$PC (\% MS) = NIAD * PC * 0.01 \quad PB3 (\% MS) = (NIND - NIAD) * PC * 0.01$$

$$PB2 (\% MS) = PC - PA - PB1 - PB3 - PC$$

La desaparición de materia seca *in vitro* (DMSIV) a partir de la incubación *in vitro* fue calculado con las siguientes ecuaciones: $DMSIV = 1 - [(R - B)/S]$ Donde R son gramos de residuo del sustrato, B son gramos de residuo del blanco y S es el peso seco del sustrato inicial.

Análisis estadístico: La caracterización física y química de canola fue analizada por análisis de varianza, los datos *in vitro* se analizaron utilizando los valores promedio de las cuatro corridas *in vitro*, analizado como un diseño de bloques al azar, utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS Inc. (2007). Las diferencias entre las medias se compararon en cada punto de tiempo de incubación, usando LSMEANS con la opción PDIFF.

Resultados y discusión

Caracterización física y química de la canola: El contenido de proteína de PCs (Tabla 1) varió de 36.1 a 41.0 %. Esta diferencia pudo haber sido por la propia variación del contenido de proteína en la semilla de canola al obtener la pasta. PCPF tuvo el contenido más bajo de proteína ($P < 0.05$) que otro tipo de canola, pero esta tiene el más alto contenido de aceite con la simultánea dilución de otros componentes. Similarmente, PCJ tuvo el más alto contenido de proteína y el menor contenido de FDN ($P < 0.05$). El contenido de FDN y FDA de PCJ fue menor que para PCPF y PCN. Bell (1993) reportó valores de FDN y FDA en un rango de 17.5 y 21.5 % para pasta de canola. El contenido NIAD y NIND varió de 1.03 a 2.27% y 4.4 a 4.6%, respectivamente. Esos valores fueron similares a NIAD y considerable bajo el contenido de NDIN que la reportada en NRC (2001), quien encontró que el contenido de NIAD y NIND fue 1.008 y 2.6% respectivamente. La cantidad de aceite residual en CMs normalmente depende de la condición o técnica empleada durante la extracción del aceite.



Tabla 1. Composición física y química de tres tipos de pasta de canola

	Tipos de canola				P – valor
	Presión-frío	Juncea	Napus	EEM	
Humedad,	2.91 ^a	7.84b	4.72b	0.03	0.0001
Proteína (Nx 6.25)	36.1 ^a	40.97b	37.58c	0.31	0.0037
Lípidos	13.99 ^a	2.49b	3.66c	0.98	0.0001
Ceniza	8.04 ^a	8.46b	9.65c	0.05	0.0043
Carbohidratos	12.92 ^a	24.74b	15.63 ^a	0.83	0.0043
FDN	26.04 ^a	18.5b	28.76c	0.53	0.0018
FDA	20.01 ^a	10.24b	22.59 ^a	0.58	0.0013
NIAD	1.03 ^a	1.73b	2.27c	0.04	0.0002
NIND	4.55 ^a	4.62b	4.39c	0.01	0.0034

*Calculado por diferencia: 100- (humedad + proteína + lípidos + cenizas+ FDN). a-c Medias en la misma columna con diferente letra difieren (P < 0.05). EEM: Error estándar de la media.

La proporción de partículas de <2.36 mm osciló de 6.4 en PCJ a 9.3 para PCPF. Igualmente, PCPF tuvo la más alta proporción de partículas entre 1.0 a 1.7 mm. En contraste, PCJ y PCN tuvo más del 60 % de partículas más pequeñas de 1.0 mm. Los datos demuestran que el proceso técnico y el proceso de extracción pueden estar asociados con la proporción de partículas finas. Las sufracciones de proteína (PA, PB2, PB3, PC) fueron diferentes entre los tipos de pasta de canola (Tabla 2). PCJ fue bajo en PC (21.4 %) y ligeramente superior en PC rápidamente degradable (PB1: 22.35 % vs. 21.9%, P<0.05), asumiendo que la proteína es inmediatamente degradada en el rumen (Sniffen et al., 1992), PCPF también tuvo la proporción más baja de la fracción A (14.01 %) y PCN tuvo el mayor contenido de NIAD (2.27 %) que los otros tipos de pasta de canola, estos datos son asociados a la fracción de proteína PC alta (5.5 %) (Kelzer et al., 2010).



Tabla 2. Fracciones proteínicas de tipos de extracción de pasta de canola

	Tipos de canola				P-valor
	Presión Fría	Juncea	Napus	EEM	
<i>Fracciones proteínicas (CNCPS)</i>					
PA (% PC)	14.07 c	27.75 a	18.18 b	0.68	0.0017
PB (% PC)	79.85 a	61.76 c	68.12 b	0.65	0.0015
PB1 (% PC)	21.75 a	21.84 ^a	20.88 ^a	0.68	0.6051
PB2 (% PC)	37.22 a	22.47 b	34.38 a	0.90	0.0028
PB3 (% PC)	20.88 a	47.45 b	12,86 c	0.25	0.0005
PC (% PC)	6.07 c	10.48 b	13.69 a	0.18	0.0002
<i>Proteína verdadera PV (Porcentaje PC)</i>					
PA (% MS)	5.08 c	11.36 a	6.83 b	0.26	0.0010
PB1 (% MS)	7.85 b	8.93 a	7.84 b	0.20	0.0515
PB2 (% MS)	13.43 a	9.21 b	12.92 a	0.40	0.0096
PB3 (% MS)	7.53 a	7.14 a	4.83 a	0.14	0.0016
PC (% DM)	2.19 c	4.29 b	5.14 a	0.06	0.0002
Proteína	36.10 c	40.96 a	37.58 b	0.31	0.0037

EEM: Error estándar de la media. Medias en la misma columna con letra diferentes, difieren ($P < 0.05$).

Tabla 3. La DMS *in vitro*, Producción de gas y metano en tres tipos de pasta de canola incubados en liquido ruminal amortiguado

	Tipos de canola			
	Presión-Frío	Juncea	Napus	EEM
DMS				
4 h	20.58 h	23,44 g	21.73 gh	0.90
12 h	32.79 f	32.88 f	31.36 f	0.85
24 h	43.66 e	48.26 d	43.86 e	0.85
48 h	50.93 c	62.16 a	55.06 b	0.81

Medias en la misma columna con letra diferentes, difieren ($P < 0.05$).



Conclusión

La PCPF tiene una degradabilidad relativamente baja *in vitro* y por lo tanto es una buena fuente de proteína de sobrepeso. Efectivamente la degradabilidad de MS de PCPF usada en el presente estudio fue menor que las otras PCs.

Referencias

- Bell, J. M. 1984. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: Review. *J. Anim. Sci.* 58, 996-1010.
- Bell, J. M. 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 73, 679-697.
- Bonnardeaux, J. 2007. Uses for canola meal. A report of the Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia.
- Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 347-358.
- NRC 2001. National Research Council. Nutrient requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- SAS, User's Guide: Statistics, Version 9.6th Edition. 2007. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II Carbohydrate and protein availability. *J Anim. Sci.* 70:3562-3577.
- Upstrom, B. (1995). Seed chemistry. In D. Kimber, & D. I. McGregor (Eds.), *Brassica oilseeds: Production and utilization*. UK: CAB International.
- Van Soest, P. J. Robertson J. B., Lewis B.A. 1991. Methods of dietary fiber, NDF and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74, 3585-3597.



CRECIMIENTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS RUMINALES *in vitro* EN MEDIOS CON *Brachiaria brizantha*, *Panicum máximum*, *Guazuma ulmifolia* Y *Cratilia argentea*

Anaya-Carrillo R. A^{1*}, L. A. Miranda-Romero², F.A. Castrejón-Pineda¹, M. González-Ronquillo³, L. Corona-Gochi¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México, ²Universidad Autónoma de Chapingo, ³Universidad Autónoma del Estado de México

ractif2007@yahoo.com.mx

Resumen

Se determinó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y la cinética de crecimiento de consorcios microbianos ruminales de ovinos, indirectamente, por la técnica de producción de gas *in vitro*, de *Brachiaria brizantha* (Bb), *Panicum máximum* (Pm) a 28 días de rebrote y, *Guazuma ulmifolia* (Gu) y *Cratilia argentea* (Ca) a 60 días de rebrote, en un diseño de bloques completamente al azar con seis repeticiones. A los sustratos se les realizó el análisis químico proximal. Las variables de análisis fueron; (DIVMS), producción de gas (mL g⁻¹ MS) a los períodos de 0 a 6 (V0-6), 8 a 24 (V8-24 y 32 a 52 h (V32-52) de incubación y el volumen máximo (Vm; mL g⁻¹), tasa (S; h⁻¹) y fase de retardo (L; h) de producción de gas, correspondiente a la cinética de crecimiento del consorcio ruminal total. Ca tuvo los mayores (P<0.05) V0-6 y V8-24 y el contenido mayor de proteína (PC), hemicelulosa (HEM), El V32-52 mayor (P<0.05) lo presentó Bb, forraje que tiene el contenido menor de PC y LIG. Es factible que la combinación de Ca y Bb mejore el balance fermentativo y consecuentemente los consorcios microbianos ruminales en sistemas silvopastoriles de producción animal.

Introducción

Un consorcio microbiano es un grupo de diferentes especies de microorganismos que actúan conjuntamente como un sistema complejo donde todos se benefician de las actividades de los demás de la comunidad. Los consorcios microbianos predominantes son sacarolíticos (capaces de degradar diversos tipos de azúcares), amilolíticos (capaces de degradar almidón), y fibrolíticos (capaces de degradar diversos tipos de fibra). Dentro de los sacarolíticos están: *Treponema bryantii* y *Lactobacillus vitulinus* (Forsberg *et al*, 1994). Orskov *et al.*, (1995) indicó que una dieta baja en N y alta en compuestos lignocelulósicos, limita severamente el crecimiento microbiano y la biomasa microbiana.



La eficiencia en la síntesis de proteína microbiana es mayor en forrajes conteniendo saponinas y taninos, que reducen la degradabilidad del N ruminal (Makkar *et al.* 1993). Por otro lado, la producción y contenido nutrimental de forrajes y, particularmente, de gramíneas en el trópico, está fuertemente afectada por la estacionalidad, lo que hace necesario desarrollar sistemas de manejo para aprovechar otras alternativas forrajeras además de leguminosas arbóreas y arbustivas, que pueden tener un gran potencial tales como *Cratilia argentea* (Ca) y el *Guazima ulmifolia* (Gu) cuya amplia distribución en Sudamérica y México hacen necesario generar información sobre su valor nutricional y características de fermentación ruminal combinadas con gramíneas de uso frecuente como *Brahiaria brizantha* (Bb) y *Panicum máximum* (Pm).

Material y Métodos

Material vegetal: *Brachiaria brizantha* (Bb) y *Panicum máximum* (Pm) a 28 días de rebrote, con *Cratilia argentea* (Ca) y el *Guazima ulmifolia* (Gu) a 60 días de rebrote. Bb y Pm provenientes de Cocula, Gro; el Ca de Hueytamalco, Pue y el Gu de Xochitepec, Morelos. Las muestras se deshidrataron por liofilización y se molieron (1 mm). A las muestras de forrajes se les realizó el Análisis Químico Proximal (AOAC, 1990) y se les midió la concentración de FDN y FDA (Van Soest, 1991).

Tratamientos: consistieron en las siguientes combinaciones de los forrajes o sustratos (Bb, Pm, Ca, y Gu) Bb-Ca, Bb-Gu, Pm-Ca y Pm-Gu a proporciones de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0 respectivamente (4+12=16 tx)

Fuente de consorcios microbianos. Los donadores de líquido ruminal (LR) fueron 2 ovinos machos, raza Rambouillet, de dos años de edad, con cánula ruminal y con 14 h de ayuno y alimentados con una dieta de 80% forraje ensilado con paja. El LR de cada animal se manejó por separado (criterio de bloque), se filtró en 8 capas de gasa y se diluyó 1:9 con solución mineral reducida (Menke y Steingass, 1988).

Determinación del crecimiento microbiano: se usó la técnica de producción de gas de Menke y Steingass, (1988) como un método indirecto de crecimiento, cuantificando el gas como un producto de su actividad metabólica. Se usaron frascos color ámbar de 125 mL a los que se les adicionó 0.5 g de sustrato y 90 mL inóculo ruminal, y se cerraron herméticamente con tapones plásticos y aro de aluminio (Theodorou *et al.*, 1994). Los frascos se incubaron en baño maría a 39°C y se midió la producción de gas a 0, 1, 2, 3, 6, 8, 12, 18, 24, 32, 40, 52 y 72 h de incubación. Con el programa NLIN SAS y el modelo logístico de (Pell y Schofield, 1995) $V_t = V_{max} / (1 + e^{(2-4k)(t-L)})$ se obtuvieron los parámetros de la cinética de crecimiento: volumen máximo (V_m , mL g⁻¹), tasa (S , h⁻¹) y fase de retardo

(L, h), de la producción de gas: También se obtuvieron los volúmenes de gas fraccionales acumulados de 0 a 6 h (Va), 8 a 24 h (Vb) y de 32 a 52 h (Vc).

Análisis: Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con seis repeticiones (frascos), con el modelo GLM del SAS y la comparación de medias con prueba de Tukey ($P < 0.05$).

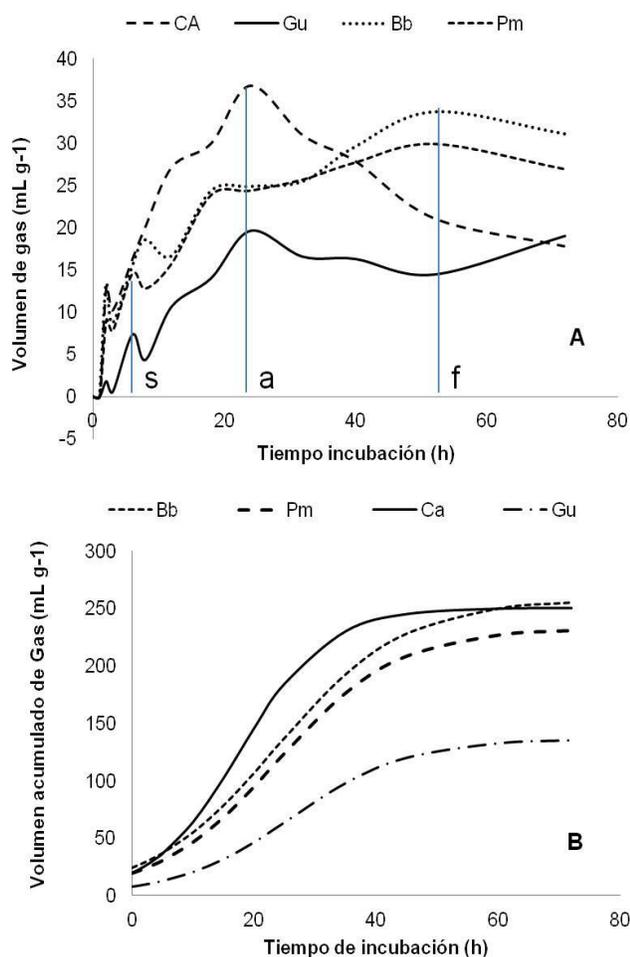


Figura 1. Producción fraccional (A) y acumulada (B) de gas de fermentación de *Brachiaria brizantha* (Bb) o *Panicum maximum* (Pm), *Cratylia argentea* (Ca) y *Guazuma ulmifolia* (Gu), por consorcios de bacterias ruminales de ovinos. Las letras minúsculas indican los tiempos de mayor crecimiento o fermentación sacarolítica (s), amilolítica (a) y fibrolítica (f)

En contraste Bb promueve más ($P < 0.05$) a los consorcios fibrolíticos (V32-52) con respecto a Gu y Ca (Figura 1A, línea f).

Resultados

El análisis proximal mostró que la PC varío de 8.8 a 26%, las cenizas de 9.5 a 11.8%, la FDN de 39.3 a 68.56%, la FDA de 24.61 a 37.56% y la lignina de 5.8 a 13.7% (Cuadro 1B). Aunque el Vm tuvo una alta correlación con la DIVMS ($R^2 = 0.7462$), es notorio que siendo la DIVMS de Ca mayor ($P < 0.05$) que la de Bb y Pm, produce un Vm igual ($P > 0.05$) al de éstos últimos forrajes, lo cual puede ser explicado por su mayor contenido de Lignina (Cuadro 1).

El crecimiento de consorcios específicos (sacarolítico, amilolítico-pectinolítico y fibrolítico) pueden estar representados por el volumen fraccional de gas producción de 0 a 6 h (V0-6), de 8 a 24 h (V8-24) y el de 32 a 52 h (V32-52) de incubación (Figura 1A). En este sentido se observó que el consorcio sacarolítico (V0-6) desarrolla más ($P < 0.05$) en Ca y Bb, y menos en Pm y Gu (Cuadro 1, línea S en la Figura). En todos los forrajes el consorcio amilolítico (V8-24; Figura 1A, línea a) es mayor al sacarolítico e igualmente es favorecido por Ca más que Bb, Pm y Gu. En



Discusión

A pesar de que Gu tiene buena cantidad de PC, su MO es superior a Bb, Pm y Ca, y su contenido de cenizas y FDN son los menores, mostró el menor Vm, la menor DMSIV, la mayor L y el menor desarrollo de los consorcios sacarolítico y amilolítico, lo cual parece confirmar la afirmación de Van Söest (1994) en el sentido de que el principal factor limitante de la digestibilidad es LIG y que otros componentes también pueden limitar su valor nutritivo clasificados por Aregheore (1999) en cuatro grupos principales; en el primero se encuentran los taninos y saponinas, en el segundo los quelantes, tercero antivitaminas y cuarto ocupado por otros tóxicos como la mimosina y nitratos. Sin embargo sería adecuado ahondar en el análisis bromatológico para determinar que otros componentes antinutricionales contiene y además el efecto que tiene la dieta *in situ* ya que existe la posibilidad de que este valor de lignina incremente la cantidad de proteína de sobrepaso.

Cratilia argétea fue el forraje que promovió el crecimiento mayor ($P < 0.05$) de los consorcios sacarolítico (V0-6) y amilolítico (V8-24), lo cual se atribuyó a que éste forraje ofrece un alto contenido de los dos principales nutrimentos para el crecimiento microbiano; proteína y hemicelulosa; no obstante tener la mayor proporción de FDN ($P < 0.05$) y, por consiguiente el menor contenido celular. Además *Brachiaria brizantha* favoreció el crecimiento mayor del consorcio fibrolítico (V32-52), posiblemente debido a que el contenido de LIG en este forraje fue el más bajo ($P < 0.05$) lo que permite una mayor disponibilidad de celulosa y hemicelulosa para las bacterias fibrolíticas. Por consiguiente la combinación de estos dos forrajes puede mejorar el balance de nutrimentos digestibles para los tres grupos de microorganismos (sacarolíticos, amilolíticos y fibrolíticos) y favorecer la producción animal.

Cuadro 1. Parámetros de producción de gas (Vm, S, L), digestibilidad in vitro materia seca (DIVMS), volúmenes fraccionales de gas (0 a 6, 8 a 24 y 32 a 52 h) y contenido de nutrientes de *Brachiaria Brizantha* (Bb), *Panicum maximum* (Pm), *Cratylia argentea* (Ca) y *Guazima ulmifolia* (Gu)

Sustrato	Parámetros			DMSIV %	Volumen de gas para			Contenido de nutrientes							
	Vm mL g ⁻¹	S h ⁻¹	L h		0 a 6 h mL g ⁻¹	8 a 24 h mL g ⁻¹	32 a 52 h mL g ⁻¹	PC	CEN	MO	FDN	FDA	LIG	CEL	HCEL
Bb	257.8 ^{bac}	0.0239 ^e	2.6 ^{dc}	62.8 ^{ed}	56.0 ^{bdac}	74.8 ^{edc}	64.9 ^a	8.8	10.2	89.8	47.5	35.3	5.8	25.0	11.7
Pm	232.1 ^{bdc}	0.0254 ^{fe}	4.0 ^{bcd}	62.9 ^d	44.2 ^{bdec}	74.0 ^{edf}	56.8 ^{ba}	10.3	11.8	88.2	41.4	37.6	6.1	28.1	3.1
Ca	250.4 ^{bac}	0.0350 ^a	3.4 ^{cd}	74.8 ^a	59.7 ^{ba}	97.8 ^{ba}	39.0 ^{ed}	26.0	11.0	89.0	68.6	24.6	8.5	14.3	43.9
Gu	136.5 ^g	0.0266 ^{fed}	7.3 ^a	48.1 ^h	14.2 ^g	50.3 ^h	33.5 ^a	15.1	9.5	90.5	39.3	34.6	13.7	17.3	4.7

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Medias con literales distintas en la misma columna son diferentes ($p < 0.05$)
Vm, Volumen máximo; S, tasa y; L, Fase de retardo de la producción de gas de fermentación
DMSIV- Digestibilidad de materia seca in vitro.
PC, proteína cruda; CEN, cenizas; MO, materia orgánica; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido; LIG, lignina; CEL, celulosa; HCEL, hemicelulosa. Estas variables fueron determinadas en los forrajes puros, en las combinaciones se estimaron de acuerdo a la proporción de cada forraje.



Conclusión

El estudio de los perfiles de producción de gas por la fermentación de forrajes permite determinar cómo afectan el crecimiento de los consorcios microbianos sacarolíticos, amilolíticos y fibrolíticos, y manipularlos a fin de favorecer un crecimiento y fermentación más balanceada en beneficio de la producción animal, en este caso se sugiere la combinación de *Cratilia argétea* y *Brachiaria brizantha*. No obstante es necesario estimar la mejor proporción entre ellos.

Literatura citada

- A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Method 930.04, 955.04, 930.05. USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Aregheore, E.M. Nutritive and antinutritive value of some tree legumes used in ruminal livestock nutrition in Pacific island countries: Journal of South Pacific Agriculture. Vol 6, No. 2 (1999); p. 50-61.
- Forsberg, C.W., L.K.A. Lovelock, L. Krumholz and J.G Buchanan-Smith. 1984 Appl. Environ. Microbiol. 47:101
- Makkar H.P.S., 1993. Antinutritional factors in food for livestock. In: Animal Production in Developing Countries, No. 16 Occasional Publications, Brit Soci Animal Prod. pp. 69-85
- Menke K. H, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 1988; 28:7-55
- Orskov, E.R. 1995. Optimizing Rumen Environment for Cellulose Digestion. In: Rumen Ecology Research Planning (Eds. R:J: Wallace and A. Lahlou-Kassi) Proceedings of a Workshop held at ILRI, Addis Ababa, Ethiopia, pp: 177-182.
- Thodorou, B.A. Dhanoa M.S. McCallan, A.B. and France, J. A simple gas production method using pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197
- Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. 2 ed. S.I: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- Van Soest PJ, ROBERTSON, LEWIS BA. (1991). Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dary Sci; 74: 3583-3597.
- Yokoyama MT, Johnson KA. Microbiology of the rumen and Intestine. In: Church DC editors. The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; p. 125-144



PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS EN CULTIVO SUPERFICIAL DE *Fomes* sp. EUM1

Hernández-Ramírez P.¹, Ayala-Martínez M.¹, Peláez-Acero A.¹,
Saucedo-García M.², Arce-Cervantes O.^{2*}.

¹Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales, Instituto de Ciencias Agropecuarias.
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
arcecerro@hotmail.com

Resumen

En este estudio se evaluó la capacidad del hongo termotolerante *Fomes* sp. EUM1 para crecer en cultivo superficial utilizando diferentes residuos lignocelulósicos. Se encontró que es capaz de crecer y producir enzimas lignocelulolíticas en un intervalo de pH de 5.4 a 7.4. Se determinó la producción enzimática a los 7 días de cultivo en cajas Petri. De los subproductos evaluados, el rastrojo de maíz promovió la mayor producción de celulasas y lacasas siendo de 18.3 y 0.9 UI mL⁻¹, respectivamente. La mayor producción de xilanasas fue en la paja de cebada (26 UI mL⁻¹), sin embargo, la producción de lacasas fue la más baja (0.4 UI mL⁻¹), además presentó el menor diámetro de crecimiento ($P < 0.05$). Con los resultados anteriores se muestra que los extractos enzimáticos obtenidos de *Fomes* sp. EUM1 son una alternativa para su uso sobre residuos lignocelulósicos, enfocándose al tratamiento previo de los forrajes para su inclusión a la dieta. El aporte de enzimas fibrolíticas representa una alternativa para su uso en la alimentación animal, debido a que posiblemente aumente los sitios de unión a las fibras por parte de las bacterias ruminales.

Palabras clave: *Fomes* sp. EUM1, residuo lignocelulósico, enzimas lignocelulolíticas.

Introducción

En México, los sistemas de alimentación para rumiantes están basados en forrajes como las gramíneas, leguminosas y los esquilmos agrícolas. Estos materiales presentan más del 30% de fibra, una proteína menor al 7% y su digestibilidad menor al 55%, pero tiene un potencial energético para la alimentación de rumiantes. Generalmente, son abundantes los materiales de desecho con potencial de bioconversión que contienen una alta proporción de lignocelulosa. Esta fuente renovable de materia orgánica puede ser transformada en productos de interés industrial como biocombustibles, enzimas, azúcares simples, metabolitos secundarios y proteína celular (Howard *et al.*, 2003). A través de la



biotecnología, se han desarrollado aditivos que aumentan la digestibilidad de los alimentos lignocelulósicos, como enzimas exógenas fibrolíticas, las cuales al agregarse pueden mejorar la utilización de los polisacáridos de los forrajes (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002; Beauchemin *et al.*, 2003; Colombatto *et al.*, 2003).

Las enzimas lignocelulolíticas exógenas comerciales son comúnmente producidas por cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido, utilizando hongos como *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Trichoderma reesei* y *T. viride* (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006). Dentro de los microorganismos que producen enzimas lignocelulolíticas están los hongos de podredumbre blanca. Estos hongos crecen sobre sustratos lignocelulósicos debido a su capacidad de producir enzimas hidrolíticas y oxidativas (Da Silva *et al.*, 2005), las cuales alteran los componentes de la pared celular, aumentando la calidad de los sustratos lignocelulósicos en la alimentación de los rumiantes (Peláez-Acero *et al.*, 2008).

Por lo tanto, en este trabajo se determinó el crecimiento y la producción de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) por el Basidiomiceto *Fomes* sp. EUM1 en cultivo superficial utilizando diferentes subproductos agrícolas.

Material y métodos

Se utilizó la cepa termotolerante *Fomes* sp. EUM1 que es capaz de crecer a temperaturas de hasta 40 °C en sustratos como el rastrojo de maíz y producir enzimas como xilanasas, celulasas y lacasas en fermentación en estado sólido (Ordaz, 2008; Ordaz *et al.*, 2012).

Cultivo superficial de *Fomes* sp EUM1. Se evaluó en cultivo superficial en 5 residuos agrícolas para el crecimiento de *Fomes* sp. EUM1. Se utilizaron: rastrojo de maíz (RM); paja de trigo (PT); paja de cebada (PC); tallo de alfalfa (TA); y rastrojo de leguminosa (RL). Los subproductos se secaron (60 °C por 24 h), se tamizaron y molieron a tamaño de partícula de 1 mm. Se pesaron 200 g L⁻¹ de cada subproducto agrícola, se agregó agua destilada y se mantuvo en agitación a 70 °C durante 1 hora. Los sustratos se combinaron con agar bacteriológico (15 g L⁻¹), se esterilizaron a 121 °C por 25 min y se vertieron en cajas Petri para ser inoculadas con un disco de agar (0.6 cm) de un cultivo de 7 días.

Longitud de crecimiento y obtención del extracto crudo enzimático. Se midió la longitud promedio de crecimiento micelar de la colonia (Vernier Caliper) después de 7 días de cultivo (35 °C), usando cinco repeticiones. El extracto crudo enzimático (ECE) de cada caja Petri se obtuvo haciendo cortes longitudinales al agar invadido con micelio, se colocó en un vaso de precipitado, agregando 100 mL de agua destilada. Esta preparación se mantuvo en baño de hielo con agitación magnética (1 h). Posteriormente, el contenido de cada matraz se filtró y se centrifugó a 9,605 x g (10 min). El sobrenadante recuperado se consideró como ECE y se utilizó para medir las actividades enzimáticas.



Celulasas y Xilanasas. Se midió a los 7 días de cultivo y se utilizó el método descrito por Miller *et al.* (1960). Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich) al 1%, disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.0). Se realizó una curva estándar con una solución de glucosa 10 mM. Para las xilanasas se utilizó como sustrato una solución de xilano de abedul (Sigma-Aldrich) al 0.5 %, el cual fue disuelto en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.3). Se realizó una curva estándar con solución de xilosa (10 mM). Una unidad internacional (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de azúcar reductor (D-xilosa) por minuto a 50 °C.

Lacasas. Se evaluó midiendo la oxidación del ácido 2,2-azinobis-3-etilbentiazolinasulfónico (ABTS) a una concentración de 0.1 M disuelto en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5.0). Una unidad internacional (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de sustrato oxidado por minuto bajo las condiciones de reacción (Bourbonnais *et al.*, 1997).

Resultados y discusión

En diferentes procesos industriales se utiliza el cultivo superficial debido a que tiene la ventaja de ser simple en su operación, económico y menos sensible a las variaciones ambientales; además, que puede usarse como criterio de selección. Se observó que *Fomes* sp. EUM1 fue capaz de crecer y producir enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) en un rango amplio de pH (5.4 a 7.4), además de ser un microorganismo termotolerante (Ordaz *et al.*, 2012) con características deseables para diferentes procesos biotecnológicos.

En el Cuadro 1 se muestra que el crecimiento del hongo en rastrojo de maíz, la paja de trigo, la paja de cebada y el tallo de alfalfa fue similar ($P > 0.05$), sólo el rastrojo de leguminosa presentó el menor valor de longitud de crecimiento (4.74 cm), mostrando diferencia entre los sustratos evaluados ($P < 0.05$). Esto pudo estar originado por el pH inicial en el cual se desarrolló el cultivo (Cuadro 1) o bien por la composición química del rastrojo. A pesar de que no hubo diferencias significativas en la longitud final del diámetro de crecimiento, es posible que el uso de diferentes sustratos modifique la velocidad de crecimiento. Por ejemplo, Ordaz (2008) reporta que la velocidad de crecimiento de *Fomes* sp. EUM1 fue 67% superior sobre rastrojo de maíz que sobre mezclas con paja de avena. Después de siete días de crecimiento se midió la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas. Los resultados obtenidos muestran que la mayor producción de enzimas celulolíticas fue encontrada sobre rastrojo de maíz (18.2 UI mL^{-1}). La paja de cebada presentó la menor actividad celulolítica ($P < 0.05$), pero la longitud de crecimiento miceliar entre ambos sustratos no cambió. Contrariamente a la actividad de celulasas, la máxima actividad xilanolítica de *Fomes* sp. EUM1 (Cuadro 1) mostró que la paja de cebada alcanzó



26.58 UI mL⁻¹, presentando diferencias significativas con los demás sustratos. Se observó que la producción de xilanasas en rastrojo de maíz fue 2 veces superior al rastrojo de leguminosa.

Cuadro 1. Actividad enzimática de *Fomes* sp. EUM1 a los 7 días de crecimiento cultivado en caja Petri sobre diferentes pajas y rastrojos.

Subproducto	pH	Diámetro de la colonia (cm)	Actividad enzimática UI mL ⁻¹		
			Celulasas	Xilanasas	Lacasas
RM	7.2	6.2 ± 0.96 ^a	18.25 ± 1.81 ^a	17.5 ± 1.60 ^b	0.9 ± 0.1 ^a
PT	5.4	7.4 ± 0.18 ^a	9.65 ± 2.38 ^b	12.5 ± 2.00 ^c	1.1 ± 0.2 ^a
PC	6.3	5.5 ± 2.9 ^{ab}	3.3 ± 0.37 ^c	26.6 ± 3.32 ^a	0.4 ± 0.06 ^b
TA	5.9	7.3 ± 0.37 ^a	9.2 ± 1.72 ^b	10.1 ± 0.92 ^{c,d}	0.4 ± 0.08 ^b
RL	7.4	4.7 ± 0.77 ^b	11.6 ± 0.75 ^b	7.9 ± 1.60 ^d	0.5 ± 0.1 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes en el superíndice de la mismas columnas indican diferencias estadísticas (P < 0.05). RM: rastrojo de maíz; PT: paja de trigo; PC: paja de cebada; TA: tallo de alfalfa; RL: rastrojo de leguminosa.

La mayor producción de lacasas de *Fomes* sp. EUM1 se obtuvo con paja de trigo y el rastrojo de maíz, con una nivel de actividad de 1.05 y 0.9 UI mL⁻¹, respectivamente, mostrando diferencias con respecto al resto de los sustratos evaluados. Por lo que, el uso de *Fomes* sp. EUM1 muestra versatilidad sobre diferentes sustratos.

Conclusión

Estos resultados muestran que no hay una relación entre la producción de enzimas lignocelulolíticas respecto al uso de algún sustrato y que también depende de la presencia de algún compuesto inductor para lo cual se sugiere realizar el trabajo con sustratos que sean previamente ensilados.

Literatura citada

- Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., Yang, W. Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*. 81 (E.Suppl. 2), E37-E47.



- Bourbonnais R., Pice M. G., Freiermuth B., Bodie E. and Borneman S., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4627-4632.
- Colombatto, D., Fergus, L. M., Mahalingeshwara, K. B., Owen, E. 2003. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminants diets a biochemical and in vitro rumen degradation assessment. *Animal. Feed Science and Technology*. 107: 201-209.
- Da Silva, R., Lago, E. S., Merheb, C. W., Macchione, M. M., Kun, P. Y., Gomes, E. 2005. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36, 235-241.
- Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., and Howard S., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal Biotechnology* 2(12):602-619.
- Loera, O., Villaseñor, F. 2006. Xylanases. In advances in agricultural and food biotechnology. In: Guevara, R.G., Torres, I. (Eds.). Research Signpost Editorial, Kerala, India. Chapter 14. pp. 305–322.
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*. 2, 127-132.
- Ordaz A., Favela E., Meneses M., Mendoza G., Loera O. 2012. Hyphal morphology modification in the thermal adaptation by the white rot fungus *Fomes* sp. EUM1. *Journal of Basic Microbiology*.52: 167-174. DOI: 10.1002/jobm.201000528
- Ordaz, H.A. 2008. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Fomes* sp. Eum1 en cultivo sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México, D.F.
- Peláez, A., Meneses, M.M., Miranda, L.A., Megías, M.D., Barcena, G.R., Loera, O., 2008. Advantages of solid fermentation state with *Pleurotus sapidus* in sugar cane silage. *Archivos de Zootecnia* 57: 25-33.
- Pinos-Rodríguez, J. M., González, S. S., Mendoza, G. D., Bárcena, R., Cobos, M. A., Hernández, A., Ortega, M. E. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science*. 80: 3016-3020.



EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA DE LOS CUERPOS ESFÉRICOS 4 (SBP-4) DE *Babesia bigemina*

Cruz-Reséndiz A.*, Aguilar-Tipacamú G., Cantó-Alarcón G. J., Mosqueda-Gualito J. J.

C. A. Salud Animal y Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales. UAQ.

Av. de las Ciencias s/n, Juriquilla.

acruz21@alumnos.uaq.mx

Resumen

El objetivo del trabajo fue clonar y expresar de forma recombinante a SBP4 de *Babesia bigemina*. Se realizó el diseño de los oligonucleótidos que amplifican el gen *sbp4* en marco de lectura abierto (ORF) con un total de 774pb, a partir de sangre infectada con *B. bigemina* cepa Chiapas. Posteriormente, se purificó el DNA de *Babesia bigemina* de la cepa Chiapas. Se realizó la amplificación por PCR del gen. Una vez obtenido el fragmento, se procedió a la clonación del amplicón en el vector de clonación pENTR™/D-TOPO®, el cual se usó para transformar células competentes *Escherichia coli* cepa *One Shot® TOP10*. Posteriormente se purificó el DNA bacteriano de clonas seleccionadas usando un kit de purificación comercial y se incubó con las enzimas de restricción *Not I* y *Asc I* para verificar la presencia del inserto, el cual se visualizó mediante electroforesis. De estas clonas se seleccionaron 2 positivas y se secuenciaron para corroborar el marco de lectura. Posteriormente se procedió a realizar la subclonación del gen en un sistema pDEST™ 17 Vector, se transformó en bacterias *E. coli* cepa *BL21-AI™ One Shot®* y se indujo la expresión de la proteína. La identificación de la proteína se realizó por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-tag de histidinas en lisados de bacterias transformadas. Se observó la presencia de una banda de aproximadamente 30 KDa confirmando la expresión de la proteína. Con esta metodología es posible obtener proteínas recombinantes que pueden ser evaluadas como vacunas o métodos de diagnóstico contra la babesiosis bovina.

Palabras clave: gen, vector, anticuerpo.

Introducción

La babesiosis es una enfermedad causada por protozoarios intraeritrocíticos y presenta una amplia gama de signos clínicos que son causantes de pérdidas económicas y de inversiones millonarias que se emplean para el control de la enfermedad, dicha inversión se acerca a los 3 billones de dólares



(Bock *et al.*, 2004; USAHA, 2008; Schnittger *et al.*, 2012). En México, la babesiosis bovina es causada por *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, y es transmitida por garrapatas del género *Rhipicephalusmicroplus* principalmente. Por todo esto, se han buscado métodos de control y en la actualidad se trabaja con herramientas moleculares, uno de estos métodos es la generación de proteínas recombinantes para su posterior evaluación como candidatos vacunales. Es por eso que en este trabajo se generó de manera recombinante la proteína SBP-4, ésta proteína se le atribuye una función durante el desarrollo del protozoario en la fase intraeritrocítica (Alaa *et al.*, 2011a, Alaa *et al.*, 2011b).

Material y métodos

A partir de sangre de bovino infectada con *Babesia bigemina* de la cepa Cintalapa, Chiapas, se realizó un PCR utilizando oligonucleótidos previamente diseñados, para la amplificación del gen que codifica para la proteína SBP-4 (774pb). Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar la amplificación de la secuencia deseada. Posteriormente, se procedió a la clonación, para lo cual, se realizó la ligación entre el vector pENTR/D-TOPO® y el producto de PCR. Con la reacción de ligación realizada, se transformaron células competentes *E. coli* TOP10 agregándoles aproximadamente 10ng del producto de la ligación. Las células competentes se plaquearon en cajas Petri, mismas que contenían agar LB con Kanamicina [50 µg/ml] y se dejaron en incubación toda la noche a 37°C. Para el análisis de transformantes, se seleccionaron 5 colonias y se cultivaron toda la noche en 5 ml de medio LB conteniendo 50 µg/ml de kanamicina. Después de obtener el crecimiento en el medio LB, se purificó el DNA plasmídico con el kit Wizard® plus sv minipreps DNA purification system. Con el DNA purificado, de las 5 colonias se realizó la digestión enzimática, utilizando las enzimas *NOT I* y *ASC I* e incubando 1 hora a 37°C. Las colonias positivas a la restricción enzimática se secuenciaron y se realizó el análisis informático, para comprobar la conservación de la secuencia y el marco de lectura. Después de evaluar las secuencias, se realizó la subclonación de una de ellas en el vector pDEST™ 17 y realizando la transformación de las bacterias *E. coli* BL21-AI™. De igual forma se cultivaron las bacterias en agar LB pero con ampicilina [100 µg/ml] y de las colonias obtenidas, se tomaron 2. Estas colonias se indujeron para la expresión de la proteína SBP-4; la inducción se logró con la adición de l-arabinosa en el medio LB con ampicilina [100 µg/ml]. Se realizó la electroforesis para proteínas en gel de bis-acrilamida 12% y posteriormente, se empleó el western blot para identificar la proteína por medio de un anticuerpo primario anti-his tag de conejo [1:500] y un anticuerpo secundario anti-anticuerpo de conejo [1:1000] conjugado con fosfatasa alcalina.

Resultados y discusión

La colonia de las células BL21-AI™ la cual se seleccionó para la expresión de la proteína; se indujo adicionando l-arabinosa (Lee, 1980; Lee *et al.*, 1987) y se mantuvo a una temperatura de 37 °C durante 3 horas. Con estos resultados se logró expresar satisfactoriamente la proteína, esto se demostró corriendo una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (Figura 1), en la que se incluyeron dos controles, uno de ellos fue de bacterias con plásmido vacío, inducido y no inducido.

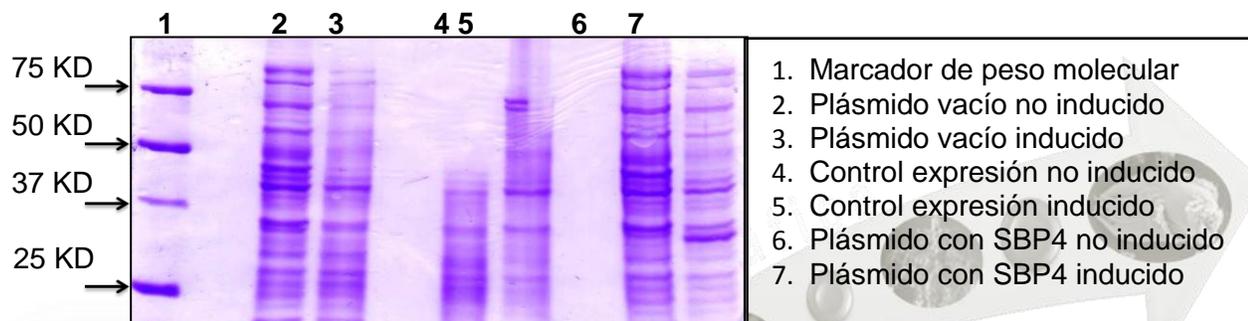


Figura 1. Electroforesis de proteínas de expresión en bacterias inducidas y no inducidas (tercer hora de inducción).

En este control se apreciaron las proteínas propias de la bacteria y se demostró la ausencia de la proteína de interés (SBP-4, 31KDa.). Por otro lado, se añadió el control de expresión, éste es un control que se incluye en el Kit comercial, que es un plásmido que incluye la proteína GUS (β-glucuronidasa) de un peso de 68.4KDa (Kertbunditet *al.*, 1991), y que al ser inducida de igual forma con l-arabinosa, se puede producir la expresión de esta proteína, y con este control se demostró que la inducción de la expresión de las proteínas se realizó de manera correcta, al observar la banda del tamaño esperado de la proteína del control. Finalmente, se observó en los carriles de la muestra de interés (bacterias recombinantes con plásmido que incluyen SBP-4), que la colonia no inducida no genera la proteína deseada, en tanto que la colonia inducida, expresa en mayor proporción a SBP-4.

Una vez que en la electroforesis se mostraba de manera evidente la presencia de las proteínas deseadas, es decir, la proteína control y la proteína de interés, se realizó la prueba inmunológica "Western blot" (Figura 2) con el objeto de identificar por medio de anticuerpos que realmente las proteínas expresadas eran las deseadas. Para este fin se utilizó un anticuerpo primario anti-his tag de conejo. Posteriormente, al incubarlo con un segundo anticuerpo anti-anticuerpo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, y haciendo el revelado con la solución BCIP®/NBT, se demostró la presencia de una banda de aproximadamente 30 kDa. Misma que coincide con el tamaño de SBP-4 y otra banda de aproximadamente 68KDa. Que se relaciona al tamaño esperado del control GUS.

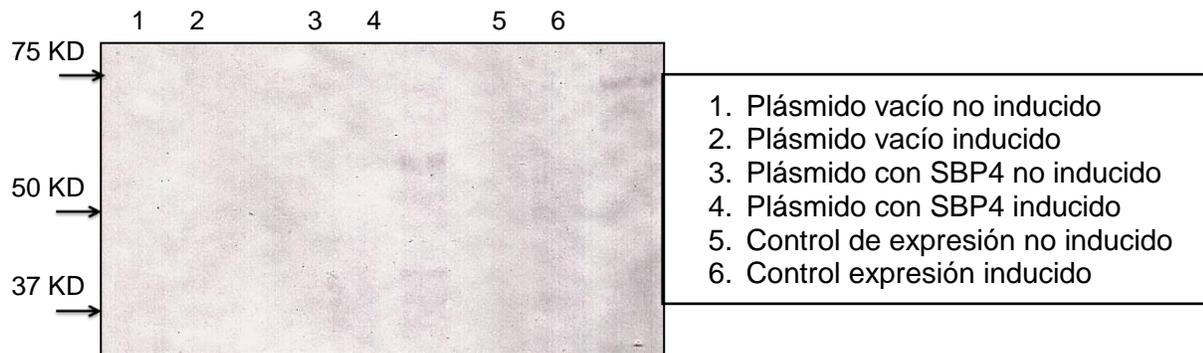


Figura 2. Western blot. Anticuerpo primario anti his-tag de conejo, anticuerpo secundario anti-anticuerpo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.

Sin embargo, en la columna de la proteína SBP-4 inducida, aparecieron bandas inespecíficas, cuya razón puede tener diversas causas, por ejemplo, bloqueo insuficiente, lavado inapropiado de la membrana, contaminación de reactivos (Advansta, 2011) entre otros. Por esta razón se realizó nuevamente la prueba de western blot (Figura 3), pero únicamente con las colonias que contenían el plásmido con el inserto de SBP-4, tanto no inducido como inducido. Esto con la finalidad de evitar contaminaciones, e hibridaciones de los anticuerpos inespecíficas. Y se demostró de manera clara la expresión de la proteína SBP-4 sin la existencia de reacciones inespecíficas, ni la presencia de artefactos en la membrana.

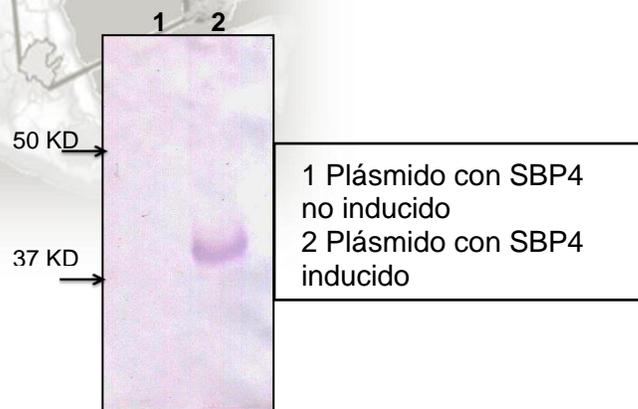


Figura 3. Western blot. Anticuerpo primario anti his-tag de conejo, anticuerpo secundario anti-anticuerpo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.



Conclusión

La proteína de los cuerpos esféricos 4 se puede expresar de manera recombinante en un sistema bacteriano, sin sufrir mutaciones en la secuencia de nucleótidos. La expresión de la proteína se lleva a cabo correctamente a las 3 horas después de iniciar la inducción, esto quiere decir, que una inducción de más tiempo podría reducir la expresión por falta de sustrato.

Financiado por FOPER 2013 y PROMEP-REDES 2013.

Literatura citada

- Advansta. Análisis de proteínas: electroforesis, transferencia e inmunoprecipitación. Disponible: <http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf>. Consultado 20 Ago, 2013.
- Alaa T. M., Junior S. F., Eko W. P., Xuan H. N., Minoda Y., AbouLaila M., Kawai S., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011a. Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. J. Elsevier Molecular and Biochemical Parasitology. 178: 40-45.
- Alaa T. M., Xuan H. N., Eko W. P., Junior S. F., Aboulaila M., Ueno A., Kyoung G. Y., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011b. Spherical body protein 4 is a new serological antigen for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. J. Clinical and Vaccinal Immunology. 18 (2): 337-347.
- Bock R., Jackson L., De Vos A., Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. J. Cambridge Parasitology. 129:247-269.
- Kertbundit, S., Greve, H. d., Deboeck, F., Montagu, M. V., and Hernalsteens, J. P. 1991. In vivo Random β -glucuronidase Gene Fusions in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5212-5216.
- Lee, N. 1980. Molecular Aspects of ara Regulation. In The Operon, J. H. Miller and W. S. Reznikoff, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 389-410.
- Lee, N., Francklyn, C., and Hamilton, E. P. 1987. Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to *araI*₂ Activates the *araBAD* Operon Promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8814-8818.
- Schnittger, L., Rodriguez A. E., Florin C. M., Morrison D. A. 2012. Babesia: A world emerging. J. Elsevier. 12:1788-1809.
- USAHA. 2008. Foreign animal diseases. 7th. Ed. United State Animal Health Association. 147 p.



**DOCUMENTOS EN EXTENSO DE LOS
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN
PRESENTADOS EN LA MODALIDAD
CARTEL**



DETERMINACION DEL NIVEL Y TIPO DE ACEITE PROTEGIDO CON $\text{Ca}(\text{OH})_2$ EN LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE MICROORGANISMOS RUMINALES

Enríquez L. R.¹, Juárez J. G.¹, Lorenzo T. A.¹, Razo-Herrera G.², Miranda-Romero L. A.².

¹Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN

La actividad microbiana y digestibilidad ruminal de la fibra dietaria es inhibida por niveles mayores de 6% grasa en la dieta. Se determinó el efecto de 0, 3, 6 y 9% de aceite de atún (AT) o linaza (AL) protegidos con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, en los parámetros de producción de gas: volumen máximo (V_m ; mL g^{-1}), tasa (S ; h^{-1}) y tiempo de retardo (L ; h), y la digestibilidad de la materia seca *in vitro* de *Leucaena leucocephala*. Los tratamientos fueron: 0% (AT0 y AL0), 3% (AT3 y AL3), 6% (AT6 y AL6) y, 9% (AT9 y AL9). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y las medias de los tratamientos se compararon usando la prueba de Tukey. En general los tratamientos que incluyeron aceite de atún presentaron menor producción de gas comparados con aceite de linaza ($P > 0.05$), para las variables S , L y DIVMS no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) lo que indica que el uso de aceites protegidos no alteran la actividad microbiana.

Palabras clave: grasa, fibra, grasa protegida, actividad microbiana.

INTRODUCCIÓN

Los cereales son el concentrado energético por excelencia para la producción animal (Casals I Costa, 1992), sin embargo, la inclusión de grasa o aceite en la dieta de los rumiantes es apremiante en ciertos periodos productivos tales como final de gestación e inicio de lactancia. El uso de los aceites trae consigo múltiples beneficios, dentro de los cuales se encuentran la mejora en las características físicas del alimento como reducir la polvosidad y separación de las partículas en la dieta e incrementar su palatabilidad y su aporte de ácidos grasos esenciales, vitaminas liposolubles (Bauman *et al.*, 2003), y el constituir una fuente concentrada de energía.

La grasa o aceites tienen el inconveniente que a niveles de inclusión alto en la dieta de los rumiantes tienen efectos negativos sobre la digestión de la fibra en el rumen, los cuales están asociados con la



inhibición de la actividad fermentativa microbiana, (Jhonson y McClure, 1973; Devendra y Lewis, 1974), algunos investigadores como Brandt et al., (1992) y Zinn (1992), han observado un nivel óptimo que va de 2% a 6%, por su parte Nigidi et al., (1990) sugiere utilizar 5%, motivo por el cual exceder los niveles óptimos recomendados de aceite, trae como consecuencia un bajo aprovechamiento de los nutrientes y depresión en consumo de alimento afectando así la producción animal, por tal motivo, el objetivo del estudio fue evaluar el comportamiento de la fermentación microbiana al adicionar aceite de atún y linaza protegidos a la acción microbiana ruminal en cuatro niveles (0, 3, 6 y 9%).

MATERIAL Y MÉTODOS

En frascos de vidrio color ámbar de 120 ml de capacidad se colocaron con flujo continuo de CO², 0.5 g de muestra de *leucaena leucocephala* de 40 días de rebrote, los 0.5 gramos de muestra y 90 mL de inóculo ruminal. Los frascos se cerraron herméticamente y colocaron en baño maría a 39 °C (Menke y Steingas, 1988). Se determinó la presión de gas en los frascos a 0, 2, 4, 6, 8, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 horas de incubación con un manómetro (0-1 kg cm⁻²). Los valores de presión de gas (kg cm⁻²) fueron transformados a volumen de gas (ml g⁻¹ MS) usando un modelo de regresión lineal. Con los datos de volumen se obtuvieron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas (Vm; mL g⁻¹) tasa de producción de gas (S; h⁻¹) y tiempo lag (L; h), del modelo logístico $V_a = V_m / (1 + \exp(2 - 4 * S * (T - L)))$, descrito por Schofield y Pell (1995), usando el paquete estadístico SAS (2004).

El inóculo ruminal usado en esta prueba se obtuvo de la siguiente manera: se extrajo líquido ruminal de tres borrego fistulado alimentados con una dieta alta en forraje, el líquido ruminal fue filtrado a través de ocho capas de gasa y una parte de este fue diluido en nueve partes de una solución mineral reducida, conteniendo cada litro: K₂HPO₄ (0.45 g), KH₂PO₄ (0.45 g), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g), NaCl (0.90 g), MgSO₄ (0.18 g) y CaCl₂ · H₂O (0.12 g). Al término del período de incubación (72 h) se filtró el residuo de cada frasco en papel filtro Watman y se secó a 60 °C durante 48 h para calcular la digestibilidad de la MS. Los tratamientos fueron 0% de aceite de atún (AT) (T1), 3% AT (T2), 6% AT (T3), 9% AT (T4), 0% de aceite de linaza (AL) (T5), 3% AL (T6), 6% AL (T7) y 9% AL (T8).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción acumulada de gas por gramo de MS cambió por efecto del sustrato, tiempo y tratamiento ($P \leq 0.05$; Cuadro 1). A diferentes proporciones de aceite; aceite de atún y linaza protegidos, no hubo cambios significativos en el comportamiento de las medias de esta variable por efecto de los tratamientos ($P > 0.05$), a diferencia de lo que observo (Brandt, et al., 1992) y (Zinn, 1992), donde recomiendan un nivel que va de 2% a 6% de grasa protegida.

Con base a lo obtenido en la gráfica 1, la cinética de producción de gas con la inclusión de aceites protegidos con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en la dieta animal, indica que durante la fase de retardo la linaza al 6%, 3% y 9% tuvieron mayor tasa de fermentación que el aceite de atún al 3%, 6% y 9%; estadísticamente son no significativas ($p < 0.05$).

La producción de gas resulta de la fermentación de los carbohidratos solubles y estructurales del sustrato, mientras que la fermentación de proteína y lípidos es escasa (Getachew et al., 1998). A medida que avanzó el tiempo de incubación el volumen de fermentación, durante la fase de retardo (14 horas) tuvo un ascenso en la actividad fermentativa de azúcares, oligosacáridos derivado de la acción de diferentes bacterias sacarolíticas y amilolíticas; la tasa de producción de gas (48 horas) tuvo un crecimiento de manera exponencial reflejando de la degradación de compuestos de mediana fermentación, almidón por acción de bacterias pectinolíticas y/o amilolíticas; el volumen máximo de fermentación represento la cúspide de acción de bacterias celulíticas y/o hemilolíticas en compuestos de lenta fermentación (celulosa y hemicelulosa).



Tabla 1: Parámetros de la cinética y volumen fraccional de producción de gas de fermentación y digestibilidad in vitro de dietas conteniendo aceite de atún o linaza

Tratamiento		Parámetros de la cinética			Volumen Fraccional			DIVMS
Aceite	%	v	s	L	Va	vb	vc	%
		mL g ⁻¹	h ⁻¹	h	mL g ⁻¹	mL g ⁻¹	mL g ⁻¹	
Atún	0	204.00 ^a	0.030467 ^a	1.114 ^a	112.13 ^a	79.31 ^a	25.857 ^a	15.635 ^a
Atún	3	216.43 ^a	0.025533 ^a	1.143 ^a	106.4 ^a	93.78 ^a	24.854 ^a	14.127 ^a
Atún	6	194.67 ^a	0.0234 ^a	2.843 ^a	84.08 ^a	88.58 ^a	28.354 ^a	14.268 ^a
Atún	9	188.20 ^a	0.024467 ^a	2.702 ^a	81.07 ^a	88.5 ^a	23.721 ^a	13.619 ^a
Linaza	0	257.33 ^a	0.023633 ^a	0.505 ^a	120.51 ^a	111.11 ^a	36.236 ^a	15.518 ^a
Linaza	3	236.13 ^a	0.024333 ^a	0.674 ^a	114.22 ^a	100.17 ^a	31.747 ^a	12.470 ^a
Linaza	6	246.57 ^a	0.024333 ^a	2.646 ^a	107.33 ^a	113.29 ^a	35.072 ^a	13.323 ^a
Linaza	9	202.47 ^a	0.023467 ^a	1.695 ^a	90.79 ^a	89.94 ^a	30.132 ^a	13.049 ^a

^a medias con la letra superíndice igual no son diferentes (p<=0.05)

v =volumen máximo (mL g⁻¹)

s= tasa de producción de gas (h⁻¹)

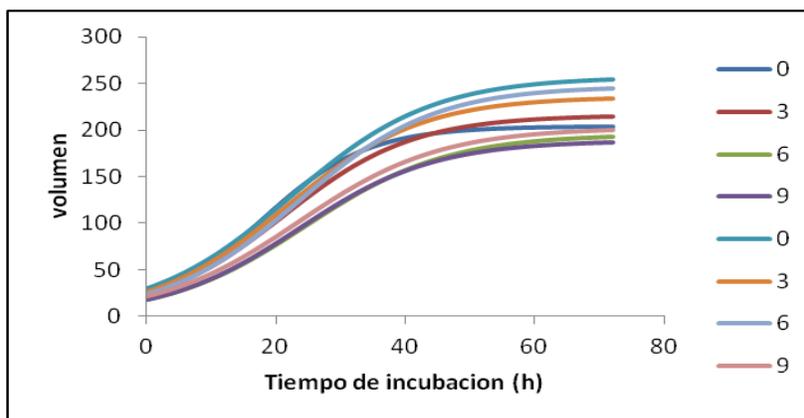
L= fase de retardo (h)

va =volumen acumulado a (mL g⁻¹)

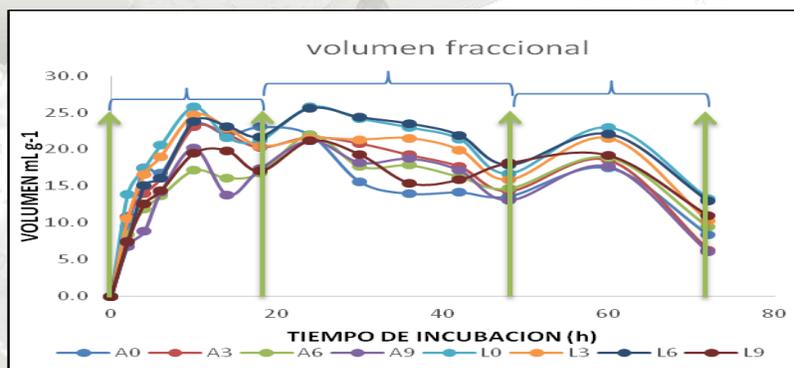
vb =volumen acumulado b (mL g⁻¹)

vc =volumen acumulado c (mL g⁻¹)

DIVMS= digestibilidad de materia seca (%)



Grafica 1: muestra la cinética de producción de gas de fermentación de dieta para ovinos, conteniendo aceite de linaza o de atún protegido con $\text{Ca}(\text{OH})_2$



Grafica 2: Perfil de producción de gas de fermentación de dietas para ovinos conteniendo aceite de atún o linaza protegido con $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que con el aceite protegido se puede incluir mayores niveles de grasa a la dieta hasta un 9%, sin tener un efecto negativo en la fermentación; se infiere que esto traerá consecuencias positivas sobre la producción animal, ya que se cumpliría con los requerimiento de energía aun cuando el consumo de alimento del animal sea bajo por diversas condiciones; así como una mejora en la calidad de la carne en cuanto a marmoleo, contenido de aceite esenciales.



Es posible que la aplicación a niveles superiores de aceites protegidos en la dieta reduzca la actividad fermentadora y aprovechamiento de los nutrientes.

LITERATURA CITADA

A.A Fredy. 2009. Efecto de diferentes tipos de grasa en dietas para rumiantes sobre la cinética de degradación y fermentación de la materia seca *in vitro*. Disponible en: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/viewFile/538/479>. Consultado 25/09/2013

Casals I Costa R. Efectos de la utilización de lípidos protegidos en la alimentación de ovejas de ordeño durante los periodos de lactación y cubrición. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5751/TRCC1de1.pdf;jsessionid=8065483F44827E73752276A21CD2D3EB.tdx?sequence=1>. Consultado 25/09/2013

González M. R. 2007. Efecto de adicionar grasa de sobrepeso en el comportamiento productivo de toretes en finalización. Tesis de licenciatura. Departamento de zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

Getachew G, Blümmel M, Makkar H P S and Becker K. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol*. 1998. 72:261-281.

Menke K H and Steingas H. Estimation of the energetic feed value obtained from Chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop*. 1988. 28: 7-55.



PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR *Trametes trogii* EN RASTROJO DE MAIZ CON Y SIN MAZORCA

Linares-Ramírez J. M.¹, Luengas Barroso G.¹, Mejía Campos J.¹, Carrillo Díaz M. I.², Tirado González D. N.², Miranda-Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia. ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. Edo. De México
miroslira@hotmail.com

Resumen

Las celulasas exógenas producidas por hongos ligninolíticos, como *Trametes trogii*, constituyen una alternativa para incrementar la energía digestible en dietas de rumiantes, pues permiten el mejor aprovechamiento de la fibra. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de celulasas del hongo *Trametes trogii* en fermentación sólida en medios de cultivo con extractos de salvado de trigo y plantas de maíz, con mazorca y sin mazorca. Se cultivó *Trametes trogii*, en matraces con salvado de trigo y plantas completas de maíz (CM) y plantas de maíz sin mazorca (SM). Se obtuvieron extractos enzimáticos (EE) a los 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 d y se observó la actividad enzimática de las celulasas (AEC). La AEC se definió como la cantidad de μM de azúcares producida por mL de EE por min de reacción, cuantificadas por la reducción de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). No hubo diferencias entre los promedios de AEC de EE de *Trametes trogii* cultivado en CM y SM. Sin embargo, para la elaboración de EE, es conveniente considerar que el pico más alto de actividad se observa los derivados de medios con plantas completas de maíz, a los 9 d ($558.8 \mu\text{M}$ glucosa/mL/min), mientras que en los extractos de plantas sin mazorca, es conveniente detener la fermentación a los 3 d ($548 \mu\text{M}$ glucosa/mL/min).

Palabras clave: *enzimas fibrolíticas exógenas, Trametes trogii, variedades de maíz.*

Introducción

El rastrojo de maíz alcanza una producción anual de 4.8 millones de toneladas en México (Longoria et al., 2011). Su alta proporción de paredes celulares (FDN) es la principal limitante para su uso en la alimentación de rumiantes. Algunos hongos de pudrición blanca son capaces de producir celulasas (Endo- β -glucanasas, Exo- β -glucanasas o Celobiohidrolasas y β -glucosidasas) y xilanasas (Arabinofurosidasas, Acetil xilan esterasas, Glucoronidasas, β - xilosidasas y Endo- β -xilanasas) que les



permiten acceder y utilizar la celulosa y hemicelulosa como fuentes de energía para su adaptación en sustratos lignocelulósicos (Obodai *et al.*, 2003).

Aunque los microorganismos anaerobios del rumen poseen enzimas celulasas, esterases y proteinasas que trabajan sinérgicamente para hidrolizar celulosa hasta azúcares solubles, la suplementación de enzimas exógenas producidas por hongos, en las dietas de vacas lecheras y ganado de engorda ha mostrado tener potencial significativo para mejorar la utilización de alimentos, especialmente fibrosos, y con ello, el desempeño de los animales (Beauchemin *et al.*, 2002). El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de celulasas del hongo *Trametes trogii* en fermentación sólida en medios de cultivo con extractos de salvado de trigo y plantas de maíz, con mazorca y sin mazorca.

Material y métodos

El presente experimento se realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Departamento de Investigación y Enseñanza de Zootecnia. Las plantas de trigo y de maíz fueron proporcionadas por el centro de investigación INIFAP Chicoloapan, Estado de México. La cepa de hongo *Trametes trogii* se cultivó en medios de agar papa dextrosa (PDA) y se incubó por 8 d a 30° C. Pasado ese tiempo se inocularon cajas Petri con dos medios: 1) salvado de trigo y planta de maíz completa; y 2) salvado de trigo y planta de maíz sin mazorca (rastroy). Ambos medios se hidrataron con una solución de sales a modo que contuviera el 80% de humedad. Se colocaron 3 g de cada uno de los sustratos en cajas de Petri esterilizadas de 10 cm. Los medios en las cajas fueron esterilizados a 1.5 Atm por 30 min y se inocularon con el *Trametes trogii*, los cultivos se mantuvieron a temperatura constante (30°C) por 18 d. Se realizaron extractos enzimáticos a los 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 de incubación del cultivo. Los materiales contenidos en las cajas Petri se vaciaron matraces Erlenmeyer, se les adicionó 90 ml de agua destilada, se taparon con papel parafilm, y se colocaron en un recipiente que cubría 2/3 partes de los matraces con hielo. Se colocó el recipiente en la base de un agitador orbital por 30 min a 120 RPM. Posteriormente se filtró el contenido y se depositaron 40 ml del líquido en tubos cónicos de 50 ml, los cuales se pusieron en una centrífuga a 7000 RPM durante 12 minutos. Se colocaron en tubos de 2 ml, 4 muestras de 1.6 ml del sobrenadante y se congelaron a -20°C.

La actividad enzimática se realizó utilizando carboximetilcelulosa como sustrato (al 1% en buffer de citratos 50 mM, pH=5). En tubos de ensayo se pusieron a incubar 100 µL de buffer de citratos (50 mM, pH=5) y 800 µL de sustrato en un baño María a 50°C por 5 min, posteriormente se añadieron 100 µL del extracto enzimático y se continuó la incubación por 12 min. Se midieron la cantidad de azúcares



producidos por la actividad de celulasas mediante la reducción del reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), de acuerdo a la metodología reportada por Miller *et al.* (1960). A cada tubo de ensayo, se le añadió 1 ml de DNS y se dejó hervir (100°C) por 5 min, inmediatamente después se detuvo la reacción colocando cada tubo en un baño de agua con hielo. Se leyeron absorbancias de cada tubo en un espectrofotómetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer) y se ajustaron contra la lectura de un blanco con extracto enzimático inactivado previamente por calentamiento (100°C por 10 min). La actividad enzimática de celulasas, se definió como la cantidad de μM de azúcares producida por mL de extracto enzimático por min de reacción, cuantificadas por la reducción de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Resultados y Discusión

La mayor AE de celulasas se observó a los 9 d para los medios con extractos enzimáticos de *Trametes trogii* cultivado en medios con plantas completas de maíz (CM; 769 μM glucosa/mL/min; Figura 1). Los extractos de enzimas de medios SM mostraron dos picos similares de actividad enzimática, a los 3 y 12 d (567 vs. 548 μM glucosa/mL/min). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los promedios a través de tiempo de muestreo, en la actividad de celulasas en los extractos de *Trametes trogii* cultivado en medios de planta completa (CM) y planta sin mazorca (SM; 372 vs. 323 μM glucosa/mL/min). Nuestros resultados no parecen sugerir alta variabilidad en el potencial del hongo "*Trametes trogii*" a través de los sustratos evaluados. En el área agronómica, el tratamiento directo de materiales fibrosos con hongos ligninolíticos ha mostrado resultados alentadores (Labarere y Bois, 2001). Algunos trabajos han demostrado que la adición de enzimas fibrolíticas exógenas en las raciones de rumiantes, pueden incrementar la digestibilidad *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de la materia seca y de la fibra detergente neutro en alimentos fibrosos (Colombatto *et al.*, 2002).

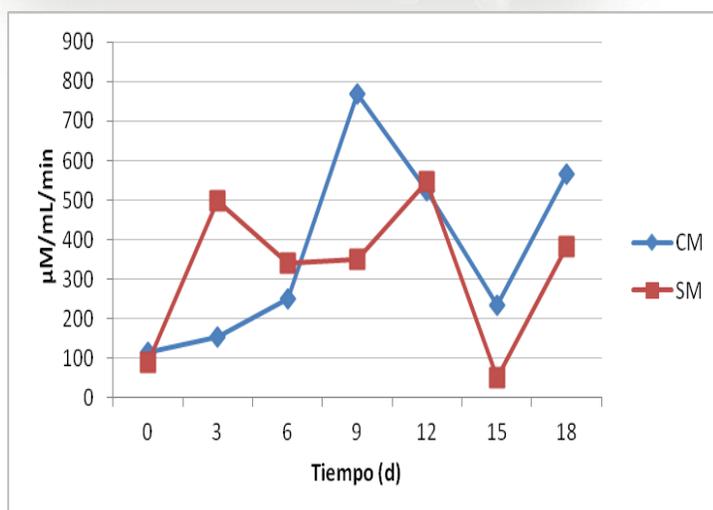


Figura 1. Efecto de tratamiento sobre la actividad enzimática de celulasas de "*Trametes trogii*" en fermentación sólida en medios de plantas de maíz con y sin mazorca (CM y SM).



Conclusión

No hubo diferencias en el promedio de actividad de celulasas entre los extractos enzimáticos de *Trametes trogii* cultivado en medios de planta de maíz con y sin mazorca, sin embargo, para la elaboración de EE en estas condiciones, es conveniente considerar que el pico más alto de actividad se observa los derivados de medios con plantas completas de maíz, a los 9 d, mientras que en los extractos de plantas sin mazorca, es conveniente detener la fermentación a los 3 d.

Literatura citada

- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Wang, Y., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 81 (E. Suppl. 2), E37–E47.
- Colobatto, D., Mould, F.L, Bhat, M.K. y E. Owen. 2002. The effect of fibrolytic enzyme application on rate and extent of alfalfa stem fermentation, assessed *in vitro*. Page 209 *in Proc. Br. Soc. Anim. Sci. Annu. Mtg. Penicuik, U.K.*
- Labarere, J. y F. Bois. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Capítulo V. Ed. ECOSUR-LIMUSA. México. pp. 86-87.
- Longoria A.H., Luis Caspeta L.G., Gosset G. L., Martínez A.J. Producción de etanol a partir de la fracción celulósica del rastrojo de maíz blanco. XIV Congreso nacional biotecnología y bioingeniería. 1p.
- Miller G.L., Blum R., Glennon W.E., and A.L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical biochemistry* 2: 127-132.
- Obodai, M., J. Cleland-Okine, K.A. Vowotor. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J. Microbiology Biotechnol.* 30: 146-149.



PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* COMO MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAR LA CIBÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL DE FORRAJES EN CAMPO

Díaz-Arévalo M. N.¹, García-García V. M.¹, Penagos-López J. C.¹

Asesores: Cárdenas-Ramírez L. R.², Miranda-Romero L. A.²,

¹Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma de Chapingo
icesar1157@hotmail.com

Resumen

El desempeño productivo de los rumiantes está en función de la calidad del forraje que consumen lo cual se refleja principalmente en bajo consumo voluntario y baja digestibilidad. La problemática que existe en campo es que no se tienen los medios suficientes para poder determinar la calidad de los alimentos a corto tiempo. Por lo tanto, fermentación *in vitro* de forrajes como técnica rápida en campo es de gran importancia. Se realizó un experimento de digestibilidad *in vitro* utilizando como forraje maíz (*Zea mays*), alfalfa (*Medicago sativa*) y orchard (*Dactylis glomerata*), sobre la producción de gas y digestibilidad de la materia seca; como técnica rápida en campo. Se obtuvieron valores de digestibilidad para el maíz, alfalfa, y orchard estadísticamente iguales ($P > 0.05$), sin embargo se encontró que la producción de gas es significativamente diferente ($P \leq 0.05$), además de que la digestibilidad no es equivalente a la producción de gas dado que esto varía dependiendo de la composición del forraje utilizado. Dentro de algunos de los factores que afectan la producción de gas se encuentra el tipo de sustrato y de inóculo, la especie animal donadora del inóculo, su alimentación y el pH del medio. Se concluye que los beneficios de la técnica de producción de gases, esta dado por el bienestar animal y costo, por lo tanto es recomendable para su aplicación en campo.

Palabras clave: *digestibilidad, producción de gas, rumiantes.*

Introducción

La producción de leche y el crecimiento de los rumiantes son limitados por la calidad de los alimentos. Los nuevos programas de evaluación de raciones (NRC, 2001; Fox *et al* 1992; Sniffen *et al.*, 1992; Russel *et al.*, 1992) requieren información detallada de la cinética de digestión de las diferentes fracciones del alimento, lo que hace necesario refinar los métodos para obtener la información solicitada. Expresiones cuantitativas de la cinética de digestión son necesarias para estimar de una



forma más precisa la cantidad de nutrientes digeridos desde los alimentos y las propiedades intrínsecas de estos que limitan su disponibilidad para los rumiantes (López *et al.*, 1998). En la actualidad la determinación de digestibilidad por el método *in vitro* es considerado como simulador de un rumen artificial que es utilizado con tres objetivos: 1) predecir la digestibilidad de los alimentos (Hungate, 1966), 2) comprender los procesos metabólicos y de digestión del rumiante (Barrio *et al.*, 1986) y 3) el estudio de los efectos asociativos (Riquelme, 1984); aunque en estos estudios de incubación *in vitro* se altera la población microbiana, la producción ácidos grasos volátiles el pH y otras características, ocasionadas por el tipo de alimento que se incuba (Chalupa, 1977). Este experimento tiene como objetivo determinar la digestibilidad *in vitro* de forrajes como una técnica microbiológica rápida en campo.

Materiales y métodos

Se realizó un experimento de digestibilidad *in vitro* utilizando como sustrato de tres diferentes forrajes: orchard (*Dactylis glomerata*), alfalfa (*Medicago sativa*) y maíz (*Zea mays*). Las muestras se obtuvieron de la unidad de producción de leche en pastores de la Universidad Autónoma Chapingo. El secado de las muestras se realizó en una deshidratadora de alimentos casera marca Oster modelo número FPSTFD0101 durante un periodo de 12 hrs. Una vez seco se molieron en un molino eléctrico de café (casero) marca Oster, después de esto se tamizaron con la ayuda de una coladera. Se utilizó 0.5 g de cada muestra colocándolas en frascos de 125 ml color ámbar. A cada frasco se le aplicó 81 ml de Solución Mineral Reductora, rápidamente se taparon con un tapón de goma y sellados con aros metálicos. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones cada uno, haciendo un total de nueve unidades experimentales, más dos blancos. A cada frasco se inoculó con 9 ml de inóculo ruminal. El líquido se extrajo de dos borregos fistulados, el cual se procedió a filtrar con una tela de gasa doblada ocho veces. Se colocaron los frascos en un baño María durante 72 hrs a 39 °C, y se tomaron mediciones de presión con un manómetro (0, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72 hrs). Al término de las mediciones, las muestras se filtraron con ayuda de una bomba de vacío. Una vez filtradas las muestras se metieron a una estufa a 60°C durante 48 hrs para secarlas y obtener el peso seco. Los datos se procesaron en hoja de cálculo electrónica del programa Excel 4.0. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.1$). Todo lo anterior se realizó con el paquete estadístico SAS (2009).



Resultados y discusión

Cuadro 1: Volúmenes de gas, fases lac y exponencial, y digestibilidad *in vitro* de la Materia seca

Sustrato	V	Fa	Fb	Fc	S	L	DIMS
	-----ml g ⁻¹ MS-----				h ⁻¹	h	%
Orchard	249.37 ^b	102.56 ^b	112.687 ^a	35 ^a	0.017 ^b	-6.074 ^b	64.763 ^a
Alfalfa	264.37 ^{ab}	154.32 ^a	107.787 ^a	18.19 ^b	0.033 ^a	-2.894 ^a	69.413 ^a
Maíz	322.37 ^a	198.32 ^a	122.647 ^a	35.74 ^a	0.033 ^a	-3.57 ^{ab}	66.643 ^a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$);

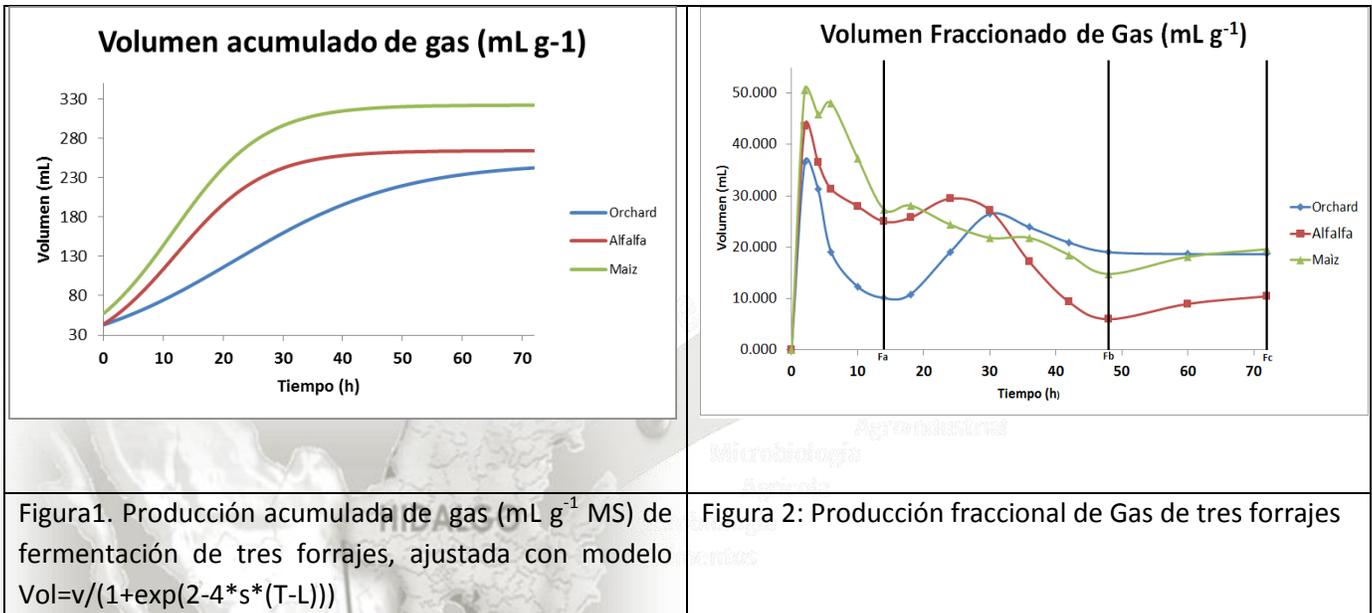
V=volumen de gas máximo, Fa= volumen de gas acumulado de 0-14 h, Fb=Volumen de gas acumulado de 18-48 h, Fc =volumen de gas acumulado de 60-72 h, S=fase lac o de retardo, L=fase exponencial del crecimiento microbiológico, DIMS= Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca.

La producción de gas acumulado por gramo de MS tubo un cambio por efecto del sustrato utilizado en la fermentación, ($P\leq 0.05$; Cuadro 1). También, se observo que la producción de gas aculado Fa hubo una diferencia significativa por efecto de sustrato ($P<0.01$) es probablemente a que el Maíz contiene una mayor cantidad de carbohidratos solubles (Shimada, 1983). En cuanto a Fb no se encontró un cambio en la cantidad de gas producido por efecto de sustrato ($P>0.05$) siendo que los tres tienen al parecer la misma cantidad de almidones y hemicelulosa; en Fc la alfalfa es la que muestra la diferencia en la producción de gas acumulado, puesto que era alfalfa tierna (prefloración) contiene notablemente una menor cantidad de celulosa y hemicelulasa de pared celular. Para la DIMS no se encontraron cambios significativos por efecto de sustrato ($P>0.05$) que comparados con Blas 2010, estos resultados concuerdan, demostrando que puede ser factible su utilización en campo.

Se encontró que la producción acumulada de gas para cada tipo de sustrato es diferente (Figura 1), siendo que el maíz tiene la mayor cantidad de gas producido y que el Orchard es el que menos tiene, pero al momento de relacionar la cantidad de gas con la digestibilidad *in vitro* de la materia seca donde se obtuvieron valores muy similares y estadísticamente iguales, podemos concluir que, al menos para este experimento, la digestibilidad no es equivalente a la cantidad de gas producido. Para la producción fraccionada de gas (Figura 2), asociada a los tipos de microorganismos que utilizan cierto tipo de componente del sustrato para su alimentación, se observo en Fa que en orchard se degrado o utilizo casi todos sus carbohidratos, el maíz fue el que mayor cantidad de gas produjo puesto a la



cantidad de carbohidratos solubles es muy alta, favorece el crecimiento de microorganismos capaces de utilizar carbohidratos simples, en Fb se no se observo un cambio en la cantidad de gas acumulado, pero al observar el tiempo y la cantidad de gas fraccionado se encontró que el maíz tiene un descenso prácticamente constante, en orchard los microorganismos tardaron más para empezar a aprovechar completamente los almidones y la alfalfa los degrado muy rápido, por último en Fc se encontró una diferencia notable en la alfalfa que casi no tubo celulosa y hemicelulosa aprovechable.



Conclusión

Con los resultados obtenidos se puede concluir, que el forraje con mayor digestibilidad fue la alfalfa, pero no tuvo la mayor cantidad de gas producido esto debido a la composición en sus estructuras, comparándola con el maíz que produjo la mayor cantidad de gas por el alto contenido de carbohidratos; se tiene que este experimento es funcional en campo siempre y cuando se tengan todas las herramientas, expuestas en la metodología, ya que los resultados obtenidos son muy semejantes a los ya obtenidos en otros experimentos realizados en laboratorio.



Literatura citada

- Barrio, J. R., Guestsch, A.L. and Owens F.N. 1986. Effect of dietary concentrate on *in situ* dry matter and nitrogen disappearance of a variety of feedstuffs. J. Dairy Sci. 69:420-430.
- C. de Blas, Mateos G. G. y García-Rebollar P. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Disponible: <http://www.fundacionfedna.org/tablas-fedna-composicion-alimentos-valor-nutritivo>. Consultado el 1 oct, 2013.
- Chalupa, W. F. 1977. Manipulating rumen fermentation. J, Anim. Sci. 45:585-599.
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press. New York. SN.
- López S, Carro M D, González J S and Ovejero F J 1998 Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. Animal Feed Science and Technology. 73: 99-113.
- Riquelme, V. E. 1984. Suplementación y efectos asociativos en dietas basadas en subproductos agrícolas. Seminario Utilización de Subproductos Agroindustriales en la Alimentación de Rumiantes. Centro de Ganadería, C.P. Chapingo, México.
- Shimada A. S. 1983. Fundamentos de nutrición animal comparativa. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en Mexico. 373 p.
- Sniffen, C. J., O'Connor J D, Van Soest P. J., Fox D. G. and Russell J. B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science. 70: 3562 - 3577.



EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y TIPO DE SUSTRATO EN LA CONCENTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE UN EXTRACTO DE CULTIVO DE *Trametes trogii*

Cruz-Caamaño Y¹. Epitacio-Fernández K¹. Juárez-Luna M. I¹, Carrillo-Díaz .M. I.²,
Miranda-Romero. L. A²

¹Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio de Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad autónoma Chapingo. Km .38.5 Carretera México Texcoco C.P 56230

zootecnia_4d@hotmail.com

Resumen

La celulosa es el principal componente de la membrana celular de los forrajes, está constituida por moléculas de D-glucosa unidas por los enlaces β -1,4 glucosídicos generalmente resistente a la fermentación, teniendo en cuenta su estructura, pueden usarse como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos capaces de producir enzimas extracelulares con actividades celulasas. Se realizó un experimento para evaluar el efecto de la concentración de un extracto crudo enzimático (ECE) a diferentes temperaturas en la actividad enzimática de celulasas. Se utilizaron como sustratos rastrojo de maíz con y sin mazorca enriquecidos con 20% de salvado de trigo para cultivar al hongo *Trametes trogii* por fermentación en estado sólido. Los extractos obtenidos se sometieron a un proceso de concentración a temperatura ambiente (22°C) y a 30°C. La concentración de celulasas a temperatura ambiente con el tratamiento de rastrojo con maíz fue la mayor ($p > 0.05$) con 94% más que la obtenida sin concentrar. El proceso de concentración de enzimas permite un aumento en la actividad enzimática de celulasas y este proceso puede ser utilizado para mejorar la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos.

Introducción

La estructura morfológica del tejidos de los forrajes puede ser uno los principales factores que limitan el consumo, la digestibilidad y la energía disponible en los rumiantes. Estos cubren la mayor parte de sus requerimientos energéticos a través de la fermentación de las paredes celulares realizadas por microorganismos ruminales. La celulosa es el principal componente de la membrana celular de la mayor parte de las plantas, está constituida por moléculas de D-glucosa unidas por los enlaces β -1,4 glucosídicos y es el más abundante en la biosfera. Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa. Bacterias y hongos pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material



lignocelulósico. Por ello se ha propuesto la utilización de enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) como xilanasas, celulasas, enterasas y lacasas de origen fúngico o bacteriano (Bhat Hazlewod, 2001; Beauchemin *et al.*, 2011; Niamke y Sun, 2004; Adesogan *et al.*, 2007; Marquez- Araque *et al.*, 2007; Graminha *et al.*, 2008) para incrementar la hidrólisis de las paredes celulares principalmente de los forrajes. Los hongos de los géneros *Pleurotus* y *Trametes* tienen habilidad para degradar fibra, ya que producen diferentes complejos enzimáticos lignocelulolíticos (Levin y Forchiassin, 1997), el tipo y actividad de las enzimas producidas puede variar dependiendo del microorganismo y de la cepa, del sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo, así como del tiempo empleado para la producción de las enzimas. La fermentación en estado sólido se ha utilizado para el enriquecimiento proteico de residuos lignocelulósicos y ha sido foco de atención por su aplicabilidad directa del producto fermentado con fines alimenticios para rumiantes. El rastrojo de maíz tiene un bajo contenido de proteínas y el crecimiento de hongos puede incrementar alrededor del 10 al 15% su digestibilidad (Shojaosadati *et al.*, 1999, Iluyemi *et al.*, 2006) Este estudio indica que los extractos enzimáticos del hongo *Trametes trogii* se pueden utilizar para desarrollar nuevos métodos para superar la baja digestibilidad de las paredes celulares de las plantas. La utilización de diferentes sustratos para producir extractos de enzimas puede conducir a la producción de complejos ligninolíticos viables que podrían mejorar el valor nutritivo de los alimentos fibrosos. La cepa *Trametes trogii* podrá ser una alternativa para obtener extractos enzimáticos con el fin de ser utilizados como fuentes de enzimas fibrolíticas exógenas para su uso en la alimentación de rumiantes, planteando el objetivo en el presente trabajo, se analizó la actividad de enzimas celulasas, caracterizado en un medio de fermentación sólida, utilizando rastrojo de maíz enriquecido con salvado de trigo como sustrato en dos tratamientos, con maíz y sin maíz, para posteriormente realizar el comparativo con los extractos concentrados para así saber cuál de ellos promueve la producción mayor cantidad de celulasas.

Materiales y Métodos

Cultivo del hongo: Se utilizó el hongo *Trametes trogii* (donado por la Universidad Autónoma de Aguascalientes). Este hongo se cultivó en PDA, para propiciar su crecimiento durante 7 días. Se utilizaron dos tratamientos: rastrojo de maíz con grano, y rastrojo de maíz sin grano, a cada uno de los sustratos se les añadió 20% salvado de trigo como aditivo y se ajustaron al 80% de humedad. Se pesaron 10 g de sustrato en cajas Petri y posteriormente se inocularon 4 discos de 1 cm de diámetro y luego se incubaron en una estufa a 30°C. Al tener dos tratamientos se realizaron tres repeticiones en 7 tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 días). **Obtención del extracto enzimático:** La extracción enzimática se realizó cada 3 días, siguiendo el proceso de obtención de extracto acuoso de hongos fibrolíticos,



tomando 1.6 mL de esta muestra se colocaron en micro tubos de 2 ml. Y se realizaron cuatro sub repeticiones para cada tratamiento. Medición enzimática: Para la medición enzimática se tomaron 800 μ L del extracto obtenido y se agregaron 100 μ L de buffer con un pH de 5, 100 μ L de extracto enzimático y se incubó por 20 minutos a 50°C, posteriormente se agregó el reactivo DNS y se hirvieron las muestras durante 5 minutos, después las muestras se colocaron en un baño de agua con hielo y se leyeron en el espectrofotómetro UV-VIS LAMBDA 35 PERKIN ELMER a una longitud de onda de 595 nanómetros. Concentración enzimática: Los extractos enzimáticos se concentraron en el aparato Vacufuge plus de la marca Eppendorf a temperatura ambiente (22° C) y a 30 ° C durante 2 horas 30 minutos, se tomaron 100 μ L de extracto enzimático concentrado y se realizó la medición de actividad enzimática. El diseño que se utilizó fue un completamente al azar con arreglo factorial 2x3x7. Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS 9.

Resultados y Discusión

Los sustratos analizados en este estudio fueron diferentes entre sí ($p < 0.05$), siendo el mejor tratamiento el rastrojo con maíz. Hubo diferencias significativas entre las temperaturas de la concentración, ya que la temperatura ambiente (22°C) permitió una mayor actividad enzimática ($p < 0.05$). No se presentó interacción entre los sustratos y los tratamientos de concentración del extracto enzimático. Comparando los resultados en lo que se refiere a condiciones, podemos observar que la concentración a temperatura ambiente, es 94% mayor que lo obtenido sin concentrar y 84% mayor que la concentración obtenida a 30°C como lo indica la figura 1.



Concentración de celulasas a diferentes temperaturas

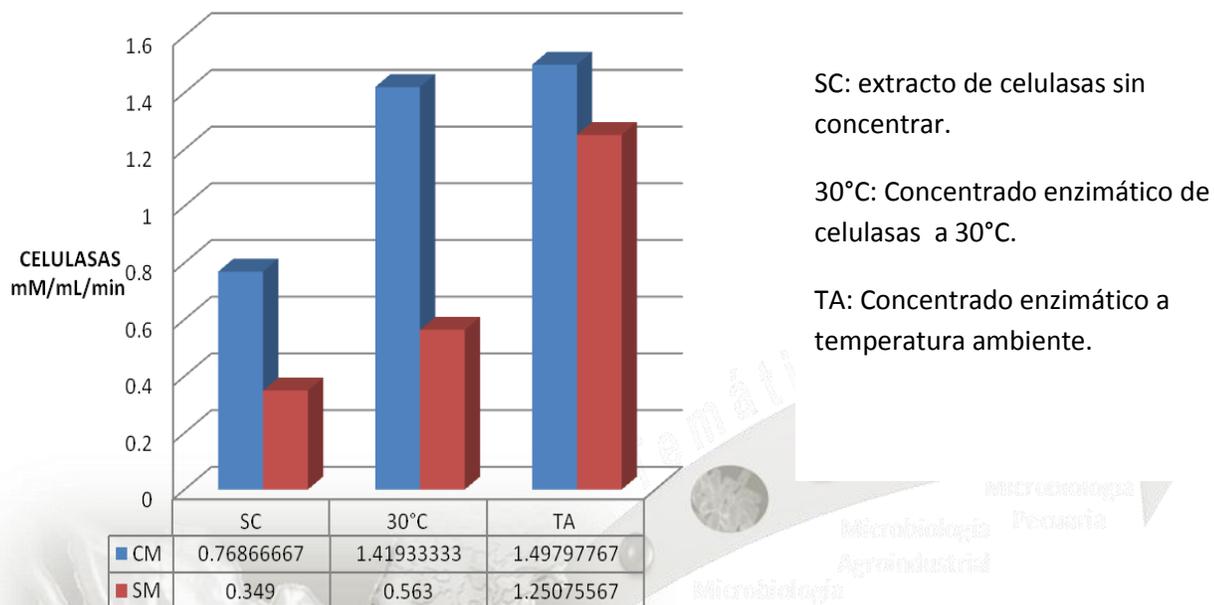


Figura 1. Concentración de celulasas a diferentes temperaturas.

Estudios relacionados con la concentración de celulasas para la producción de biocombustibles, indican que un incremento en la concentración de celulasas resulta en un incremento en la tasa de producción de etanol, probablemente por la cantidad de celulasas presentes (Stengberg *et al.*, 1999).

CONCLUSIÓN

La actividad celulolítica de extractos de *Trametes trogii* es incrementada por concentración, pero esta es dependiente del tipo de sustrato y la temperatura de concentración. En este experimento fue mayor con rastrojo sin mazorca y a temperatura ambiental de concentración.

LITERATURA CITADA

Adesogan, A., S. Kathi, C.K. Arriola, D.B., Dean and C.R. Staples. 2007. *Strategic addition of dietary fibrolytic enzymes for improved performance of lacting dairy cows*. Florida Ruminant Nutrition Symposium. University of Florida. pp:1-19.



- Beauchemin, K.A., L. Holsthausen. 2011. *Developments in enzyme usage in ruminants. In: enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci.* 81: E37-47.
- Bhat, K.M. and G. Hazlewood. 2003. *Enzimology and other characteristics of cellulases and xilanasas. IN: Enzymes in Farm Animal Nutrition* M.R. Bedford, G.G. Partridge. CABI Publishing (Ed.), UK pp: 11-60.
- Graminha, N.E.B., A.Z.L. Goncalves, R.D.P.B. Pirota, M.A.A. Balsalobre, R. Da Silva, E. Gomes. 2008. *Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Anim. Feed Sci. Technol.* 144: 1-22.
- Iluyemi, F.B., Hanafi, M.M. O. Radziah, M.S Kamarudin. 2006. Fungal solid-state culture of plam kernel cake. *Bioresour. Technol.* 97, 477–482
- Levin L and F. Forchiassin. 1997 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. *Rev. Arg. Microbiol.* 29: 16-23.
- Márquez-Araque, A.T., G.D. Mendoza, S.S. González, S.E. Buntix. C.O. Loera. 2007, *Actividad fibrolítica de enzimas producidas por trametes sp. EUM1, pleurotus ostreatus IE8 y aspergillus niger AD96.4 en fermentación sólida*, *REV. INTERCIENCIA* 32: 780-785.
- Niamake, N.J. and N. Sun. 2004. *Cellulose degradation by fungi. In: Fungal biotechnology in agricultural, Food and Environment Applications.* 31: 365-373.
- Shojaosadati, S.A., R. Faraidouni, M. A., Mohamadpour. 1999. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. *Resour. Conserv. Recyc.* 27, 73–87.
- Stenberg K, M. Bollók, K. Réczey, M. Galbe and G. Zacchi. 2000. Effect of Substrate and Cellulase Concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Biotechnology and Bioengineering* (68) 2 204-210.



EFFECTO DE MELAZA E INOCULANTE DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LAS CARACTERÍSTICAS DE ENSILADOS DE MARALFALFA (*Pennisetum sp*)

De Lira Candelas A. L.¹, Díaz Villegas L.¹, Galván Manuel D.¹, Hernández Hernández F.², Miranda Romero, L. A.².

¹Departamento de Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

dlira-zoo@gmail.com

Resumen

Se determinó la densidad (kg m^{-3}), pH, materia seca (%MS), bacterias ácido lácticas (BAL), y ácido láctico (AL) en ensilados de maralfalfa (*Pennisetum sp*). Los tratamientos fueron: 70% maralfalfa-30% maíz seco-0.1% inoculante (T1), 77.5% maralfalfa-17.5% maíz seco-5% melaza (T2) y 75% maralfalfa-15% maíz seco-10% melaza (T3). El diseño fue completamente al azar con tres repeticiones y se midió densidad (kg m^{-3}), pH, materia seca (%), bacterias ácido lácticas (Log_{10} NMP), ácido láctico (%), así como las características organolépticas (color, olor, textura, humedad). Se analizó con el procedimiento ANOVA ($P \leq 0.05$) y la prueba de comparación de medias de Duncan. Los resultados indican que la adición de melaza al 10% mejoró ($P < 0.05$) la densidad, pH y MS (421 kg m^{-3} , 5.2 y 36.8%) respecto a los otros dos tratamientos. Respecto a las BAL y AL, aunque los valores fueron mayores (8.8 Log_{10} y 1.0%) con respecto al tratamiento sin melaza (T1; 5.2 Log_{10} y 0.42%) no fue significativo. Se concluye que la adición de azúcares es más efectivo que el inoculante de BAL para mejorar el ensilaje de Maralfalfa.

Palabras clave: Ensilado, ácido láctico, características organolépticas, melaza, maralfalfa, significancia.

Introducción

El pasto maralfalfa (*Pennisetum sp.*) es un pasto mejorado de origen colombiano, que según la literatura, contiene humedad 79.3 %, cenizas 13.50%, fibra 53.33 %, grasa 2.10 %, carbohidratos solubles 12.20 %, proteínas crudas 16.25 %, nitrógeno 2.60 %, calcio 0.80 %, magnesio 0.29 %, fósforo 0.33 %, potasio 3.38 %, proteínas digeribles 7.43 %, total nitrógeno digestible 63.53 %. Se da en alturas comprendidas desde el nivel del mar hasta 3000 metros. Se adapta bien a suelos con fertilidad media a alta. Su mejor desarrollo se obtiene en suelos con buen contenido de materia



orgánica y buen drenaje (Pilatásing, 2011). Recientemente se ha iniciado el uso del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp) como pasto de corte en la alimentación de ganado, quizás por el interés que ha generado en los productores por su buena calidad y alta producción de biomasa, características importantes para ser ensilado. Este proceso es una manera de tener forraje verde de alto valor nutritivo disponible para el ganado en época de sequía para sostener la producción tanto en épocas de lluvias como de sequías.

La conservación por ensilaje se realiza por medio de la fermentación láctica y su éxito radica en favorecer las condiciones que permitan una rápida y alta producción de ácido láctico a expensas de una baja degradación de los componentes nutritivos del forraje. Tales condiciones son el grado de compactación y eliminación del oxígeno, la población de BAL, contenido de materia seca, carbohidratos solubles y proteína, por lo que la mezcla con otros sustratos y la inoculación con BAL puede favorecer la fermentación (E.Bernal., 1991). En esta investigación se determinó la calidad de ensilados de pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp.) utilizando diferentes tratamientos que incluían diversos componentes como: maíz seco, melaza e inoculante en proporciones distintas.

Metodología

Forraje: El pasto maralfalfa que se usó para hacer los microsilos del experimento, se recolectó en una parcela productiva de Tantoyucan, Veracruz.

Silos: se elaboraron microsilos en bolsas de plástico negro de 3 Kg, los cuales contuvieron: T1, maralfalfa (70%)-maíz seco (30%)-inoculante (0.01%); T2, maralfalfa (77.5%)-maíz seco (17.5%)-melaza (5%) y; T3, maralfalfa (75 %)-maíz seco (15 %)-melaza (10 %). Cada uno se hizo por duplicado. Las bolsas se cerraron herméticamente y se mantuvieron así por un año.

Variables: Se determinó la densidad de los silos mediante el principio de Arquímedes (Valero, 1996), las características organolépticas (olor, color, humedad, y textura) siguiendo la metodología propuesta por Chaverrra y Bernal (J.Bernal, 2000). La materia seca, pH, población de bacterias ácido lácticas, contenido de ácido láctico en el ensilado. La materia seca aparente se determinó por secado en estufa a 65° C durante 48 horas. El pH se midió en una muestra de ensilado diluida en agua destilada en una proporción de 1:2 y un potenciómetro. El conteo de BAL por el método de diluciones (Summerson, 1941), y la técnica del "Numero Más Probable (Woomer, 1994). Los medios inoculados se incubaron en cámara de anaerobiosis usando un generador de CO₂ Gas-Pack, a 37 °C durante 72 horas. El ácido láctico se cuantificó en un extracto de los ensilados el cual de un gramo de ensilado mezclado con 10 mL de agua destilada y agitando fuertemente por 20 minutos y dos mililitros del extracto se transfirieron a un tubo Ependorf y se le agregó 0.5 mL de ácido metafosfórico (25%) para su conservación. Para la determinación los extractos se descongelaron, se centrifugaron a 5 000 rpm por



5 minutos y se diluyeron 1:50 (0.1 mL de extracto más 4.9 mL de agua destilada). De ésta dilución se transfirieron 0.5 mL a un tubo de ensayo, 3.0 mL de H₂SO₄ concentrado (96%), se mezcló con el agitador vortex y se colocaron en un baño de agua a ebullición (95-100°C) por 10 minutos. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionó 50 µL de la solución de CuSO₄·5H₂O (4%) y 100 µL de p-hidroxidifenil (1.5%). A continuación se mezcló con el agitador vortex y se esperó hasta que la solución mostró un tono azul a púrpura, para hacer la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a 570 nm, calibrando con el blanco a cero.

Análisis de resultados: Para el análisis de las características químicas y organolépticas se realizó un análisis de varianza, a través del procedimiento ANOVA paquete estadístico SAS, para determinar si existía o no diferencia estadística entre los tratamientos con un (P>0.5). Además, se realizó la Prueba del rango múltiple de Duncan para corroborar si había significancia entre las variables de los tratamientos con un (P>0.1).

Resultados y discusión

La variable densidad solo nos muestra una diferencia estadísticamente real entre los tratamientos 1 y 2 mientras que los tratamiento 3 se ubica con un valor intermedio a los tratamientos de 1 y 2, esto estadísticamente nos dice que el T3 no es diferente a ninguno de los otros dos, por lo tanto la diferencia entre 1 y 2 no se puede considerar significativa. De esta forma se podría entender que el mejor tratamiento fue el 2 ya que mostro la densidad mayor lo cual nos lleva a la idea de que estuvo mejor compactado que los ensilados de los otros 2 tratamientos y así disminuyendo la cantidad de O₂ durante la fermentación propiciando un ambiente más anaerobio.



Cuadro 1. Características del ensilado de maralfalfa-paja adicionado de melaza e inoculado con bacterias ácido lácticas

Trat	Densidad kg m ⁻³	pH	MS %	BAL Log ₁₀ g ⁻¹	AL %
T1	394.00b	5.6433a	28.037b	5.240a	0.4233a
T2	435.67a	6.3100a	43.003a	8.603a	0.2900a
T3	421.00ab	5.2867a	36.823ab	8.863a	1.0000a

T1= Maralfalfa 70%, maíz seco 30% e inoculante 0.01; T2= maralfalfa 77.5%, maíz seco 17.5% y melaza 5%; T3= maralfalfa 75%, maíz seco 15% y melaza 10%. MS= materia seca; BAL= bacterias ácido lácticas; AL= ácido láctico. Medias en la misma columna con al menos una literal (a y b) en común no son diferentes ($P>0.1$)

En cuanto a la variable pH podemos observar claramente que son valores demasiado altos, lo cual nos indica que la calidad del ensilado es mala, ya que para que un ensilado sea de buena calidad debe de tener un pH menor a 4.8 si su porcentaje de MS es mayor a 35 y para ensilados con un porcentaje de MS menor a 35 se requiere un pH menor a 4.2 (Bjorge, 1996.). Relacionando los resultados de pH y porcentaje de ácido láctico observamos que son proporcionales ya que el tratamiento 2 presenta el pH más alto (6.3) y así mismo el porcentaje de ácido láctico más bajo, y por el contrario el tratamiento 3 tuvo el pH más bajo (5.2) y el porcentaje de ácido láctico más alto; el T1 muestra resultados intermedios en ambas variables. Aunque el tratamiento 3 fue el que obtuvo mejores resultados en las variables pH y ácido láctico no quiere decir que fue el mejor ya que los resultados de todos los tratamientos están por debajo de los parámetros mínimos para que alguno se considere de buena calidad (Bjorge, 1996.).

En cuanto a materia seca (MS) se observan detalles parecidos a los de la variable densidad, ya que entre tratamientos 1 y 2 si existe diferencia que estadísticamente no es significativa pero el tratamiento 3 presenta un valor intermedio por lo que se considera que no es diferente ni del T1 ni de T2.

Dentro de la variable bacterias ácido lácticas podemos observar que el tratamiento que presenta mayor cantidad de estas es el T3 lo cual, considerando considerandos el resultado de porcentaje de ácido láctico de este mismo tratamiento nos indica una relación proporcional entre ambas variables para dicho tratamiento. Al analizar el tratamiento 2 vemos que es un caso contrario al T3 ya que no presenta una relación proporcional al tener un numero de bacterias ácido lácticas alto y el % de ácido láctico más bajo y en el caso de los resultados del tratamiento 1 comparándolos con el tratamiento 3 se puede decir que son proporcionales.



Cuadro 2. Características organolépticas de ensilados de pasto maralfalfa

Trat	Color	Olor	Textura	Humedad
T1	Bueno	Regular	Bueno	Bueno
T2	Regular	Regular	Bueno	Regular
T3	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno

T1= Maralfalfa 70%, maíz seco 30% e inoculante 0.01; T2= maralfalfa 77.5%, maíz seco 17.5% y melaza 5%; T3= maralfalfa 75%, maíz seco 15% y melaza 10%

bueno para los tres tratamientos; en cuanto a la humedad el T1 y T3 al ejercerse presión sobre el forraje no se humedece la mano característica de un buen ensilado, mientras que en el T2 al ejercer presión sobre un puño de forraje escurren gotas esto nos lleva a un ensilaje de regular calidad

Conclusión

La calidad de un ensilado depende de muchas variables o factores, al analizar los resultados de los distintos tratamientos que se realizaron obtenemos que de los 3 el mejor fue el tratamiento 3 que contenía maralfalfa (75%), maíz seco (15%) y melaza en un 10% , este último aditivo se considera que es el que determino la calidad del ensilado, ya que en el ensilado que no hubo presencia de melaza se obtuvo mala calidad y en el que hubo melaza en una cantidad intermedia los resultados fueron medianamente positivos, esto solo es una suposición ya que al realizar el procedimiento ANOVA en el paquete estadístico de SAS se obtiene que no hay diferencia significativa entre ninguno de los 3 tratamientos (alfa = 0.05) por lo tanto ninguno de los aditivos, ingrediente e inoculantes hacen que la calidad de un ensilado de pasto maralfalfa sea mejor.

Literatura Citada

Bjorge, M. (1996.). *Evaluating silage quality*. . Obtenido de [Http: www.agric.gov.ab.ca/crops/forage](http://www.agric.gov.ab.ca/crops/forage)
Summerson, S. B. (1941). *The colorimetric determination of lactic acid in biological*.
Woomer, P. (1994). *Most probable number counts* (No.5 ed., Vol. Methods of Soil Analysis). (R. Weaver, J. Angle, & P. Bottomley, Edits.) SSSA Book Series.

La tabla 2 muestra las características organolépticas evaluadas en cada tratamiento, respecto al color, los tratamientos 1 y 2 presentaron una calificación buena (tonalidad verde amarillento), mejor que el tratamiento 2 (tonalidad verde oscuro). En cuanto al olor, T1 y T2 presentaron un olor regular, equivalente a fuerte vinagre, característico de ensilaje de regular calidad, mientras que el T3 presento un olor a vinagre característico de un buen ensilado. La textura tuvo un comportamiento



III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013

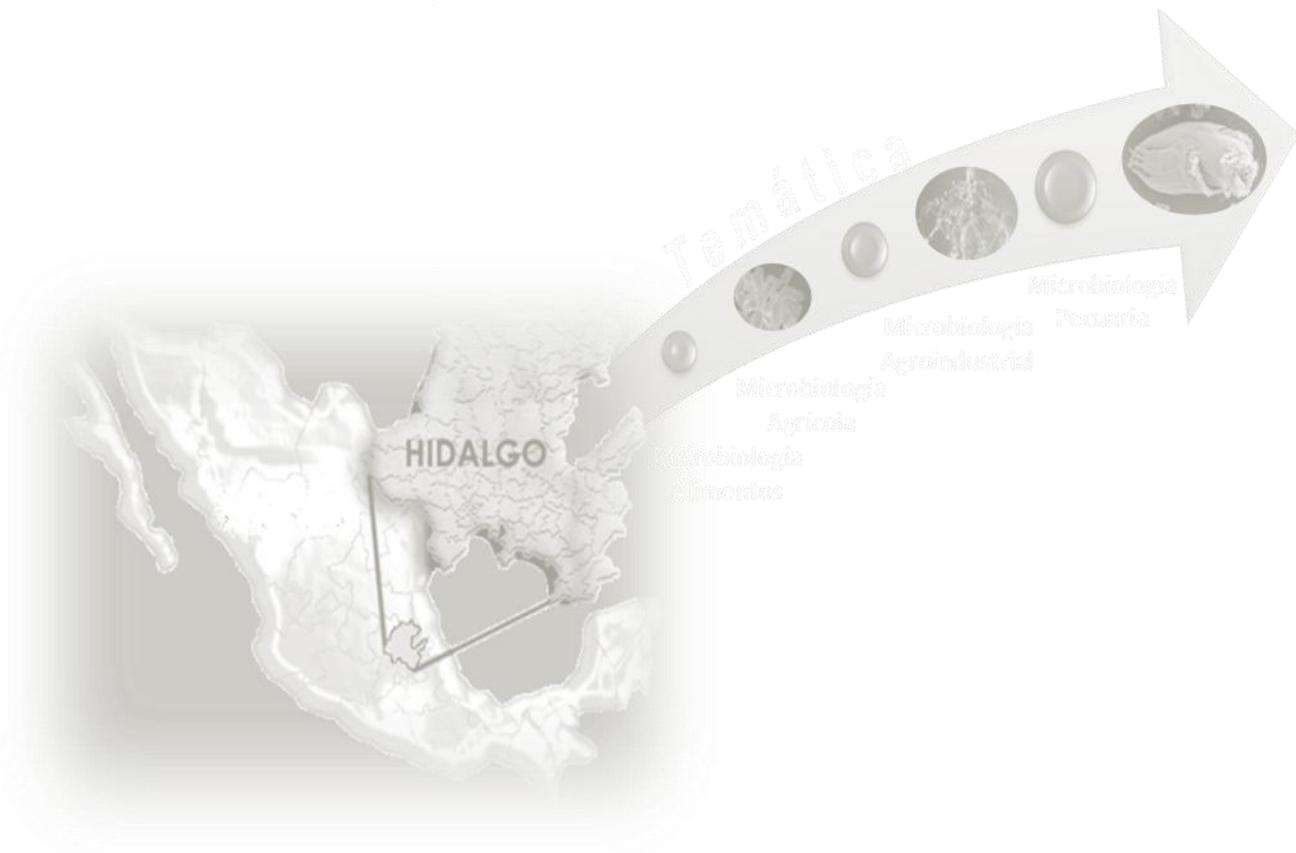


J.Bernal. (2000). *El ensilaje en la alimentación del ganado vacuno*. Bogota Colombia: tercer mundo editoriales.

E.Bernal. (1991). *Pastos y forrajes tropicales*. Colombia Bogota: banco ganadero.

Pilatásing, J. A. (2011). *Universidad Politecnica Salesiana* . Recuperado el 1 de septiembre de 2013, de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1088/15/UPS-CT002046.pdf>

Valero, M. (1996). *Fisica Fundamental 2*. Santa Fe Bogota, Colombia: Norma.





EFFECTO DE IONÓFORO EN LA FERMENTACIÓN DE *Leucaena leucocephala* Y *Cynodon plestostachyus* POR EFECTO DE MICROORGANISMOS DEL RUMEN DE OVINOS

Cortina Espíritu A.¹, García Navarrete A. G.¹, Martínez Tapia Y. E.¹, Vargas Martínez F.¹, Sandoval González L.¹, Miranda Romero L. A.²

¹Departamento De Enseñanza, Investigación Y Servicios en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

flor_vm91@hotmail.com

Resumen:

Se analizó el uso de inóforo en producción de gas de fermentación y digestibilidad *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon plestostachyus* de 35 y 70 días de edad de rebrote (DER), por microorganismos del rumen de ovinos. Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2x2x2 (Forraje, EDR e Ionóforo). Las variables determinadas fueron: volumen total (VT, mL g⁻¹) y eficiencia de producción de gas (Ef; mL g⁻¹ MSD), digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Con modelos matemáticos se estimó la digestibilidad de la materia orgánica (DOM), energía metabolizable (EM) y la energía neta de lactancia (ENL). El ionóforo no tuvo efecto ($P > 0.05$) en ninguna de las variables, pero la EDR y Forraje si afectaron ($P < 0.05$) y hubo interacción ($P < 0.05$) entre ellos para todas las variables, excepto eficiencia (Ef). El tipo de forraje fue más determinante ($P < 0.001$) que la EDR ($P < 0.05$).

Introducción

En los sistemas tropicales los forrajes están en desventaja con relación a los de clima templado, ya que contienen niveles altos de lignina y bajos de nitratos, proteína y carbohidratos no fibrosos, cualidades que hacen que sus valores nutricionales sean medios o bajos, presentan altos rendimientos de biomasa y son más resistentes a las enfermedades. Una relación baja entre los carbohidratos no fibrosos y la proteína degradable reduce la síntesis de proteína microbiana en el rumiante que consume estos pastos. En cuanto a digestibilidad son 15 unidades porcentuales más bajas que los forrajes de clima templado, esto se debe a que tienen una proporción mayor de pared celular, la cual está lignificada. La calidad nutricional de las hojas y de los tallos se reduce más rápidamente con la maduración.



Los sistemas silvopastoriles en el trópico tienen gran ventaja ecológica ya que mediante estos se conserva el suelo y se mejora la diversidad de flora y fauna. En los sistemas pastoriles de nuestro país existe la posibilidad de mejorar la eficiencia de conversión del alimento (ECA) a través de la manipulación química ruminal.

Para compensar las desventajas de los forrajes del trópico se hace el uso de aditivos como lo son los ionóforos, ya que estos hacen que mejore la utilidad del alimento en el rumen. Los ionóforos son sustancias solubles en lípidos, usualmente sintetizadas por microorganismos para transportar iones a través de una bicapa lipídica de membrana celular (Shimada, 1990). Su principal función es modificar las poblaciones normales de microorganismos ruminales. Esto a su vez, altera el patrón normal de fermentación del rúmen, resultando en una menor producción de gas.

Se ha considerado el rumen como un tanque de fermentación provisto de reguladores para el control de condiciones tales como temperatura, agitación y eliminación de subproductos. Los ionóforos son compuestos químicos que poseen un exterior hidrofílico soluble en líquidos y un interior hidrofílico que liga al ion. La actividad biológica de los ionóforos está relacionada con la habilidad para modular los movimientos de cationes como: sodio, potasio y calcio, a través de las membranas celulares.

Materiales y métodos:

Se realizó un experimento de digestibilidad *in vitro* por producción de gas utilizando como sustrato *Leucaena leucocephala* y *Cynodon plestostachyus* de 35 y 70 días de madurez. Se pesó aproximadamente 0.5 g de sustrato y se depositó en 24 frascos de 125 ml previamente etiquetados. Es decir: 4 tratamientos con ionóforos (formado por 2 tratamientos de *Leucaena leucocephala* de 35 y 70 días de corte respectivamente y 2 tratamientos *Cynodon plestostachyus* de 35 y 70 días de corte respectivamente) y 4 que no contenían iónoforo (con las mismas cantidades y tratamientos solo que sin presencia de aditivo), de 3 repeticiones por cada tratamiento. Para corrección de datos se manejaron dos frascos como blancos los cuales no llevaron sustrato. Se agregó 90 ml de inóculo ruminal (líquido ruminal de tres ovinos más 9 partes de solución mineral reducida). Se preparó una solución de ionóforo a partir de 0.15 g de BOVATEC en 100 ml de agua de la cual fue extraído 1 ml y diluido en 9 ml de agua, de la nueva solución se extrajo 1 ml que finalmente fue diluido en 9 ml de agua. De esta última solución fueron colocados 1 ml por cada frasco correspondiente al uso de ionóforo. Los frascos fueron cerrados herméticamente y llevados a baño maría a una temperatura de 39°C durante 24 horas.

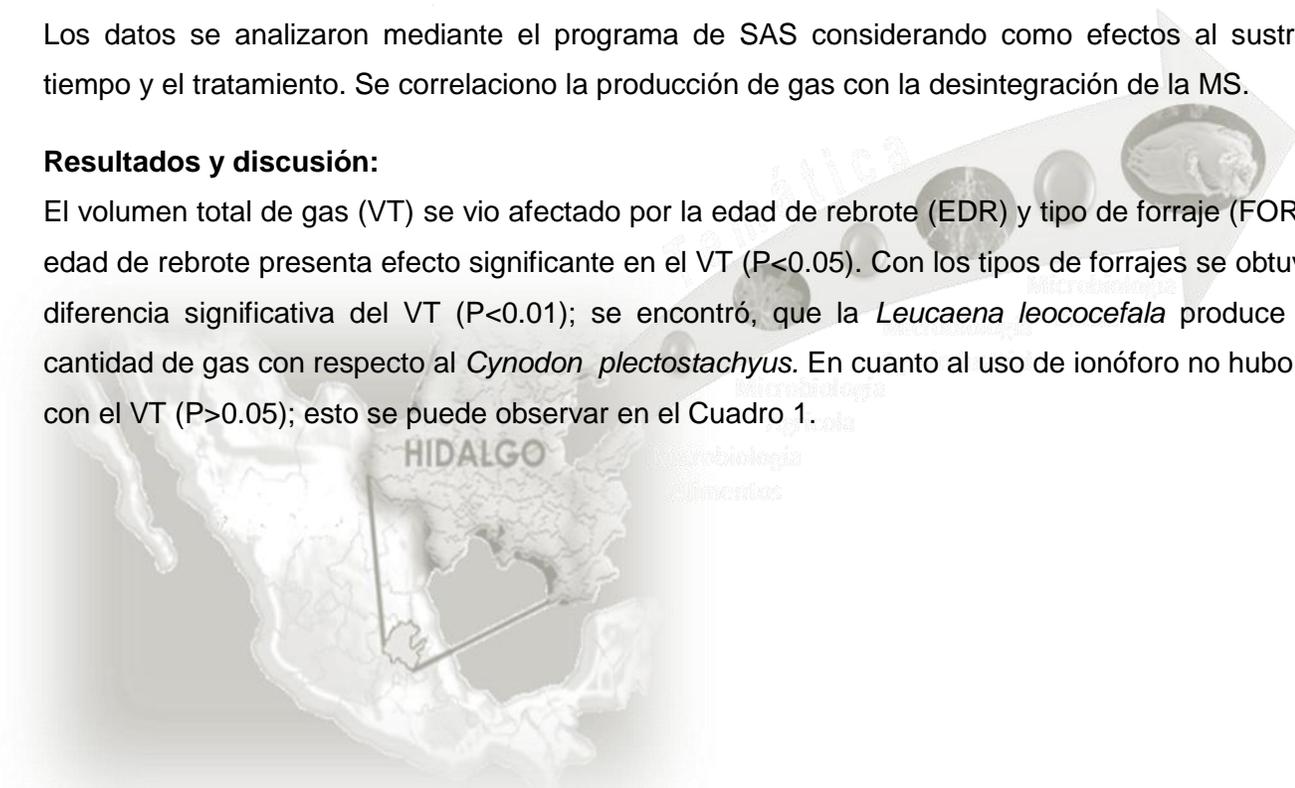


Se recortaron papeles filtro equivalentes al total de unidades experimentales y luego se pesó cada papel, posteriormente se registró la producción de gas de cada unidad experimental con la ayuda de una jeringa en un lapso de 24 horas. Se registró la producción de gas a las 6, 12, 18 y 24 horas respectivamente. Transcurridas las 24 horas se destapó cada frasco para filtrar el sustrato, obteniendo una masa de sustrato fermentada, se dobló el papel filtro para dejarlo secar en la estufa. Una vez seco y enfriado en un desecador nuevamente se volvió a pesar cada papel para obtener la digestibilidad de materia seca.

Los datos se analizaron mediante el programa de SAS considerando como efectos al sustrato, el tiempo y el tratamiento. Se correlaciono la producción de gas con la desintegración de la MS.

Resultados y discusión:

El volumen total de gas (VT) se vio afectado por la edad de rebrote (EDR) y tipo de forraje (FORR). La edad de rebrote presenta efecto significativo en el VT ($P < 0.05$). Con los tipos de forrajes se obtuvo una diferencia significativa del VT ($P < 0.01$); se encontró, que la *Leucaena leucocephala* produce mayor cantidad de gas con respecto al *Cynodon plectostachyus*. En cuanto al uso de ionóforo no hubo efecto con el VT ($P > 0.05$); esto se puede observar en el Cuadro 1.





Cuadro 1: Producción de gas a las 24 h en incubación *in vitro* y evaluación de las variables nutricionales del *Cynodon plectostachyus* y *Leucaena leucocephala*, en ovinos.

Tratamiento			Vt	Ef	DIVMS	DMO	EM	ENL
EDR	FORR	IONO	mL 0.5 g ⁻¹	mL g ⁻¹ MSD	%	%	Mcal kg ⁻¹	Mcal kg ⁻¹
35	C	CON	1.16	126.52	22.66	21.10	2.97	0.62
35	C	SIN	10.16	131.88	23.33	24.30	3.46	0.97
35	L	CON	20.16	140.71	52.00	35.91	5.00	1.42
35	L	SIN	26.16	105.31	52.66	38.05	5.32	1.65
70	C	CON	1.83	144.23	22.66	20.68	2.92	0.64
70	C	SIN	6.00	146.22	24.66	22.16	3.15	0.80
70	L	CON	16.16	104.88	41.33	34.24	4.75	1.27
70	L	SIN	16.16	89.09	42.66	29.61	4.04	0.77
FACTORES			-----p-----					
EDR			0.0094	0.7869	0.0156	0.0034	0.0039	0.0082
FORR			0.0004	0.1540	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
IONO			0.5595	0.5552	0.5232	0.5606	0.5544	0.5417
EDR*FORR			0.0373	-----	0.0072	0.0566	-----	-----
FORR*IONO			0.0690	0.4328	-----	0.0690	0.0684	0.0683

EDR: Edad de rebrote, FORR: Forraje, C: *Cynodon plectostachyus*, L: *Leucaena leucocephala*, IONO: Ionóforo, CON y SIN ionóforo

Vt: Volumen total de gas, Ef: Eficiencia, DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de materia seca, DMO: Digestibilidad de materia orgánica, EM: Energía metabolizable, ENL: Energía neta de lactancia; MSD, materias seca digerida.

EM (MJ/kg DM): $0.157*VT+0.0084*PC+0.022*EE- 0.0081*CEN+1.06$; ENL (MJ/kg DM): $0.096*VT+0.0038*PC+0.000173* EE^2 +0.54$; DMO (%) = $14.88 + 0.889 VT + 0.45PC + 0.0651 CEN$; DIVMS%= $(M_1-M_2/M_1)*100$; Ef= VT/M_1-M_2 ; $1Mcal kg^{-1} = 4.18 MJ kg^{-1}$

VT en 200 mg de MS; M₁: peso inicial de la muestra; M₂: peso final de la muestra.

Se encontró una interacción importante entre EDR*FORR en la DIVMS (P<0.01). Con la EDR de 35 la DIVMS es mayor (P<0.05); mientras que entre los dos tipos de forrajes se obtuvo mayor DIVMS en la *Leucaena leucocephala* (P<0.01). El uso de ionóforo no causo cambios significativos en los FORR con las diferentes EDR para mejorar su DIVMS (P>0.05). Mientras que la digestibilidad de materia orgánica



(DMO), la EDR de 35 tiene mayor digestibilidad ($P < 0.01$) y en el cual la *Leucaena leucocephala* también presenta la mayor DMO ($P < 0.01$); no se encontró efecto del ionóforo para mejorar de manera significativa la digestibilidad de materia orgánica ($P > 0.05$).

Con la edad de rebrote de 35 días se obtuvo la mayor cantidad de energía metabolizable ($P < 0.05$) en comparación al de 70 días; la *Leucaena leucocephala* tiene mayor concentración de energía metabolizable. El uso de ionóforo no presentó efectos significativos en la EM ($P > 0.05$).

Cuadro 2. Composición química de *Cynodon plectostachyus* y *Leucaena leucocephala*

FORR	EDAD	MS%	MO%	CEN	EE	FC	PC	FDN	FDA	HEM	CEL	LIG
C	35.00	94.43	85.90	11.87	0.65	26.11	11.18	63.49	38.24	25.25	26.76	5.31
L	35.00	96.23	85.63	10.60	1.43	11.48	29.28	26.06	18.66	7.39	14.69	4.16
C	70.00	94.73	81.93	12.83	0.55	25.71	9.60	64.37	41.12	23.25	27.03	5.33
L	70.00	95.10	84.07	11.00	1.75	13.85	28.66	30.13	21.84	8.29	15.39	6.93

MS: Materia Seca; MO: Materia Orgánica; CEN: Cenizas; EE: Extracto de Éter; FC: Fibra Cruda; PC: Proteína Cruda; FDN: Fibra Detergente Neutro; FDA: Fibra Detergente Ácido; HEM: Hemicelulosa; CEL: Celulosa; LIG: Lignina. FORR: Forraje; C: *Cynodon plectostachyus*; L: *Leucaena leucocephala*;

A los 35 días de edad de rebrote la energía neta de lactación fue mayor ($P < 0.05$). Se manifestó variabilidad de ENL en cuanto al tipo de forraje ($P < 0.001$), teniendo mayor energía neta de lactancia la *Leucaena leucocephala*.

El efecto de mejorar la digestión con el uso de ionóforo, está relacionada con la habilidad para modular los movimientos de cationes, y así aumentar los rangos de conversión alimenticia.

Conclusión

En este experimento se pudo comprobar que el forraje con una edad de corte de 35 días tuvo una mayor degradación en comparación a uno que fue cortado a los 70 días de edad. En esta etapa las fibras tienen un alto porcentaje de degradabilidad. Los azúcares solubles, las proteínas y los ácidos orgánicos, que conforman el "contenido celular" de todos los tejidos son compuestos de rápida degradación mientras que, los compuestos del forraje de degradación más compleja son los llamados "hidratos de carbono estructurales", los cuales, conforman la pared de las células vegetales y su



degradabilidad es variable dependiendo si se encuentran en tallos, vainas u hojas y, a su vez, de la edad de estas fracciones, por tanto el forraje con una edad de rebrote de 70 días es más difícil de degradar.

El uso de ionóforos en la fermentación de estos forrajes no tuvo efecto alguno ya que se produjo la misma cantidad de gas con o sin el uso de este y las demás variables no se vieron influidas por este.

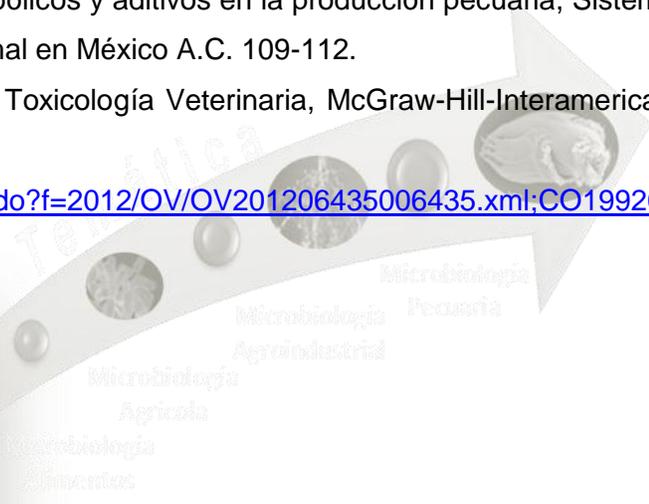
Literatura:

Avila , G. E, Shimada, A.S, México 1990, Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria, Sistemas de educación continua en producción animal en México A.C. 109-112.

Humphreys, D,J, 3era edición, España 1990, Toxicología Veterinaria, McGraw-Hill-Interamericana de España, 202-203.

<http://agris.fao.org/agrissearch/search/display.do?f=2012/OV/OV201206435006435.xml;CO199201180>

80





EFFECTO DE PROBIÓTICOS EN LA FERMENTACIÓN DE *Leucaena leucocephala* Y *Cynodon nlemfuensis* POR CONSORCIOS MICROBIANOS DEL RUMEN DE OVINOS

González Pérez F.¹, Velázquez Hernández S.¹, Sandoval González L.¹ Miranda Romero L. A.²

¹Departamento De Enseñanza, Investigación y Servicios en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

blam_shadow@hotmail.com

Resumen

Se investigó el efecto de un probiótico de levaduras en producción de gas de fermentación y digestibilidad *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis* de 35 y 70 días de edad de rebrote (DER), por consorcios microbianos del rumen de ovinos. Se uso un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2x2x2 (Forraje, EDR y Probiótico). Las variables determinadas fueron: volumen total (VT, mL g⁻¹) y eficiencia de producción de gas (Ef; mL g⁻¹ MSD), digestibilidad de la materias seca (DIVMS). Con modelos matemáticos se estimó la digestibilidad de la materia orgánica (DOM), energía metabolizable (EM) y de lactancia (ENL). El probiótico no tuvo efecto (P>0.05) en ninguna de las variables, pero la EDR y Forraje si afectaron (P<0.05) y hubo interacción (P<0.05) entre ellos para todas las variables, excepto Ef. El tipo de forraje fue más determinante (P<0.001) que la EDR (P<0.05).

Introducción

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que ejercen un efecto benéfico para el tracto intestinal del hospedero, manteniendo y reforzando los mecanismos de defensa ante patógenos sin perturbar las funciones fisiológicas y bioquímicas normales. El término "probiótico" data de 1965, cuando se usó para referirse a cualquier sustancia u organismo que contribuyera al balance microbiano intestinal, principalmente de los animales de granjas, luego lo consideraron un suplemento alimenticio microbiano vivo, más que una sustancia. Los alimentos que contienen un probiótico son considerados alimentos funcionales (Gibson y Roberfroid, 1995). El uso de suplementos como probióticos en rumiantes nos trae muchas ventajas, ya que nos ayuda a estimular el crecimiento de microorganismos benéficos en el rumen como bacterias anaeróbicas, utilizadores de ácido láctico entre otras, también influye en el metabolismo para que las bacterias digieran la fibra para producir el ácido láctico, obteniendo como resultado estabilizar el pH y mejorar la digestión. Otra ventaja que nos da este tipo de aditivo es que el ácido fítico de los cereales como el trigo, se transforma en fósforo



asimilable por la acción de determinados probióticos, la digestibilidad se incrementa, potenciando la actividad de la flora ruminal, en una mejor digestión de la celulosa, así como favorecen el desarrollo de las bacterias productivas de gas metano, con fines netamente productivos.

Material y Métodos

En la planeación del experimento se utilizaron los siguientes sustratos: *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis*, previamente pesados y depositados 0.5 g a cada frasco experimental. Se hicieron 8 tratamientos, es decir: 4 tratamientos con probióticos (formado por 2 tratamientos de *Leucaena leucocephala* de 35 y 70 días de corte respectivamente y 2 tratamientos *Cynodon nlemfuensis* de 35 y 70 días de corte respectivamente) y 4 que no contenían probióticos (con las mismas cantidades y tratamientos solo que sin presencia de aditivo), de 3 repeticiones por tratamiento, se adicionó la cantidad 0.005 g de probiótico por frasco, generando en total 24 unidades experimentales, más dos blancos.

La unidad experimental simula ser el rumen del ovino, el cual es un frasco de 125 ml, agregando 90 ml de inóculo ruminal, compuesto formado por: 1 parte de líquido ruminal más 9 partes de solución mineral reducida previamente preparada con 195 ml de solución mineral 1, solución mineral 2, 130 ml carbonato de Na al 8%, 2028 ml de agua destilada, 52 ml de solución reductora y 5 gotas de rezasurina al 5%, se selló cada frasco bajo un flujo de CO₂ dejando a incubación a 39° C en baño María (hora 0), se recortaron papeles filtro equivalente al total de unidades experimentales y luego se pesó cada papel filtro, posteriormente se registró la producción de gas de cada unidad experimental con la ayuda de un manómetro cada 6 horas, en un lapso de 24 horas.

Una vez registrado los datos de producción de gas y terminada la incubación se destapó cada frasco para filtrar el sustrato, obteniendo una masa de sustrato fermentada, se dobló el papel filtro para dejarlo secar en la estufa. Una vez seco y enfriado en un desecador nuevamente se volvió a pesar cada papel para calcular la digestibilidad de materia seca.

Las variables obtenidas fueron plasmadas en un cuadro de Excel, y fueron las siguientes: Digestibilidad in vitro de Materia Seca (%), Volumen Total de Gas (ml), Eficiencia ml/g, Digestibilidad de Materia Orgánica (%), Energía Metabolizable (Mcal/kg) y Energía Neta Lactante (Mcal/kg). Con los datos de los tratamientos y repeticiones de la unidad experimental se introdujo en un Diseño factorial 2x2x2 del Programa SAS, mediante una prueba de medias con (TUKEY LINES;) para concluir que tan eficiente podría ser el uso de probióticos en la alimentación de los ovinos y los efectos en las variables.



Resultados y discusiones:

El volumen total de gas (VT) por gramo de materia seca (MS) cambio por efecto de la edad de rebrote (EDR), tipo de forraje (FORR).

La edad de rebrote presenta efecto significativo en el VT ($P < 0.05$). Con los tipos de forrajes se obtuvo una diferencia significativa del VT ($P < 0.01$); se encontró, que la *Leucaena leucocephala* produce mayor cantidad de gas con respecto al *Cynodon nlemfuensis*. En cuanto al uso de probiótico no hubo significancia con el VT ($P > 0.05$); por lo tanto se observó una interacción EDR*FORR respecto al VT ($P < 0.01$) (Como se puede observar en el Cuadro 1).

No hubo efecto de los tratamientos ($P > 0.005$) sobre la Ef y tampoco interacciones. Se encontró una interacción importante entre EDR*FORR en la DIVMS ($P < 0.01$). Con la EDR de 35 la DIVMS es mayor ($P < 0.05$); mientras que en los forrajes se obtuvo mayor DIMS en la *Leucaena leucocephala* ($P < 0.01$). El uso de probiótico no causo cambios significativos en los FORR con las diferentes EDR para mejorar su DIVMS ($P > 0.05$). Mientras que la digestibilidad de materia orgánica (DMO), se obtuvo la misma interacción que en la DIVMS ($P < 0.01$); adonde la EDR de 35 tiene mayor digestibilidad de materia orgánica ($P < 0.01$) y en el cual la *Leucaena leucocephala* también presenta la mayor DMO ($P < 0.01$); no se encontró efecto del probiótico para mejorar de manera significativa la digestibilidad de materia orgánica ($P > 0.05$).



Cuadro 1: Producción de gas a las 24 h en incubación *in vitro* y evaluación de las variables nutricionales del *Cynodon nlemfuensis* y *Leucaena leucocephala*, en ovinos.

Tratamiento			Vt	Ef	DIVMS	DMO	EM	ENL
EDR	FORR	PROB	mL 0.5 g ⁻¹	mL g ⁻¹ MSD	%	%	Mcal kg ⁻¹	Mcal kg ⁻¹
35	C	CON	14.00	126.53	22.67	25.66	0.88	0.27
35	C	SIN	14.33	131.88	23.33	25.78	0.88	0.27
35	L	CON	36.00	140.71	52.00	41.55	1.40	0.49
35	L	SIN	27.33	105.31	52.67	38.47	1.29	0.41
70	C	CON	15.00	144.23	22.67	25.37	0.87	0.27
70	C	SIN	17.67	146.23	24.67	26.32	0.91	0.30
70	L	CON	21.67	104.88	41.33	36.20	1.21	0.36
70	L	SIN	19.00	89.09	42.67	35.25	1.17	0.33
FACTORES			-----p-----					
EDR			0.0377	0.7869	0.0156	0.0105	0.0140	0.0343
FORR			<.0001	0.1540	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
PROB			0.3183	0.5552	0.5232	0.3184	0.3310	0.3041
EDR*FORR			0.0042	XXX	0.0072	0.0074	0.0073	0.0055

EDR: Edad de rebrote, FORR: Forraje, C: *Cynodon nlemfuensis*, L: *Leucaena leucocephala*,
PROB: Probiótico, CON y SIN probiótico.

Vt: Volumen total de gas, Ef: Eficiencia, DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de materia seca, DMO: Digestibilidad de materia orgánica, EM: Energía metabolizable, ENL: Energía neta de lactancia; MSD, materias seca digerida.

EM (MJ/kg DM): $0.157*VT+0.0084*PC+0.022*EE- 0.0081*CEN+1.06$; ENL (MJ/kg DM): $0.096*VT+0.0038*PC+0.000173* EE^2 +0.54$; DMO (%) = $14.88 + 0.889 VT + 0.45PC + 0.0651 CEN$; $DIVMS\% = (M_1 - M_2 / M_1) * 100$; $Ef = VT / M_1 - M_2$; $1Mcal\ kg^{-1} = 4.18\ MJ\ kg^{-1}$

VT en 200 mg de MS; M₁: peso inicial de la muestra; M₂: peso final de la muestra.



Cuadro2. Composición química de *Cynodon nlemfuensis* y *Leucaena leucocephala*

FORR	EDAD	MS%	MO%	CEN	EE	FC	PC	FDN	FDA	HEM	CEL	LIG
C	35.00	94.43	85.90	11.87	0.65	26.11	11.18	63.49	38.24	25.25	26.76	5.31
L	35.00	96.23	85.63	10.60	1.43	11.48	29.28	26.06	18.66	7.39	14.69	4.16
C	70.00	94.73	81.93	12.83	0.55	25.71	9.60	64.37	41.12	23.25	27.03	5.33
L	70.00	95.10	84.07	11.00	1.75	13.85	28.66	30.13	21.84	8.29	15.39	6.93

MS: Materia Seca; MO: Materia Orgánica; CEN: Cenizas; EE: Extracto de Éter; FC: Fibra Cruda; PC: Proteína Cruda; FDN: Fibra Detergente Neutro; FDA: Fibra Detergente Ácido; HEM: Hemicelulosa; CEL: Celulosa; LIG: Lignina. FORR: Forraje; C: *Cynodon nlemfuensis*; L: *Leucaena leucocephala*;

En cuanto a la energía metabolizable (EM), arrojó la misma interacción EDR*FORR con un alto valor de significancia ($P < 0.01$). Con la edad de rebrote de 35 días se obtuvo la mayor cantidad de energía metabolizable ($P < 0.05$) en comparación al de 70 días de edad de rebrote; la *Leucaena leucocephala* tiene mayor concentración de energía metabolizable. El uso de probiótico no presentó efectos significativos en la EM ($P > 0.05$).

Se halló interacción entre EDR*FORR en la energía neta de lactación ($P > 0.01$); a 35 días de edad de rebrote la energía neta de lactación fue mayor ($P < 0.05$). Se manifestó variabilidad de ENL en cuanto al tipo de forraje ($P < 0.001$), teniendo mayor energía neta de lactancia la *Leucaena leucocephala*.

El efecto de mejorar la digestión con el uso de probiótico, está fundamentada en que ejerce un efecto benéfico para el tracto intestinal, y así aumentar los rangos de conversión alimenticia, ya que los alimentos que contienen un probiótico son considerados alimentos funcionales (Gibson y Roberfroid, 1995).

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, se concluye que el uso de probiótico no influye de manera significativa en el aprovechamiento de los forrajes, en la gramínea disminuye el volumen total de gas (VT), dando como resultado que disminuyan los demás factores, pero, en proporciones mínimas. Mientras que en la leguminosa, se portó de manera contraria, aumentando en proporciones mínimas todos los factores estudiados.

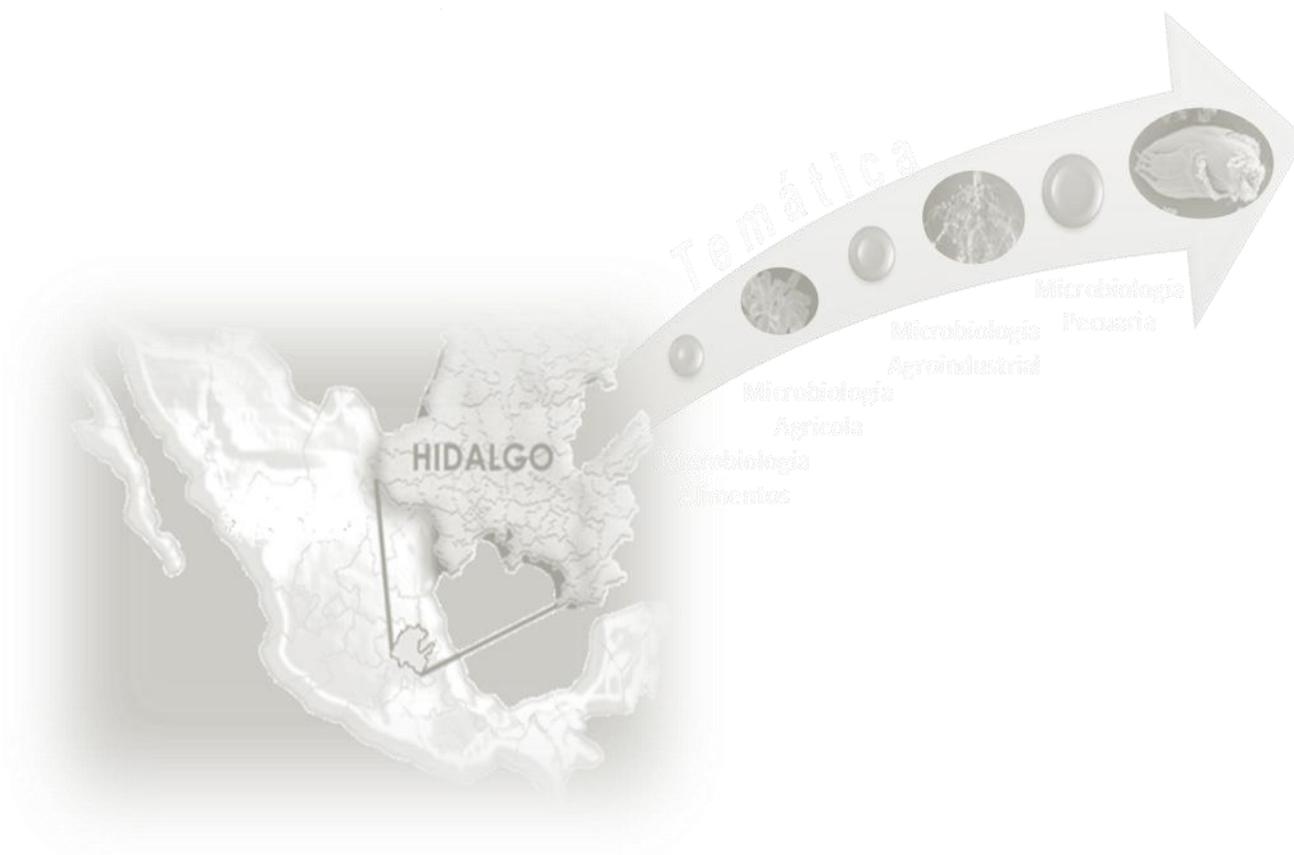


Literatura citada

Bourgeois C, Larpent J. 1995. Microbiología alimentaria. Editorial Acribia. S.A. Volumen II. Zaragoza – España.

Fuller R. 1989. A review: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.

Gibson G, Roberfroid M. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125, 1401-1412.





CARACTERÍSTICAS DE ENSILADOS DE MARALFALFA (*Pennisetum sp*) FRESCA Y PREMARCHITADA AL AMBIENTE

Martínez-García E.¹, Hernández-Martínez A.¹, Ruiz-Molina A.¹, Hernández-Hernández F.², Miranda Romero L. A.²

¹ Departamento de Zootecnia, ² Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

eduardo.martinezqr26@gmail.com

Resumen

Se determinó el efecto de marchitamiento a 0, 1.5 y 3 h al ambiente (T1, T2 y T3 respectivamente) en el ensilado de pasto maralfalfa (*Pennisetum sp*). Se elaboraron microsilos en bolsa con 2.0 kg de forraje. Las variables evaluadas fueron la densidad (kg m^{-3}), características organolépticas (color, olor, textura y humedad), pH, materia seca (%MS) y bacterias ácido lácticas (BAL). Cada tratamiento se hizo por triplicado. El tratamiento 3 tuvo un mayor contenido de MS (36.01%) en comparación a T1 y T2 (17.85% y 24.62% respectivamente), pero una menor densidad (331.67 kg m^{-3}) ($P < 0.05$). El pH (9.2) fue igual entre tratamientos ($P < 0.05$). El conteo de BAL disminuyó en función al tiempo de marchitamiento sin llegar a ser estadísticamente diferentes entre tratamientos ($P < 0.05$). El marchitamiento afectó positivamente la humedad y el color del ensilado. Se concluye que el marchitamiento al ambiente por 3 h es un método para regular el contenido de MS antes de ensilar lo que favorece que se reduzca la humedad en el ensilado final, pero no afecta significativamente el resto de indicadores de la calidad del proceso de ensilaje del pasto maralfalfa (*Pennisetum sp.*).

Palabras clave: Características organolépticas, marchitamiento, bacterias ácido lácticas.

Introducción

A nivel de campo el productor siempre ha buscado dar el mejor aprovechamiento del forraje en la época de cosecha y le significa siempre un reto el almacenamiento del mismo para la época de estiaje, sin embargo, mediante el proceso de ensilaje se puede obtener forraje de calidad todo el año (Watson, 1979). El ensilaje es un método de conservación de forrajes o subproductos agrícolas con alto contenido de humedad (60-70 %), mediante la compactación, exclusión del aire para propiciar un medio anaeróbico que permite el desarrollo de bacterias que acidifican el forraje (Cobos, 1989). El ensilaje es un proceso dinámico donde intervienen factores enzimáticos y microbianos. La conjugación



de ambos determinan el éxito o el fracaso del mismo, estos fenómenos pueden agruparse en dos fases: 1) fase de respiración o fase aeróbica y 2) fase de acidificación del ensilaje o fase anaeróbica (Ojeda, 1991). La maralfalfa (*Pennisetum* sp), es un pasto considerado de alto valor proteico (21% PC), además de que tiene un alto contenido de carbohidratos solubles; sin embargo, las investigaciones demuestran que este pasto apenas alcanza entre un 13% de proteína cruda y un bajo contenido de carbohidratos; con un contenido de humedad cerca de 80% (UTA, 2011). Debido a las características mencionadas se dificulta el ensilaje de este pasto. Como alternativas para poder ensilarse se pueden agregar aditivos que reduzcan la humedad o dejar marchitar al ambiente. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del marchitamiento del pasto maralfalfa (*Pennisetum* sp), antes del proceso de ensilaje.

Materiales y métodos

Se muestreó maralfalfa de una parcela productiva en Tlacolula, Veracruz. El forraje fue picado y se depositaron 2.0 kg en bolsas de plástico negro (microsilos). El forraje fue compactado manualmente y se dejaron fermentar por 150 días. Se evaluaron tres tratamientos de maralfalfa correspondientes al tiempo de premarchitamiento: T1: 0 h, T2:1.5 h y T3: 3 h, con tres repeticiones por tratamiento. La densidad de cada microsilos fue determinada mediante la relación peso/volumen, el peso fue medido en una balanza granataria y el volumen por desplazamiento de agua. Una vez abiertos los microsilos se tomaron tres muestras para determinar características organolépticas de color, olor, textura y humedad (J.Bernal, 2000; Ojeda, 2000); MS, pH y BAL. La MS se determinó por medio de deshidratación a 67 °C por 48 h por secado directo en una estufa, el pH mediante un potenciómetro, haciendo una mezcla 2:1 de agua y ensilado. El conteo de bacterias ácido lácticas fue por el método de “número más probable” (NMP) propuesto por Woormer (1994), primero se hicieron diluciones seriadas en tubos de ensaye de los cuales se inocularon las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 en placas de rogosa-agar que fueron incubadas en anaerobiosis a 37 °C por 72 h.

Los datos fueron analizados mediante el procedimiento ANOVA ($P < 0.05$) y la prueba del rango múltiple de Duncan ($P = 0.1$) del paquete estadístico SAS™.



Resultados y discusión

Cuadro 1. Efecto de marchitamiento en el pH, MS, densidad y población de bacterias ácido lácticas del ensilado de maralfalfa (*Pennisetum* sp).

Marchitamiento (h)	pH	MS (%)	Densidad (kg m ⁻³)	BAL (Log cel g ⁻¹ BH)
0.0	9.0 ^b	17.85 ^b	475.67 ^b	10.24 ^a
1.5	9.2 ^{ab}	24.62 ^b	424.33 ^{ab}	9.68 ^a
3.0	9.4 ^a	36.01 ^a	331.67 ^a	8.46 ^a

^{a,b,c} Medidas con diferente literal en la misma columna son diferentes (P<0.1).

pH: pH final, **MS:** materia seca, **BAL:** bacterias ácido lácticas.

El cuadro muestra que los valores de pH son superiores a lo que corresponde un buen ensilado, que debe ser entre 4 y 5 cuando la MS al momento de ensilar es entre 20% y 30% (Neiker-Derio, 2002). Estos resultados de pH pudieron ser por presencia de oxígeno a causa de una compactación débil reflejada en el promedio de la densidad para todos los ensilados (410.5 kg m⁻³). En este sentido aunque hay diferencia por efecto del marchitamiento (P=0.1), en general el marchitamiento por sí mismo no mejora el pH final de maralfalfa.

El contenido de MS tiene mayor significancia al incrementar las horas de marchitamiento puesto que disminuye la humedad del forraje, sin embargo este incremento en el porcentaje de MS reduce la facilidad de compactación que se observó en la densidad de los tratamientos T1 y T3.

Para el conteo de BAL no hay diferencias entre tratamientos (P=0.1), aunque se puede identificar cierta tendencia de disminución de la población de BAL a mayor tiempo de marchitamiento.

Cuadro 2. Efecto de marchitamiento sobre las características organolépticas del ensilado de maralfalfa.

Marchitamiento (h)	Color	Olor	Textura	Humedad
0.0	Malo	Malo	Regular	Regular
1.5	Regular	Malo	Regular	Regular
3.0	Regular	Malo	Regular	Bueno

En el Cuadro 2 se observa que al incrementar el premarchitamiento del forraje, mejora la calidad en el color y la humedad del ensilaje, no así en el olor y la textura. De acuerdo a la regresión de las variables del cuadro 1 con el tiempo de marchitamiento, el pH incrementa 0.133 unidades, la materia



seca disminuye en 6%, la densidad disminuye en 48 kg m⁻³ y las BAL disminuyen en 0.59 unidades Log₁₀ por hora de marchitamiento de la maralfalfa.

Conclusión

Bajo las condiciones de este estudio podemos establecer que el marchitamiento al ambiente no influye en la calidad del ensilaje de maralfalfa. Aunque también podemos resaltar que las condiciones bajo las cuales se elaboraron los microsilos no fueron las adecuadas.

Literatura citada

- Cobos P., M. A. 1989. Tecnología de ensilados. Universidad Autónoma Chapingo.
- J. Bernal. (2000). El ensilaje en la alimentación del ganado vacuno. Tercer mundo editoriales. Bogotá, Colombia.
- Neiker-Derio. 2002. Interpretación de análisis de ensilados. <http://www.fraisoro.net/FraisoroAtariaDoku/recomenvaloraciondesilos.pdf>. Consultada el 30 de septiembre del 2013.
- Ojeda G. Félix, 1991, Conservación de forrajes, Editorial Pueblo y Educación, playa Ciudad de la Habana.
- Ojeda F. 2000. Técnicas de cosecha y ensilado. In: Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. L.t' Mannelje (ed.) Roma 1 de septiembre a 15 diciembre 1999. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp: 133-140.
- UTA, 2011, La utilización de maralfalfa como alimento principal en la explotación bovina de carne, Ceballos, Ecuador.
- Watson, J., A.M. Smith, 1979, el ensilaje, compañía editorial, S.A., Calz. De Tlalpan, No. 4620, México, DF.
- Woomer, P.L. 1994. Most probable number counts. In: Weaver: R.W.; J.S. Angle; P.S. Bottomeley (Eds). Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Book Series, No 5.pp. 59-79.



TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS COMO MÉTODO RÁPIDO EN CAMPO PARA ESTIMAR EL VALOR NUTRITIVO DE FORRAJES

Atlíqueno-Mota E.¹, Sánchez-López A.¹, Terán-Rivera L.E.¹, Cárdenas-Ramírez L.², Miranda Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma de Chapingo.

Resumen

La técnica de producción de gas por ser un método sensible, preciso, práctico y económico, es factible de utilizarse como un método microbiológico rápido en campo, para determinar el valor nutritivo de los alimentos y su potencial contaminante. Se midió el volumen total (VT) de gas, el volumen de CO₂, volumen de gas residual (CH₄+otros) y la digestibilidad verdadera a 24 h de incubación. Con el VT, el análisis bromatológico y el uso de modelos matemáticos, se estimó la EM, DMO, ENL y biomasa microbiana (BM) de maíz, alfalfa y pasto orchard, del un sistema de producción de leche en pastoreo. Al comparar los resultados para cada tipo de forraje, se encontró que los modelos y el VT de gas subestiman los valores de EM, ENL y DMO, pero permiten predecir el potencial de fermentación y contaminación por gases, así como la biomasa microbiana generada. Se requieren más investigaciones al respecto, adecuar la técnica a las condiciones de campo y desarrollar modelos matemáticos mas acorde a los forrajes y condiciones de producción de los sistemas en México.

Palabras clave: *digestibilidad in vitro, calidad del forraje, técnica microbiológica.*

Introducción

La determinación de la digestibilidad de los forrajes es útil en investigación pecuaria, ya que permite predecir el comportamiento productivo de los animales cuando se les brinda una determinada dieta (McDonald *et al.*, 2006). La técnica de digestibilidad *in vitro* es un procedimiento comúnmente utilizado para determinar la digestibilidad; sin embargo, la variabilidad producida por la fuente de inóculo y calidad del mismo, son la causa principal de variación de resultados en este procedimiento (Bochi-Brun *et al.*, 1999). Las técnicas *in vitro* han tenido un desarrollo muy rápido y amplio en los últimos años; su aplicación indiscriminada, puede llevar a extrapolar indebidamente condiciones totalmente de laboratorio a resultados de campo, provocando una imposibilidad por parte del productor realizar este tipo de determinaciones en el mismos sistema de producción. El objetivo de este estudio fue



determinar la calidad de tres forrajes cultivados en un sistema de producción de leche en pastoreo mediante una técnica microbiológica rápida en campo.

Materiales y métodos

Se realizó un experimento de digestibilidad *in vitro* como una técnica microbiológica rápida en campo, utilizando tres forrajes: alfalfa (*Medicago sativa*), orchard (*Dactylis glomerata*) y maíz (*Zea maíz*), que fueron colectadas en el módulo de producción de leche en pastoreo de la Universidad Autónoma Chapingo. Las muestras fueron picadas y secadas en una deshidratadora de frutas casera marca oster modelo numero FPSTFD0101 durante 15 horas, ya secas las muestras se procedió a molerlas en un molino de café casero, las muestras de cada forraje se tamizaron para su homogenización. Se peso aproximadamente 0.2 g de sustrato, que se deposito en frascos de vidrio color ámbar de 60 ml; a cada frasco se les agrego 20 ml de solución mineral reductora; luego de esto se procedió a cerrarlos con un tapón de goma y aro de aluminio. Los frascos se inocularon con 10 ml de líquido ruminal, el cual se obtuvo de dos ovinos de la raza Suffolk con ayuda de una sonda y bomba de vacío, el cual se hizo una mezcla compuesta y se filtró con una gasa de 8 dobleces. Se utilizo un diseño completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones cada uno, obteniendo nueve unidades experimentales, más dos blancos. Se utilizó la prueba de digestibilidad *in vitro* descrita por Tilley y Terry (1963); se determino el volumen total de gas a 24 h, digestibilidad verdadera y biomasa microbiana. Los datos se procesaron en hoja de cálculo electrónica del programa Excel 4.0. La comparación de medias se realizaron mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$). Todo lo anterior se realizo con el paquete estadístico SAS (1994).

Resultados y discusión

Se encontró que el forraje de maíz es el más eficiente en cuanto a fermentación con base a producción de gas; también se observo que tuvo la mayor ENL lo cual favorece una mayor producción de leche. Respecto, a la digestibilidad la alfalfa presento la mayor y de igual manera la mayor energía metabolizable de acuerdo a la fórmula utilizada (Getachew et al., 2002); pero en comparación con la formula expuesta por (Menke and Steingass, 1987) el maíz presento la mayor energía metabolizable. También se encontró que el forraje que presento la mayor DMO según (Getachew et al., 2002) fue la alfalfa; pero en comparación con (Menke and Steingass, 1987) fue el maíz que presento la mayor DMO. Por otra parte el forraje con mayor aprovechamiento es la alfalfa por su alta digestibilidad de la materia orgánica, además es el forraje con un mayor índice de degradación de biomasa microbiana. Únicamente se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos para las variables VR y CO₂ ($P < 0.05$) (Cuadro 1).



Cuadro 1. Variables fermentativas, de digestibilidad y nutrimentales de tres forrajes medidas con la técnica de producción de gas y estimadas con modelos matemáticos

Forraje	VT	VR	VCO ₂	DV	EM1	EM2	ENL	DMO 1	DMO 2	BM
	-----	mL	200 mg-1 MS	-----	-----	Mcal kg ⁻¹ MS	-----	-----	%	-----
			--			--		--		Mg
Maíz	19.0 ^a	-2.18 ^b	102.18 ^a	73.67 ^a	1.22 ^a	1.17 ^a	0.58 ^a	34.16 ^a	34.04 ^a	105.5 ^a
Orchard	10.0 ^a	20.96 ^a	79.04 ^b	70.0 ^a	1.06 ^a	0.87 ^a	0.37 ^a	30.22 ^a	26.31 ^a	118.0 ^a
Alfalfa	14.3 ^a	20.95 ^a	79.04 ^b	86.50 ^a	1.27 ^a	1.02 ^a	0.47 ^a	36.33 ^a	20.48 ^a	141.4 ^a

^{a,b,c}Medias con literal igual en la misma columna son diferentes (Tukey, P<0.05)

VT, volumen total; VR, volumen residual; VCO₂, volumen de CO₂; DV, digestibilidad verdadera; EM1 y EM2, energía metabolizable; DMO1 y DMO2, digestibilidad de la materia orgánica estimadas con dos modelos matemáticos (Getachew *et al.*, 2002 y Menke and Steingass, 1987); ENL, energía neta de lactancia (Menke and Steingass, 1987); BM= biomasa microbiana

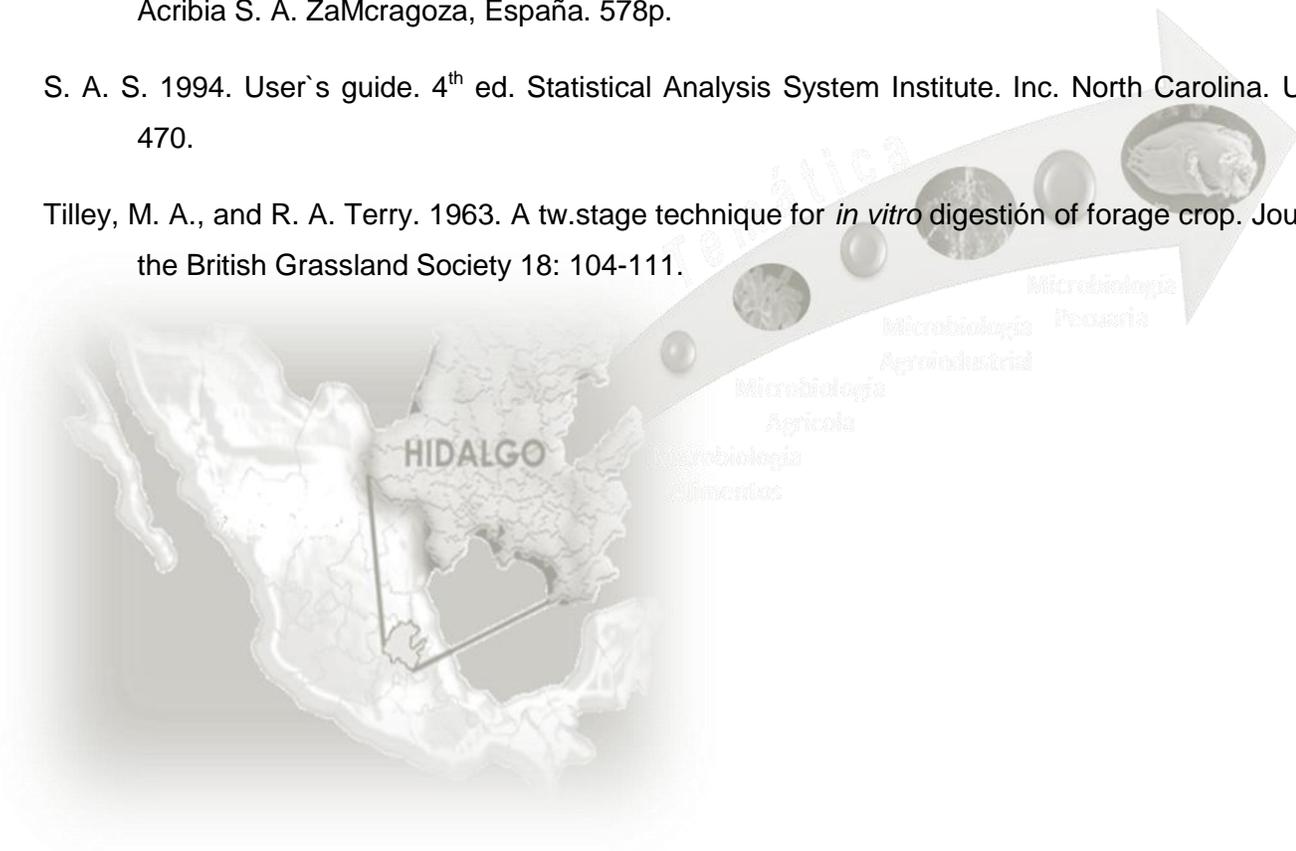
Conclusión

Bajo las condiciones de este estudio, se concluye que el maíz y la alfalfa son los forrajes que presentan una mejor digestibilidad de acuerdo a su producción de gas. La técnica de producción de gas sumada a la digestibilidad nos permite encontrar y analizar diferencias entre diferentes tipos de forrajes, ya que podemos describir el proceso de degradación por algunas bacterias más detallado y tener una idea más clara de la eficiencia de estos. Esta técnica es muy favorable para el análisis de forrajes, pues la podemos llevar a cabo en los lugares de trabajo sin necesidad de usar un laboratorio, ciertamente presenta deficiencias de luz eléctrica, debido a que en algunos ranchos no se cuentan con ella o algunos fenómenos naturales también pueden dañarla.



Literatura citada

- Araujo F., O., y J. Vergara L. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 15: 133-140.
- Bochi-Brum, O., M. D. Carro, C. Valdes, J. S. González, and S. López. 1999. In vitro digestibility of forages and concentraces: Effect of diet on donor animals. Archivos de Zootecnia 48: 51-61.
- McDonald, P. R., J. F. D. Greenhalgh, R. A. Edwards, y C. A. Morgan. 2006. Nutrición Animal. 6ª. Ed. Acirbia S. A. Zamcragoza, España. 578p.
- S. A. S. 1994. User`s guide. 4th ed. Statistical Analysis System Institute. Inc. North Carolina. USA. P 470.
- Tilley, M. A., and R. A. Terry. 1963. A tw.stage technique for *in vitro* digestión of forage crop. Journal of the British Grassland Society 18: 104-111.





FERMENTACIÓN AEROBICA DE NOPAL INOCULADO Y AIREADO A DOS MANEJOS DE TIEMPO-INTERVALO

Aguilar Bárcenas J. A.¹, Rodríguez López F.¹, Ubaldo Vázquez L.¹, Vázquez Mendoza P.², Miranda Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza e Investigación y Servicio en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. De México

fredy_1409@hotmail.com

Resumen

El proceso de fermentación aeróbica puede ser una estrategia para mejorar la calidad nutritiva del nopal, por lo que el objetivo fue determinar si la inoculación y el tiempo de aireación afectan el crecimiento de microorganismos. Se probaron cuatro tratamientos que consistieron en dos fuentes de nopal (FN; estéril y no estéril) y dos manejos de aireación (TA, cada 4 h por 15 min y cada 8 h por 30 min) y se determinaron la población de bacterias ácido lácticas (BAL) y hongos y levaduras (HL), el pH y características organolépticas, antes y después de 48 h de incubación (PER) a temperatura ambiente. El diseño fue completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial 2x2x2 (FN, TA y PER). Las interacciones no fueron significativas ($P > 0.05$). El nopal no estéril incrementó ($P < 0.05$) la población de HL y redujo ($P < 0.05$) el pH. Las tres variables fueron afectadas ($P < 0.05$) TA y PER. Se concluye que la fuente de nopal no estéril favorece la población de hongos y levaduras, sin embargo, en el caso de las bacterias ácido lácticas, éstas se mantuvieron constantes en ambas fuentes de nopal. El tiempo de aireación de cada 8 horas por 30 minutos si favorece el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras y las características organolépticas.

Palabras clave: Fermentación, tiempo de aireación, fuente de nopal, inoculante

Introducción

La producción de nopal en México se estima en 600 mil toneladas anuales (Morán, 2013) y se distribuye en 27 estados, 95% en el centro-norte del país (Anaya y Pérez, 2008). Una de las prácticas comunes que se realiza en la plantaciones de nopal es la poda, utilizada para obtener mayores rendimientos, como son formación, sanidad, rejuvenecimiento y estimulación de renuevos, de ella se generan grandes cantidades de material vegetativo (10 T h^{-1}) (Aranda *et al.*, 2009), debido a ello su



utilización a través de la fermentación aeróbica puede ser una estrategia para mejorar la calidad nutritiva y emplearse en la alimentación animal.

La fermentación es el proceso aeróbico continuo (24 horas) con el que se obtiene un producto alto en proteína (3.36-24.86 % PC), gracias al uso de inóculos microbianos (bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras) (Aranda, 2006). El objetivo del presente estudio fue determinar si la fuente de nopal y el tiempo de aireación son factores que afectan el crecimiento de microorganismos.

Material y Métodos

Se realizó un experimento de fermentación aeróbica de nopal, utilizando como sustrato pencas de nopal de la variedad COPENA F1. Las fuentes de nopal utilizados fueron estéril (esterilización a través de la autoclave a 15 lb, 121°C durante 15') y no esterilizado (fresco).

Se emplearon cuatro tratamientos que consistieron en dos fuentes de nopal (estéril y no estéril) y dos fuentes de aireación (15 y 30 minutos cada 4 y 8 horas respectivamente), presentando una cantidad específica de inóculos (levaduras (Diamond V), BAL (BIOSILE) y *Aspergillus orizae*) y minerales (superfosfato de calcio simple, urea, sulfato de amonio). Las variables en los tratamientos son tiempo de aireación y fuente de nopal con el fin de observar su efecto en el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL), población de hongos y levaduras (H y L).

Cada tratamiento presentó 3 repeticiones obteniendo un total de 24 unidades experimentales. Al inicio (0 hr) y al final (48 hr) de la fermentación, de cada unidad experimental se tomó una alícuota de 10 ml a la cual se le midieron las características organolépticas (color y olor), pH y microbiológicas (células ml⁻¹ de bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras), éstas últimas mediante el método del número más probable (Best, 1990). El medio de cultivo para bacterias ácido lácticas fue RMS, teniendo condiciones anaerobias y temperatura de 37°C por 48 horas. El medio para el cultivo de hongos y levaduras fue PDA, el cual se mantuvo a temperatura ambiente por 48 horas.

Los datos se analizaron utilizando procedimiento GLM del paquete estadístico SAS, en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2X2, con cuatro tratamientos y tres repeticiones cada uno.

Resultados y Discusión

Las variables organolépticas observadas (olor y color) fueron diferentes al inicio y al final del experimento debido al proceso de fermentación. La variable olor en un tiempo inicial tenía olor dulce y



para el tiempo final este tuvo un cambio a ácido, por otro lado la variable color tenía un color verde fuerte en tiempo inicial, cambiando de color en el tiempo final a un verde con tonalidad café.

La cantidad de bacterias ácido lácticas (células por ml^{-1} de nopal) no presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 1), lo que indica que sin importar el tratamiento aplicado al nopal la población no se ve afectada, no así para el tiempo de aireación donde se presentaron diferencias ($P < 0.05$), siendo el tiempo de aireación de 30 minutos el que favoreció el crecimiento de la población de bacterias. Las interacciones fuente de nopal esterilizado con tiempo de aireación de 15 y 30 minutos y fuente de nopal no esterilizado con tiempo de aireación de 15 y 30 minutos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$), indicando que la población de bacterias se mantiene constante durante el proceso de fermentación, presentando un comportamiento similar en la población de hongos y levaduras.

Cuadro 1. Resultados del conteo de crecimiento de bacterias, hongos, levaduras y variable de pH

Período	Fuente de Nopal	Tiempo de Aireación	pH	BAL Log_{10}	HL Log_{10}
0 h	Estéril	15min/4h	4.50	6.4608	6.2474
0 h	Estéril	30 min/8 h	4.50	6.4927	6.5293
0 h	No Estéril	15 min/4 h	4.46	6.1625	7.0119
0 h	No Estéril	30 min/8 h	4.46	6.6971	7.2973
48 h	Estéril	15 min/4 h	4.60	9.9071	8.0985
48 h	Estéril	30 min/8 h	4.68	10.3738	8.8482
48 h	No Estéril	15 min/4 h	3.93	9.4601	8.6583
48 h	No Estéril	30 min/8 h	3.90	10.2247	9.9635
FACTOR			P		
FN; Estéril vs. No estéril			0.0001	0.469	0.011
TA; 15min/4h vs. 30min/8h			0.0001	0.083	0.0277
Período: 0 vs. 48			0.0001	0.0001	0.0001

BAL, bacterias ácido lácticas; HL, hongos y levaduras
Estéril; 121°C/15 min;



La población de hongos y levaduras fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$), en la fuente de nopal, el no estéril presentó 10% más (células ml^{-1}), respecto al estéril esto debido posiblemente a los microorganismos que se encuentran de manera natural en los sustratos favorecidos por las condiciones de oxígeno y nitrógeno (Becerra, 2008). El tiempo de aireación en la población de hongos y levaduras fue diferente ($P < 0.05$), la aireación de 30 minutos incremento en 8% la población respecto a la de 15 minutos.

El pH mostro diferencias altamente significativas respecto a la fuente de nopal, tiempo de aireación y la interacción de éstas ($P < 0.05$), el nopal estéril, la aireación de 30 minutos, la interacción nopal estéril con aireación 30 y la interacción nopal no estéril con tiempo de aireación de 15 minutos mostraron pH's más altos. Esto se debió posiblemente al proceso de esterilización al que fue sometido el nopal. El tiempo de aireación de 30 minutos favorece que se eleve el pH relacionado con una mayor población de microorganismos.

Conclusión

La fuente de nopal no estéril favorece la población de hongos y levaduras, sin embargo, en el caso de las bacterias ácido lácticas, éstas se mantuvieron constantes en ambas fuentes de nopal. El tiempo de aireación de 30 minutos si favorece el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. El pH se eleva cuando el nopal es esterilizado.

Literatura Citada

- Aranda O. G.; C. A. Flores V.; L.A. Miranda R. y M. Cruz M. 2009. El nopal como forraje. Extensión al campo, publicación trimestral de la Universidad Autónoma Chapingo. Año II vol. 2 Nums. 10-12.
- Anaya P. M. A. y Bautista Z. R. 2008. El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX. Agricultura, Sociedad y Desarrollo.
- Becerra, A., Rodríguez, C., Jiménez, J., Ruiz, O., Elías A y Ramírez, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. Tecno Ciencia Chihuahua 2: 7-14
- Best, D. J. 1990. Optimal determination of most probable numbers. International Journal Food and Microbiology 11: 159-166.
- Flores V. A, El nopal como forraje, ENA, México, Tesis profesional. Depto. Zootecnia. México.



FERMENTACIÓN *In Vitro* DE *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis* A DIFERENTES PROPORCIONES.

Catarino-Gómez M.¹, Cuahua-Tequilihuihua E.¹, Trujillo-Cruz C.¹, Sandoval González L.¹, Miranda Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5.

catago_45@gmail.com

Resumen

Se determinó los volúmenes total (VT), residual (VR) y de CO₂ (VCO₂) de gas de fermentación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* (Ll) y *Cynodon nlemfuensis* (Cn) a proporciones de 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0 % y la digestibilidad (DIVMS). También se calculó con modelos matemáticos y el VT la EM, DMO y eficiencia (Ef) de producción de gas. VT, DIVMS, DMO y EM fueron diferentes ($P \leq 0.05$) en función de la proporción de forrajes, pero VR, VCO₂, Ef no fueron diferentes ($P > 0.05$). Los valores de Ef describen una disminución de gases conforme la proporción de leguminosa es mayor, lo que implica que Ll puede tener efecto en el control de la contaminación por gases de efecto invernadero. Se concluyó que el tratamiento más adecuado para satisfacer los requerimientos energéticos del ovino, así como una buena digestibilidad y la disminución de la emisión de contaminantes es la proporción 50:50.

Palabras Clave: *In Vitro*, CO₂, DIVMS, Eficiencia de producción de gas.

Introducción

En México el enfoque de la ganadería tropical basa su desarrollo en pastos; los cuales tienen un gran potencial para la producción de biomasa de forma estacional y mayores concentraciones de fracciones fibrosas, sin embargo presentan menores contenidos de proteína cruda y menor digestibilidad (J.M.PALMA,2005)¹. Por lo que es necesario desarrollar sistemas que compensen las necesidades nutrimentales para ganado. Para ello se han desarrollado sistemas silvopastoriles, los cuales consisten en cultivar gramíneas asociados con algunas otras especies vegetales como lo son en este caso la asociación del pasto estrella con leguminosas arbustivas (leucaena), representando una mejora de las condiciones del suelo, lo que se traduce en una mayor producción y calidad de suelo, ya que de manera recíproca la gramínea solubiliza el fósforo del suelo para ser aprovechado por la leguminosa y esta a su vez se encarga de fijar el N₂ (L.MAHECHA,ET



AL, 2008)². Se cuentan con pruebas bromatológicas por separado de las especies antes mencionadas, de los cuales se obtuvo que las leguminosas aportan mayor cantidad de proteína que las gramíneas con un 29.28 % y 11.18% respectivamente (A.R.CRUZ, ET AL, 2013)³. Actualmente no se cuenta con resultados específicos que indiquen los efectos sobre la fermentación y el valor nutritivo de la combinación de los dos forrajes mencionados. Por lo tanto la presente investigación tuvo la finalidad de determinar la fermentación ruminal en ovinos de *Cynodon nlemfuensis* y *Leucaena leucocephala* de 35 días de edad de rebrote y diferentes proporciones.

Materiales y Métodos

El experimento se baso en la fermentación in vitro para la producción de gas, utilizando 5 tratamientos y 3 repeticiones cada uno, para tener 15 frascos muestra y dos blancos, utilizando como sustrato *Cynodon nlemfuensis* y *Leucaena leucocephala* en proporciones de 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 respectivamente, teniendo una muestra total de 0.2 g que se depositaron en frascos de 60 ml color ámbar, agregando 40 ml de inoculo (preparado con 2 soluciones minerales, una solución reductora con rezarsurina y liquido ruminal mantenidos con CO₂), sellados herméticamente e incubados en baño maría a 39°C, para realizar las mediciones de producción de gas correspondientes a intervalos de 0, 6, 12, 18 y 24 horas.

Para la extracción de líquido ruminal, este se realizo con dos ovinos fistulados y 4 horas después de ser alimentados, utilizando una bomba al vacío.

A la vez se preparo un mismo numero de frascos con una solución de 40 ml c/u de hidróxido de potasio (KOH) a 0.5 M, para hacer reaccionar el gas producido de la fermentación in vitro con el KOH y de esta manera obtener por diferencia de volumen el porcentaje dióxido de carbono (CO₂) producido. Una vez terminada las mediciones, se realizo un filtrado al vacío agregando una pequeña cantidad de agua destilada, para posteriormente secar las muestras en una estufa a 60°C por 48 horas y de esta manera determinar la cantidad de materia seca y otras variables como: digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS), eficiencia (EF), digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y energía metabolizable (EM). Para el análisis estadístico del experimento se utilizó el diseño completamente al azar, para estudiar los efectos de cada tratamiento a partir de la asociación gramínea-leguminosa.

Resultados y Discusión

La producción de gas total (VT) obtenida por la fermentación *in vitro* de 200 mg de sustrato, es afectada por el tratamiento en un periodo de 24 horas de incubación ($p \leq 0.05$; cuadro 1).



En cuanto a la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y digestibilidad de la materia orgánica (DMO), al igual que en VT, estos aumentan debido al aumento en la concentración de *Leucaena leucocephala*, teniendo en las tres variables cambios significativos ($P \leq 0.05$).

Se observa una agrupación de los valores en VT, DIVMS, DMO y EM de acuerdo a la prueba de Tukey indicando que no existe diferencia significativa en las medias con la misma letra. En cuanto a VT presenta diferencia significativa en el tratamiento 3 (50:50), para la DIVMS el tratamiento 2 (25:75) presenta la diferencia significativa con respecto a los demás valores de la misma variable. En el caso de la DMO y EM, todos son diferentes, pero al no considerar las medias extremas por que representan la mayor cantidad de concentración de una especie, se toma la media del tratamiento 3 (50:50) con la diferencia significativa ($P \leq 0.05$; cuadro 1).

Lo anterior indica que existe un efecto positivo en cuanto a la implementación de la leguminosa en la dieta en ovinos en cuanto a la mayor digestibilidad de la materia seca y orgánica, sin afectar la población microbiana y funcionamiento del rumen si se ajusta a una determinada producción de gas.

Cuadro 1. Producción de gas total de fermentación, energía metabolizable, digestibilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica, de sustrato con distinta proporción de Cynodon (Cn) y Leucaena (LI).

Tratamiento		Variables determinadas			
LI	Cn	VT mL 200 mg ⁻¹	DIVMS %	DMO %	EM MCal Kg ⁻¹
0	100	11.25 ^c	33.08 ^d	30.68 ^e	1.04 ^e
25	75	13.41 ^c	42.08 ^c	34.62 ^d	1.17 ^d
50	50	20.38 ^b	50.42 ^b	42.83 ^c	1.46 ^c
75	25	24.75 ^a	53.91 ^b	48.73 ^b	1.66 ^b
100	0	26.95 ^a	66.25 ^a	52.7 ^a	1.8 ^a

a, b, c, d, e medias con letras distintas son diferentes ($p < 0.05$)

VT, volumen total de gas de 24 h de incubación para 200 mg de sustrato

DIVMS, digestibilidad *in vitro* de la materia seca

DMO, digestibilidad de la materia orgánica

EM, energía metabolizable



Cuadro 2. Producción de gas total de fermentación, energía metabolizable digestibilidad in vitro de la materia seca y orgánica de sustrato con distinta proporción de *Cynodon* (Cn) y *Leucaena* (LI).

Tratamiento		Producción de gas		
LI	Cn	VR mL 200 mg ⁻¹	VCO2 %	Ef %
0	100	14.89 ^a	85.10 ^a	170.66 ^b
25	75	10.94 ^a	89.05 ^a	159.49 ^b
50	50	10.13 ^a	89.86 ^a	202.17 ^{ba}
75	25	9.46 ^a	90.53 ^a	230.31 ^a
100	0	7.67 ^a	92.32 ^a	203.69 ^{ba}

a, b, c Medias con letras distintas son diferentes ($p < 0.05$)

VR, Volumen CO₂ de gas de 24 h de incubación para 200 mg de sustrato

VCO₂, Porcentaje de CO₂ producido en 24 horas de incubación de 200 mg de sustrato

EF, Eficiencia en la producción de gases contaminantes

Por otra parte las medias del volumen residual (VR) y Volumen de bióxido de carbono (VCO₂) no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$), sin embargo a medida que se da el aumento en la concentración de *Leucaena leucocephala* los valores en volumen de gas residual disminuyen, y el bióxido de carbono aumenta. Mientras tanto con la prueba de Tukey la eficiencia (EF) presenta dos agrupaciones que se relacionan con los tratamientos 3(50:50) y 5(100:0) lo cuales no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$) pero los valores muestran que *Cynodon nlemfuensis* es menos digestible para el animal por lo tanto emite más gases contaminantes.

Conclusión

Dentro del estudio de análisis, se concluye que la concentración pura de los dos sustratos utilizados nos puede dar efectos negativos dentro del metabólicos, reduciendo así mismo la actividad fermentativa y ocasionando en un animal problemas gástricos, es por ello que se sugiere combinar en una proporción de 50-50 ambos sustratos ya que de esta forma se disminuya la cantidad de metano producido y se aprovecha al máximo la digestibilidad, así mismo no se ocasiona problemas atmosféricos, en cuando al CO₂ libreado por el animal.



Literatura citada

PALMA J.M. 2013. Los sistemas silvopastoriles en el trópico seco mexicano. Disponible: <http://www.bioline.org.br/request?la06018>. Consultado 18 sep, 2013.

Mahecha I. et al. 2013. Experiencias en un sistema silvopastoril de *Leucocephala-Cynodon plectostachyus-Prosopis juliflora* en el valle del cauca, Colombia. Disponible: <Http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/agrofor1/mahech20.pdf>. Consultado 12 sep, 2013.

Reyes C.A. y Martínez M.M. 2013. Composición Nutricional de la *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit) asociada con pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst) en la región huasteca potosina. (Tesis de Licenciatura). Texcoco, Edo. De México. Universidad Autónoma Chapingo.





SOPA DE NOPAL PARA DIETA DE BOVINOS MEDIANTE FERMENTACION, CON USO DE INOCULANTES MICROBIANOS

Balderas Arreola R.¹, Herrera Segundo E.¹, Ortega Sangabriel C.¹, Vargas Ortiz M.¹, Vázquez Mendoza P.², Miranda Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza e Investigación en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo.

mari901704@gmail.com

Resumen

El experimento realizado se basó en la fermentación mediante el método de aireación y uso de inóculos bacterianos, se probaron cuatro tratamientos que consistieron en dos fuentes de nopal (estéril y no estéril) y dos fuentes de aireación (60 y 120 minutos cada 12 y 24 horas respectivamente), esto con el objetivo de observar y medir el crecimiento en las poblaciones en la fuente nopal estéril y no estéril con su respectivo tiempo de agitación y fermentación, así como la aireación necesaria para cada tratamiento. Se observaron los efectos de los tratamientos, las repeticiones, el sustrato y la agitación en la reproducción de colonias bacterianas. Con el nopal estéril no se obtuvieron cambios o diferencias en dicho crecimiento bacteriano respecto al segundo tratamiento. Cabe concluir que la aireación es un factor que influye y favorece en el crecimiento de microorganismos y esto se observa en la fuente de nopal no estéril en donde se ve favorecida la población de hongos, bacterias y levaduras en comparación con la fuente estéril.

Palabras Clave: Aireación, colonia bacteriana, agitación.

Introducción

En México el nopal forrajero proviene de gran parte de las nopaleras naturales. Marroquín et al. (1964) señalan que la explotación de las nopaleras es más fuerte en el norte del país, debido a los escasos. En nuestro país se encuentran 100 especies reconocidas. La fermentación es el proceso aeróbico continuo (24 horas) con el que se obtiene un producto alto en proteína (3.36-24.86 % PC). Esto es producto del uso de inóculos microbianos (bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras) (Aranda, 2006).

Las series de cultivares COPENA, como CPF1, CPF2 y CPF3, pertenecen a *O. ficus-indica*. Fueron desarrollados por el Colegio de Postgraduados-Escuela Nacional de Agricultura, y seleccionados para producción de forraje. Mientras que el cv. CPV1 se recomendó para usarse como verdura (Barrientos,



1965 a, b), aunque sus pencas maduras también pueden usarse como forraje. Actualmente, solo CPF1 y CPV1 se cultivan en pequeñas parcelas en el centro de México. La variedad COPENA-F1, o CPF1, produce pencas largas, delgadas y verdes, excelentes para consumo humano, cuando están maduras. Las frutas de estos cultivos son de color verde claro, con pericarpio delgado y ligero chapete en la parte expuesta al sol. Bajo condiciones de lluvia, se produce al menos una serie de pencas por temporada de crecimiento (FAO).

Materiales y Métodos

Se realizó un experimento de fermentación por medio de aireación utilizando sopa de nopal de la variedad COPENA F1 de la nopalera Facundo Barrientos UACH. Se pesó aproximadamente 0.6 g de superfosfato de calcio, 0.6 de urea, 0.08 de sulfato de amonio, 0.05 de levaduras, 0.05 de bacterias, y 2 sacabocados de hongo (*aspergillus orizae*) todo esto en base a (g/100ml). Se depositó en un matraz para realizar las soluciones correspondientes. El material paso por un proceso de lavado y esterilización mediante ollas de presión (115 lb) por un tiempo de 15 min, previamente se envolvió con papel para introducirlo en las ollas.

Se evaluaron cuatro tratamientos en una fermentación aeróbica de 48 horas y consistieron: T1; nopal estéril con 60 minutos de aireación cada 12 horas, T2; nopal estéril con 120 minutos de aireación cada 24 horas, T3; nopal no estéril con 60 minutos de aireación cada 12 horas y T4; nopal no estéril con 120 minutos de aireación cada 24 horas. También se evaluó cómo afecta la aireación en las poblaciones de colonias bacterianas de los diferentes tratamientos: t1) tratamiento con 24 horas de reposo, t2) tratamiento con 24 horas de reposo, t3) tratamiento 3 con 48 horas de reposo, t4) tratamiento con 48 horas de reposo, (t1 y t3 con 60min de aireación, t2 y t4 con 120 min de aireación). Se colocaron en la incubadora las cajas que contenían como medio de cultivo agar y agarosa a una temperatura de 37 ° C. Las cajas con medio en PDA, se quedaron a temperatura ambiente.

En la inoculación de las cajas Petri se utilizó la técnica de diluciones seriadas un área estéril (campana de flujo laminar), realizando el conteo a las 48 horas después de la siembra. Tomamos como referencia el criterio de Woomey (1994), y los resultados se analizaron en el programa estadístico SAS. Para el conteo bacteriano nos apoyamos del método de número más probable (nmp). Esta es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales, especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (positiva o negativa) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. Por lo tanto, un



requisito importante de este método, es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la población(es) en el medio de crecimiento a utilizarse. El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística.

Resultados y Discusión

La producción de crecimiento bacteriano se vio afectada por el tiempo de aireación tratamiento ($P \leq 0.05$; Cuadro 1). También, se encontró una interacción de fuente de nopal*tratamiento importante dependiendo de la aireación. Con las diferentes repeticiones no hubo cambios significativos en el comportamiento de las medias de esta variable (crecimiento bacteriano) por efecto de los tratamientos, sin embargo, a medida que avanzó el tiempo de incubación parece haber un incremento en la producción de crecimiento bacteriano, principalmente a las 48 h. Mientras, que con el nopal estéril se observó una disminución en la producción colonia bacteriana al mismo tiempo de incubación. Con 120 min de aireación la fermentadora favoreció el crecimiento, tanto de hongos levaduras y bacterias. Estos resultados pueden relacionarse con microorganismos que se encuentran de manera natural en los sustratos favorecidos por las condiciones de oxígeno y nitrógeno (Becerra, 2008). No hubo efecto de los tratamientos sobre el pH ($P > 0.05$). Se observó interacción periodo*tiempo de aireación ($P > 0.05$). En promedio, el pH fue de 4.53 para estéril y de 4.51 para no estéril, inicialmente; mientras que al final hubo ligeras disminuciones, para los tratamientos así como las respectivas repeticiones.

Conclusión

La fuente de nopal no estéril de 12hr (60min) y el no estéril de 24hr (120min), no favorece la reproducción de hongos, levaduras ni bacterias ácido lácticas, ya que estas se mantuvieron constantes al inicio y al final. Sin embargo, el nopal estéril de 12hr (60min) tuvo un resultado de positivo. De igual forma pero con mayor incremento, el crecimiento microbiano del tratamiento de nopal estéril de 24hr (120min) presentó un cambio positivo.

El pH se eleva cuando el nopal es esterilizado; con base al calentamiento que recibe en la autoclave. Se notó cambio de pH en las dos fuentes de nopal en base al tratamiento con bacterias ácido lácticas, siendo mayor el descenso de pH en el nopal que fue esterilizado. Se llegó a la conclusión que el método de aireación de los de tratamientos realizados con 12 y 24hr no estériles con un periodo de aireación de 60 y 120min respectivamente, no expresan un incremento microbiano. Por otro lado, los tratamientos estériles de 12hr (60min) y 24hr (120min) son los que presentan un incremento significativo, siendo el segundo el más elevado



CUADRO 1. Parámetros obtenidos en la inoculación microbiana

TRATAMIENTO	Variables		
	pH	HyL	BAL
PER TA FN	—Log ₁₀ NMP—		
INIC 12(60) ES	4.53	0	0
INIC 24(120) ES	4.53	4.87	5.29
INIC 12(60) NE	4.51	0	5.29
INIC 24(120) NE	4.51	6.84	6.49
FIN 12(60) ES	3.66	4.83	7.01
FIN 24(120) ES	3.66	5.38	6.97
FIN 12(60) NE	3.77	0	9.59
FIN 24(120) NE	3.77	7.14	7.69
FACTOR	P		
FN; Estéril vs No Estéril	<.0001	0.0001	0.086
TA; 12(60) vs 24(120)	.	0.0001	0.157
PER; Inicial vs Final	.	0.6321	0.086
FN*TA	.	0.0002	0.090
PER	<.0001	0.6321	0.086
PER*TA	<.0001	0.0953	0.163
PER*TA+FN	.	0.0001	0.0877

TA = tiempo de aireación, PER= periodo, FN= fuente de nopal, L= levaduras, H=hongos, BAL= bacterias

Bibliografía

- Aranda O. G.; C. A. Flores V.; L.A. Miranda R. y M. Cruz M. 2009. El nopal como forraje. Extensión al campo, publicación trimestral de la Universidad Autónoma Chapingo. Año II vol. 2 Nums. 10-12.
- Flores V. A.; A. R. Rogelio. 1979. El nopal como forraje. Universidad Autónoma Chapingo. pp. 9-43.



UREA PROTEGIDA Y EDAD DE REBROTE DE LEUCAENA Y PASTO ESTRELLA EN LA FERMENTACIÓN *In Vitro* POR CONSORCIOS RUMINALES DE OVINOS

Blancas Guerra E.¹, Cabrera Munguia L.¹, Méndez Becerra P.¹, Mondragón Tapia H.¹, Sandoval González L.¹ Miranda Romero L. A.²

¹ Departamento de Investigación y Servicio en Zootecnia, ² Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo

peri_menbe@hotmail.com

Resumen

Se sabe que los forrajes son la principal fuente alimenticia de los rumiantes, ya que cuentan con nutrientes esenciales para el desarrollo del animal, en esta ocasión ovinos. Los cuales al consumir el forraje aprovechan al máximo los nutrientes que éste contiene, realizando una digestión de tipo fermentativa en el rumen; a consecuencia de esto se produce una gran cantidad de gases contaminantes, principalmente metano y CO₂. Por esta razón el objetivo del experimento consiste en determinar la producción de gas y la digestibilidad *in vitro* de materia seca de dos diferentes forrajes cuando se les suministra un aditivo en este caso Urea Protegida, los forrajes utilizados fueron: *Leucaena leucocephala* y *Cynodon plestostachyus*. El experimento consistió en la medición de gas liberado por los forrajes antes mencionados, a diferentes edades de rebrote 35 y 70 días de las cuales se tomaron 0.5g que posteriormente se colocaron en frascos con sus respectivos tratamientos y repeticiones sellándolos perfectamente, para después tomar las mediciones que se realizaron en un periodo de 24hrs, a las 6, 12, 18 y 24hrs. Los resultados que se obtuvieron nos mostraron que la *Leucaena* libera más cantidad de gas y tiene mayor digestibilidad de MS que el *Cynodon*, en cualquier edad de rebrote. También se observó que es irrelevante el uso de Urea Protegida en los forrajes ya que no se muestra un aumento significativo en la digestibilidad, pero en el caso de *Cynodon* se produce una menor cantidad de gas con aditivo que sin éste.

Palabras clave: Fermentación, *in vitro*, *Leucaena leucocephala*, *Cynodon plestostachyus*.



Introducción

El desempeño productivo de los rumiantes está en función del valor nutricional de la dieta que consumen, la evaluación del valor nutricional se puede realizar por el método *in vitro* mediante la técnica de producción de gases, la cual, emplea sustratos molidos como *Leucaena leucocephala* y *Cynodon plectostachyus*, un medio anaeróbico, una temperatura constante e inóculo ruminal, este procedimiento permite la comparación de los sustratos, además, la producción de gas por unidad de materia seca o de materia orgánica puede ser cuantificada.

La Urea es un fertilizante agrícola que a partir de 1950 se usa en la dieta de animales domésticos, ya que provee de nitrógeno no proteico para la microflora digestiva del rumen, reduciendo los costos de producción y mejorando los parámetros productivos, eficiencia y conversión. La urea protegida de liberación lenta permite controlar la entrega de nitrógeno al rumen en la alimentación de rumiantes por su potencial en retardar la liberación de amoníaco postprandial y así disminuir la alta concentración de amoníaco que lleva a su utilización ineficiente por parte de los microorganismos ruminales. El objetivo de este estudio fue evaluar mediante la medición *in vitro*: la producción de gas, degradación de la MS, Energía Metabolizable, Digestión de MO.

Material y Métodos

Se realizó un experimento de digestibilidad *in vitro* mediante la producción de gas, para este experimento se utilizó como sustrato *Leucaena leucocephala* y *Cynodon plectostachyus*. Para comenzar se pesó 5g de sustrato, 0.001g de Urea protegida (aptigen), los cuales se colocaron en frascos de 100 ml. Proseguimos a formular una solución mineral la cual consiste en: 6g de KH_2PO_4 , 6g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 12g de NaCl, 2.45g de MgSO_4 , 1.60g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5g cisteína, 15ml NaOH 2N, 2.5g sulfuro de sodio. Esta se dejó en baño María hasta que tomo un color violeta claro, para posteriormente agregarle el líquido ruminal que en proporción a la solución se agregó 260 ml de líquido ruminal. A la solución obtenida se agregó 90 ml. a cada frasco, se taparon herméticamente y se incubaron durante 24 h.

Las variables con las que se trabajó fueron medidas con un manómetro kg/cm² a las 6, 12, 18 y 24hrs. Al terminar de realizar las mediciones se procedió al filtrado de la MO, posteriormente se colocó en la estufa a 60°C durante 72 h. para eliminar la humedad. Por último se pesó el papel filtro con el sustrato y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes de EM (energía metabolizable), DMO (digestibilidad de materia orgánica), además se procesaron los tratamientos en SAS mediante la comparación de medias.



Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en este experimento indican que solo la edad de rebrote y el tipo de forraje presentan significancia, mientras que el aditivo y la interacción entre edad de rebrote y forraje no presentan significancia alguna, como se muestra en el Cuadro 1.

También, encontramos que la producción de CO₂ es afectada por la presencia del aditivo, en *Cynodon* se generó una disminución en la degradación de la materia orgánica, sin embargo la *Leucaena* fue beneficiada aumentando sus niveles de DMO.

De la misma manera se observó que la eficiencia en *Leucaena* presentó un mayor grado sin verse influenciada por la EDR, mientras que los demás presentaron una eficiencia menor, así mismo la digestibilidad de materia seca se vio afectada por el aditivo solo en *Leucaena* con 35 EDR y *Cynodon* con 70 EDR, mientras que los otros tratamientos mostraron una reacción negativa al uso del aditivo.

La *Leucaena* presentó la mayor digestibilidad de materia orgánica. Observándose una alteración respecto a la EDR, mientras que el *Cynodon* presentó una variación negativa con respecto al tratamiento.

En cuanto a la energía metabolizable se presentó una correlación positiva en la *Leucaena* de 70 EDR a partir del uso de aditivo, a su vez la *Leucaena* de 35 EDR presentó una mínima diferencia.

Por último la ENL se encontró que el *Cynodon* respondió negativamente al uso de aditivo, mientras que la *Leucaena* fue favorecida por el uso de este.



Cuadro 1. Variables de producción de gas y digestibilidad *in vitro*, y variables nutricionales del *Cynodon plectostachyus* (Cn) y *Leucaena leucocephala* (LI) por consorcios microbianos del rumen de ovinos

TRATAMIENTO			VT	EF	DIVMS	DMO	EM	ENL
EDR	FORR	UREA	mL500 mg ⁻¹ MS	mL500 mg ⁻¹ MSD	%	%	Mcal kg ⁻¹ MS	Mcal kg ⁻¹ MS
35	Cn	Con	9.75	27.70	32.80	29.35	4.16	1.18
35	Cn	Sin	14.08	40.01	37.27	33.20	4.75	2.10
35	LI	Con	25.75	73.15	65.00	51.64	7.37	3.02
35	LI	Sin	25.25	31.73	60.60	51.19	7.30	2.96
70	Cn	Con	3.58	10.18	29.67	23.21	3.23	0.47
70	Cn	Sin	10.58	30.07	26.33	29.44	4.19	1.27
70	LI	Con	21.75	61.79	49.00	47.83	6.79	2.56
70	LI	Sin	15.25	43.32	50.53	42.05	5.91	1.81
FACTORES			-----P-----					
EDR			0.0319	0.0319	0.0074	0.0213	0.0221	0.0166
FORR			0.0001	0.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003
UREA			0.6726	0.6726	0.8963	0.6726	0.6726	0.4451
EDR*FORR			0.6726	0.6726	0.3728	0.7370	0.7307	0.9488

VT, volumen total de gas a 24 h de incubación *in vitro*

DIVMS, Digestibilidad a 24 h de incubación *in vitro*

EF, eficiencia de producción de gas; MSD, materia seca digerida; DMO, digestibilidad de la materia orgánica; EM, energía metabolizable; ENL, energía neta para lactacia.

Se encontraron resultados en la literatura donde se muestra una EM de 1.88 a 2.04 Mcal kg⁻¹ MS en *Leucaena* a comparación de lo anterior es rescatable mencionar que los valores obtenidos en el experimento nos muestran un aumento considerable de la EM con el uso del aditivo.

La respuesta observada en producción de gas por efecto de los tratamientos dependió del tipo de sustrato y el tipo de forraje, lo cual puede deberse a la capacidad de las especies microbianas en degradar el sustrato.



Estos resultados, podrían tener una relación directa con la cantidad de proteína, que presenta cada forraje, puesto que la *Leucaena* tiene una mayor cantidad de proteína y es una leguminosa, mientras que el *Cynodon* es pobre en proteína y es una gramínea. Por esta razón en cada medición se vio favorecida, significativamente sobre el *Cynodon* e incluso presento una mayor respuesta al tratamiento con urea protegida.

Conclusiones

La técnica de producción de gas permite detectar diferencias entre los sustratos generados por su madurez, condiciones de crecimiento y especie. Igualmente ha sido usada para determinar diferencias en la fermentabilidad, EF, EM, DiMS, DMO, y ENL de los sustratos.

En la elaboración de éste experimento podemos afirmar que el uso de aditivo en la alimentación de los rumiantes es poco variable en cuanto a los beneficios para el animal, debido a que los resultados obtenidos nos dan a entender que si se piensa utilizar *Leucaena* la producción de gas será mayor. El uso de aditivo no afecta a la *Leucaena* ya que se obtienen resultados muy idénticos cuando se usa urea que cuando no, pero se tiene una mayor digestibilidad si se usa aditivo que es el beneficio que le interesa al productor dejando atrás que si se produce mayor cantidad de gas, este se libera a la atmosfera lo que hace que se contamine por el metano producido. Por otro lado, el *Cynodon* libera mayor cantidad de gas cuando se la aplica el aditivo, en cambio la digestibilidad de materia seca varía dependiendo la edad de rebrote, ya que a mayor edad la digestibilidad es altamente significativa cuando hay aditivo, a diferencia de cuando no lo hay, pero a menor edad de rebrote, es muy similar en ambos casos.

Literatura citada

- Barreto, L. 1988, *Leucaena leucocephala*. FONAIAP Divulga 29:7-9..
- Makkar H 2001 Recent advances in in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm
- Van Milgen J, Murphy M R and Berger L L 1991 A compartmental model to analyze ruminal digestion. *Journal of Dairy Science*. 74: 2515-2529.
- Chai W Z, Van Gelder A H and Cone J W 2004 Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. *Animal Feed Science and Technology* 114: 195-204.



III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013



- Schofield P and Pell AN 1995a Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in vitro: a comparison involving three forages. *Journal of Dairy Science*. 78: 2230-2238
- Schofield P and Pell A N 1995b Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *Journal of Animal Science*. 73: 3455-3463
- Chalupa, W. 1968. Problems in feeding urea to ruminants. *J. Animal Sci.*, 27:- 209-219.
- Schofield P, Pitt R E and Pell A N 1994 Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*. 72: 2980-2991
- Tilley, J. M. and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *British Grasslands Society*, p 287.
- Wolin M J 1960 A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*. 43: 1452-1459.





PRODUCCIÓN DE GAS “*IN VITRO*” PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN Y DIGESTIBILIDAD DE FORRAJES, EN CAMPO

Acevedo-García A.¹, Ceballos-Duran J. I.¹, Fernández-Rodríguez A.¹, Morales-Vázquez L. A.¹,
Cárdenas-Ramírez L. R.², Miranda-Romero L. A.²,

¹ Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, ² Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma de Chapingo.

aag_1512@hotmail.com

Resumen

Uno de los principales problemas que limitan tener el valor nutritivo de la dieta es el tiempo que se tarda en determinar el contenido nutrimental y digestibilidad del mismo, debido a que son realizados en sitios lejanos a la explotación. Se realizó un experimento aplicando la técnica de producción de gas como técnica rápida en campo, utilizando como sustrato maíz, alfalfa y orchard, sobre la producción de gas, EM, ENL y DMO. Se obtuvo mayor cantidad de gas, digestibilidad y energía con la alfalfa ($P > 0.05$), esto puede demostrar que una dieta balanceada con alfalfa y otro forraje daría muy buenos resultados. La técnica para el análisis rápido en campo no pudo llevarse a cabo fuera del laboratorio debido a problemas presentados con las instalaciones eléctricas en el área de trabajo, motivo por el cual el experimento fue transferido a laboratorio; la técnica sirve a medida que se realice de acuerdo a la metodología planteada, sin importar que otros procedimientos se realicen en campo (secado, molido, tamizado de las muestras e inoculación del líquido ruminal a los frascos).

Palabras claves: *Fermentación, técnica rápida en campo, calidad.*

Introducción

De las ramificaciones que tienen la zootecnia o la ciencia animal, estas pueden categorizarse en tres puntos; nutrición, reproducción y mejoramiento genético. La nutrición es la más importante cuantitativa y económicamente debido a que incide más en los costos de producción representando de 60-85 % de los mismos, es por ello que en los sistemas de producción se calcula el valor nutritivo de la dieta a partir de: contenido nutrimental, consumo animal y asimilación (Shimada, 2003). A partir de esto los principales problemas que limitan tener el valor nutritivo de la dieta es el tiempo que tarda en determinar los tres puntos anteriores en laboratorio debido a que su ubicación es lejana a la



explotación. Así es como el análisis de este problema conduce a plantear las posibles soluciones las cuales deberán ser rápidas y económicas con el objeto de determinar el valor nutricional de la dieta en la explotación sin hacer uso de laboratorios. De esta manera se ganara tiempo, disminución de costos y satisfacción de productores. El objetivo de esta investigación es evaluar una alternativa que permita determinar el valor nutricional de la dieta, haciendo uso de la técnica de producción de gas como una técnica microbiológica rápida en campo.

Materiales y métodos

Se utilizó la técnica de producción de gas, la cual tuvo la finalidad de llevar los procesos de laboratorio al campo. Se utilizaron los siguientes forrajes: Orchard grass (*Dactylis glomerata*), Alfalfa (*Medicago sativa*) y Maíz (*Zea maíz*) los cuales fueron colectados en el cultivo de producción de leche en pastoreo de la Universidad Autónoma Chapingo. Posteriormente las muestras de los forrajes se secaron en un deshidratador de frutas casero marca oster modelo número FPSTFD0101 con un tiempo de espera de 15 hrs. Después de secado se molió en un molino eléctrico de café (casero) marca oster, y se tamizo para homogeneizar la muestra. Se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos (forrajes) y tres repeticiones cada uno (frascos), obteniendo 9 unidades experimentales, más dos blancos. Se utilizaron frascos de color ámbar de 60 ml de capacidad, a los que se les agrego 0.2 g de sustrato excepto a los blancos; se agregó 20 ml de solución mineral reductora para después ser tapados con un tapón de goma y sellados con aros metálicos. El inculo ruminal se obtuvo de 2 borregos, mediante el proceso de introducción de una sonda y la ayuda de una bomba de vacío para facilitar la extracción, así mismo se filtró el producto en una tela de gasa doblada en 8 partes, para después mezclarse y obtener un líquido compuesto; a cada frasco se le inyectó 10 ml del inculo. Se utilizó la técnica de medición de digestibilidad “*in vitro*” con una proporción dos a uno del líquido ruminal con respecto a la solución mineral donde inoculó el líquido compuesto de los frascos antes mencionados. Se registró la producción de gas a las 6, 12, 18 y 24 h, para esto se usó una jeringa de vidrio de capacidad de 60ml. Pasadas las 24 hrs se filtraron al vacío los contenidos de los frascos color ámbar, los residuos se metieron a la secadora por 48 hrs para calcular la Msr (materia seca residual) a partir de la cual se calculó la digestibilidad de materia seca. Los datos se procesaron en hoja de cálculo electrónica del programa Excel 4.0. La comparación de medias se realizaron mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$). Todo lo anterior se realizo con el paquete estadístico SAS (2009).



Resultados y discusión

La digestibilidad de la materia seca para las tres especies forrajeras, demostró que la producción de gas es diferente para cada especie forrajera ya que la alfalfa fue el sustrato con mayor producción de gas, así mismo fue el forraje con mayor porcentaje de digestibilidad, probando así que al menos un sustrato fue diferente para los distintos tratamientos ($P > 0.05$), la digestibilidad de materia seca encontrada en orchard y maíz fueron similares y a la vez menores que la alfalfa ($P > 0.05$). Estos resultados no fueron los mismos en digestibilidad de materia orgánica donde la alfalfa y el maíz tuvieron una digestibilidad de materia orgánica similar ($P > 0.05$), siendo distinto y mayormente que la digestibilidad orgánica del orchard ($P > 0.05$). Con base en los resultados de Alvarado (1978) para la comparación de maíz y alfalfa, y con las tablas de NRC en el caso del orchard, se encontró una diferencia marcada con el maíz en cuanto a DMS ya que los cálculos arrojaron que el valor era 41.5 y en el trabajo citado fue de 72.27, en cuanto a la DMO fue de 40.35 mientras que en la literatura el valor era de 72.56, en cuanto a la energía metabolizable los valores no fueron los esperados ya que los valores de Alvarado (1978) no son similares a los del presente trabajo, la energía neta de lactancia en comparación no cumplió las expectativas ya que los valores no se acercaron a los citados. Por otro lado el Orchard no fue superior a los valores de las tablas de NRC (2006), ya que en todas las variables medidas este forraje fue muy pobre.

Cuadro 1. Valores referentes a la digestibilidad “*in vitro*” de tres variedades de forraje.

Forraje	Vt mL 200 mg ⁻¹ 1	Vr	VCO ₂	DIVMS %	DMO1	DMO2	EM1	EM2	ENL
								Mcal kg ⁻¹	
Alfalfa	24.5 ^a	0.00 ^b	25.5 ^a	53.0 ^a	47.53 ^a	40.280 ^a	1.636 ^a	1.3533 ^a	0.71 ^a
Orchar	10.167 ^b	0.00 ^b	10.5 ^b	44.0 ^{ab}	25.24 ^b	25.903 ^b	1.053 ^b	0.876 ^b	0.3633 ^b
Maíz	22.16 ^{ab}	1.33 ^a	20.83 ^{ab}	42.0 ^b	40.35 ^a	37.197 ^a	1.393 ^{ab}	1.256 ^{ab}	0.646 ^{ab}

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Vt= volumen total; Vr= volumen residual; VCO₂= volumen de CO₂; DIMSV= digestibilidad de la materia seca; EM1= energía metabolizable (Getachew et al., 2002); EM2= energía metabolizable (Menke and Steingass, 1987); ENL= energía neta de lactancia; DMO1= digestibilidad de la materia orgánica (Getachew et al., 2002); DMO2= digestibilidad de la materia orgánica (Menke and Steingass, 1987).



Una vez observado el cuadro de arriba se puede inferir que el mejor forraje es la alfalfa, esto implica que una dieta en la que se utilice este ingrediente será buena, ya que todas sus variables fueron altas con respecto a las otras dos. Haciendo una recapitulación de este trabajo se puede mencionar que las técnicas rápidas en campo resultaron útiles para encontrar el valor de las variables expresadas en este trabajo, por otro lado no son tan eficientes en situaciones adversas dado a que no todas las infraestructuras son las propicias para ello, tomando como ejemplo en el trabajo la incubación no se realizó en el campo, ya que las condiciones de la red eléctrica no fueron las apropiadas. A manera general se puede decir que si se tiene la certeza de que las instalaciones están en buena condición estas técnicas pueden ser muy útiles si no es así, no se recomienda su uso.

Conclusión

Bajo las condiciones de este estudio, se concluye que la alfalfa es el forraje con mayor digestibilidad y energía metabolizable así mismo que las técnicas de digestibilidad en campo se asemejan mucho a las de laboratorio y se podría decir que son muy útiles, pero las condiciones no son tan cuidadas. Ya que en el laboratorio se sigue una metodología probada y optimizada, en cuanto a las técnicas rápidas al estar en vías de desarrollo no están adaptadas para accidentes como lo fue en este caso.

Bibliografía citada

- Alvarado-Sosa, D. 1978. *Evaluación del Proceso de Ensilaje de Maíz y Maíz-Alfalfa y su valoración "In Vitro"*. México. 1978. 57: 48.
- Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and New World camelids / Committee on Nutrient Requirements of small Ruminants. Board on Agriculture and Resources. Division on Earth and Life Studies, The National Research Council. 362: 314-318.
- S. A. S. 2009. User's guide. 4th ed. Statistical Analysis System Institute. Inc. North Carolina. USA. P 470.
- Shimada A.M. 2003. Nutrición Animal. México 2003. 373: 16-17.



PRODUCCIÓN DE XILANASAS DE *Trametes trogii* POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO EN MAÍZ

Aguilar Villarreal. G.¹, Maceda Olguin. P.¹, Olguín Vitales. M.¹, García Severiano. C.¹ Carrillo Díaz. M. I.², Tirado González D. N.², Miranda-Romero L. A.²

¹Alumno del departamento de Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad autónoma Chapingo.

agvige100@hotmail.com

Resumen

Las xilanasas son enzimas capaces de catalizar hemicelulosa de las paredes celulares de forrajes. Existen hongos con la habilidad de sintetizar enzimas, la cual los rumiantes solo pueden aprovechar un porcentaje, debido al pH y temperatura del rumen. El objetivo fue observar el efecto de dos sustratos en la cantidad de enzimas xilanasas producidas por el hongo *Trametes trogii*. Se evaluó la actividad enzimática (AE) de *Trametes trogii* en intervalos de tiempo de tres días (0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18) usando como sustrato rastrojo de maíz (con y sin mazorca). La AE de xilanasas se definió como la cantidad de μM de azúcares producida por mL de EE por min de reacción, cuantificadas por la reducción de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). No se encontró diferencia significativa entre los promedios finales de actividades de xilanasas de los sustratos utilizados ($p > 0.05$), sin embargo, se encontró que a los 18 d (636 μM azúcares reductores/mL de extracto enzimático/min de reacción) hubo un pico de actividad para los extractos del sustrato con rastrojo de maíz sin mazorca. Se concluye que la mejor actividad enzimática se observa cerca de día 18, pero añadir la mazorca a los sustratos con base de rastrojo de maíz no mejora la producción de xilanasas.

Palabras clave: actividad enzimática, hongos ligninolíticos, degradación de fibras del forraje.

Introducción

Por su alto contenido de fibra (celulosa, hemicelulosa, lignina entre otros), los forrajes son de bajo valor nutritivo, debido a que los animales no producen las enzimas requeridas para su digestión (celulasas y hemicelulasas; Contreras, 2010). Los rumiantes albergan en su rumen, microorganismos (bacterias, protozoarios y hongos) productores de tales enzimas y fermentan los azúcares liberados durante la hidrólisis produciendo ácidos grasos volátiles (AGV) de alto valor energético para el



rumiante, en tanto que éste les proporciona el alimento y ambiente necesario para su crecimiento y multiplicación (Ángeles, 2006). Entre más maduro este el forraje, la cantidad de fibra es mayor y el ataque microbiano disminuye y, aunado a esto la actividad enzimática de las xilanasas y celulasas desciende cuando el pH ruminal disminuye (Gonzales, 2004). Se han investigado métodos físicos, químicos y biológicos para mejorar la digestión y aprovechamiento ruminal de la paja, a través de eliminar lignina (Ángeles, 2006; Dervin, 2008). En el ámbito biológico se ha intentado el uso de “hongos de la pudrición blanca” y enzimas. Los hongos son degradadores destructivos al eliminar a lignina también consumen los polisacáridos de la fibra que debería ser el sustrato del animal (Remacha, 1988.). Por otro lado, las enzimas son degradadoras selectivas pues atacan únicamente al sitio activo, dando así una catálisis y dejando libre los azúcares para su aprovechamiento por parte del rumiante. Se han obtenido evidencias de que *Trametes trogii* es un hongo ligninolítico capaz de degradar la lignina enzimáticamente más eficientemente. (Graciela, 2009; Morales, 2006). El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de producción xilanasas por *Trametes trogii* en rastrojo de maíz (*Zea mays* L.) con y sin maíz molido, para determinar el día de máxima producción.

Material y Métodos

Al interior de una campana de flujo laminar se sembró en cajas Petri de 100x15 milímetros un disco de 1 cm de diámetro de hongo *T. trogii* en agar PDA (24 g L^{-1} de caldo papa dextrosa y 15 g L^{-1} de agar), se incubaron a 30°C. A los siete días se inoculó en cajas Petri agregando 4 discos de un centímetro de diámetro del micelio a 10 gramos de sustrato que consistió de 80% de rastrojo de maíz (con maíz y sin maíz), con 20% de salvado de trigo, con 80% de humedad y se metieron a incubar a una temperatura de 30°C. Se realizaron extractos enzimáticos de los días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18. El material de la caja Petri se vació en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se agregaron 90 ml de agua destilada, se tapó con papel parafilm, se colocó el matraz en un recipiente con hielos hasta dos terceras partes y se puso sobre la base de una agitadora orbital por 30 min a 120 RPM. Enseguida se filtró y en un tubo cónico de 50 ml se dispusieron 40 ml para posteriormente ser centrifugado a 7000 RPM durante 12 minutos. Se tomaron 1.8 ml de líquido con la ayuda de una micropipeta colocándolos en tubos de 2mL congelándolos a -20 °C. Se realizaron 4 repeticiones de cada una de las muestras que se centrifugaron. A los extractos se les midió la actividad enzimática cuantificando los azúcares producidos por la acción de xilanasas durante la incubación, por la reducción de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) de acuerdo a lo reportado por Miller *et al.* (1960). Se utilizó como sustrato xilano de madera al 0.5%, en un tubo de ensayo se colocaron 800 μ L de sustrato, 100 μ L de buffer de citratos (50 mM, pH 5.3) y se adicionaron 100 μ L de extracto enzimático, se incubó por 20 minutos a



50°, enseguida se agregó 1 ml de DNS, las muestras hirvieron (100°C) durante 5 minutos, la reacción se detuvo al colocar las muestras en baño de agua con hielo. Se leyeron sus absorbancias en un espectrofotómetro UV-vis LAMBDA 35 Perkin Elmer a una longitud de onda de 595 nanómetros y se ajustaron utilizando blancos con extractos enzimáticos inactivos por calentamiento (90-100°C por 10 min). La actividad enzimática de xilanasas, se definió como la cantidad de μM de azúcares producida por mL de extracto enzimático por min de reacción, cuantificadas por la reducción de DNS.

Resultados y Discusión

No hubo diferencia estadística entre los promedios a través del tiempo de los dos sustratos utilizados, sin embargo, el pico más alto de actividad de enzima fue el día 18 para el tratamiento con maíz ($p > 0.05$; Figura 1). Estos resultados difieren de perfiles de actividad de xilanasas reportados con otros hongos y tipos de sustratos, en donde se han observado picos de actividad máxima del primer hasta el cuarto día (Marcia *et al.*, 2010). Sin embargo los perfiles de actividad varían de acuerdo a las condiciones de los cultivos debido a que la producción de enzimas de los hongos, se debe a la presencia de sustratos específicos (Obodai *et al.*, 2003). Además, la capacidad de hidrólisis de las enzimas específicas dependen de la composición química y estructural del fibra, por ejemplo, Mata *et al.* (2011) probaron la degradación de fracciones de paredes celulares de rastrojo de maíz utilizando extractos enzimáticos de *Auricularia polytricha* (AP) y *Stereum hirsutum* (ZT), y se encontró que el AP degradó la lignina, la celulosa y la hemicelulosa, sin embargo, ZT no pudo degradar la lignina ni la hemicelulosa, pese a que presentó altas actividades de xilanasas. Gao *et al.* (2012), probaron el pretratamiento de rastrojo de maíz, con extractos de xilanasas de 40 cepas de *Gloeophyllum trabeum*; *Gloeophyllum trabeum* KU-41, disminuyó el 43% del xilano del rastrojo de maíz e incrementó de 0.7 a 2.5 veces la posterior capacidad de absorción de celulasas. Lo que indicaba que la conversión de celulosa a glucosa se incrementa debido a la remoción previa del xilano de la superficie de la pared celular, por lo que se recomendó un pretratamiento con xilanasas.

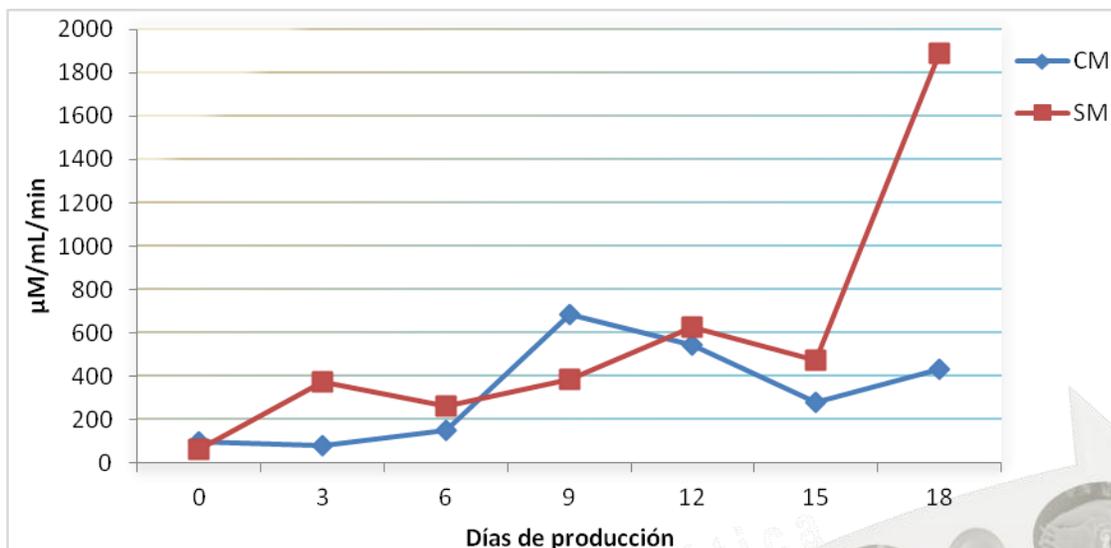


Figura 1. Efecto del sustrato sobre actividad enzimática de *T.troggi* en la producción de xilanasas. Sustrato: (CM) con maíz (SM) sin maíz.

Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que es viable la producción de xilanasas por acción de *Trametes trogii* en un sustrato de rastrojo de maíz. La adición de la mazorca a los sustratos de rastrojo, no afecta la producción promedio a través del tiempo de xilanasas, sin embargo el pico de máxima actividad fue 18 d después de ser inoculado el hongo, en los medios sin mazorca.

Literatura citada

- Ángeles, S., 2006. Fermentación ruminal, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. Recuperado el 19 de septiembre del 2013, <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgZooG014.pdf>.
- Contreras, P. A., 2010. Ambiente ruminal y microorganismos. En Contreras PA, M Noro, Rumen: Morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa (pp. 13-24). 3ed, Valdivia: América. Recuperado el 19 de septiembre del 2013, http://www.consorciolachero.cl/chile/documentos/publicaciones/rumen_web.pdf.
- Dervin B. D., 2008. Perspectivas del uso de enzimas fibrolíticas exógenas. ¿Se justifica su uso en ganaderías DP?. En Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito. C
- González-Stagnaro, N Madrid Bury, E Soto Belloso (eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Cap. LXVII: 791-805. Gao Z., Mori T., and R. Kondo. 2012. The



pretreatment of corn stover with *Gleophyllum trabeum* Ku-41 for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for biofuels*. 5: 28.

Graciela I. P., Jáuregui R. J., Medina R. I., Vázquez D. R., Rodríguez V. R., 2009, 21 a 26 abril. Identificación de hongos ligninolíticos con capacidad para la biodegradación de resinas fenólicas. Trabajo presentado el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, Acapulco. Accesible a texto completo en [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_IV/CIV-06.pdf)

TRABAJOS/AREA_IV/CIV-06.pdf

Gonzales G. E., Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas in vitro. "Tesis Doctoral", Universidad autónoma de Barcelona, 2004. Accesible a texto completo en <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5653/egg1de1.pdf?sequence=1>

Morales V. R., Medios de cultivo líquidos para el desarrollo de inóculos de hongos de pudrición blanca aplicables en biopulpaje kraft. "Tesis doctoral", Universidad de Chile, 2006. Accesible a texto completo en http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2006/morales_r/sources/morales_r.pdf

Ma F., Wang J., Zeng Y., Zhang X., Yan L., and J. Wu. 2011. Influence of fungal pretreatment on thermogravimetric characteristics and fast pyrolysis vapors of corn stover. *Biofuels* 2(5): 557-567.

Miller G.L., Blum R., Glennon W.E., and A.L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical biochemistry* 2: 127-132.

Remacha, G. A., 1988. Degradación de la madera por los organismos xilófagos vegetales. *Boletín de información técnica - AITIM* (Núm. 133). Recuperado el 19 de septiembre del 2013, http://infomadera.net/uploads/articulos/archivo_1368_17243.pdf

Marcia C., Marcelo T., Haroldo M., Alejandro R., 2010. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12 (2). Recuperado el 14 de septiembre del 2013, http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752010000200013&script=sci_arttext

Obodai, M., J. Cleland-Okine, K.A. Vowotor. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J. Microbiology Biotechnol.* 30: 146-149.



CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS DE FERMENTACIÓN Y DIGESTIBILIDAD *In Vitro* DE LEUCAENA-PASTO ESTRELLA, POR CONSORCIOS MICROBIANOS RUMIANLES

Ramírez Romero M.¹, Reyes Quiroz C.¹, Ruiz González W.¹, Sandoval González L.¹ Miranda Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza e Investigación en Zootecnia, ²Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo.

Resumen

Se investigó el efecto de la inclusión de *Leucaena leucocephala* (LI) de 35 días de edad de rebrote, en los parámetros (Vm, S y L), volúmenes fraccionales (Va, Vb y Vc) y eficiencia (Ef) de producción de gas de fermentación y digestibilidad *in vitro* (DIVMS) de *Cynodon nlemfuensis* (Cn) de 35 DER: Los tratamientos fueron las proporciones 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0. El diseño experimental fue completamente al azar. La inclusión de LI incrementó ($P<0.01$) Vm, S, Ef, Va, Vb, y DIVMS, y redujo ($P<0.01$) L. La inclusión de LI mejora la fermentación ruminal de Cn, por lo que la asociación de estos forrajes en sistemas silvopastoriles puede traer beneficios en la producción de ovinos.

Palabras Clave: fermentación, cinética fermentativa.

Introducción

El rumen constituye un saco de fermentación por excelencia que facilita un ambiente óptimo con condiciones de anaerobiosis, temperatura y pH constantes que garantizan la función ruminal. Al evaluar la variedad de leguminosa *Leucaena leucocephala* asociada con una variedad de gramínea *Cynodon nlemfuensis* en 5 diferentes proporciones (tratamientos) y con etapa fisiológica de 35 días de rebrote, se presenta el volumen máximo de gas producido, la velocidad de fermentación, fase de retardo, digestibilidad *in vitro* de la MS y la eficiencia de cada tratamiento en 72 horas, para describir el efecto de las actividades fermentativas de bacterias ruminales *in vitro*.

Material y Métodos

Los tratamientos de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis*: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0, se colocaron en frascos de 125 ml de capacidad, cada uno con tres repeticiones y 0.5 g de muestra. Se agregaron 90ml de inóculo ruminal, preparado con líquido ruminal extraído de ovinos en ayuno con una dieta alta en forraje y Solución Mineral Reductora a base de 3 soluciones: KH_2PO_4 ,



KH_2PO_4 - $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -NaCl- MgSO_4 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 2.5 g de Cisteína-NaOH-2.5 g de Na_2S -0.1 ml de rezarsurina; se les agregó CO_2 y fueron tapados herméticamente e incubados por 72 horas a 39°C .

El diseño experimental empleado fue el de completamente al azar, la unidad experimental fue cada frasco, además de 2 blancos sin sustrato.

Con un manómetro se midió la presión de gas que se generó dentro de cada uno de ellos; la rutina de medición fue hecha bajo los siguientes intervalos de tiempo: 0, 2, 4, 6, 10, 14, 16, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 horas registrando la producción de gas por gramo de MS incubada.

Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS 9.2 obteniendo el análisis de varianza para las variables V, S, L, Ef, Va, Vb, Vc y DIVMS. La comparación de media se obtuvo con el enunciado

Resultados y discusiones

La producción acumulada de gas por gramo de MS (V_m) mostró diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.01$; Cuadro 1). También se encontraron diferencias ($P \leq 0.01$) en la velocidad de fermentación (S), fase de retardo (L) y eficiencia de la transformación de la MS digerida (Ef), siendo el tratamiento 100:0 el que resultó mejor estadísticamente para las variables V_m , S y Ef, para la variable L el mejor tratamiento estadísticamente fue 0:100.

El valor de las variables V_m , S y Ef fue mayor al incrementar la proporción de *Leucaena leucocephala* y disminuir la de *Cynodon nlemfuensis*, caso contrario ocurrió para L.



Cuadro 1. Producción acumulada de gas (mL) por gramo de materia seca incubada 72 h de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nleufensis* solos y combinados a los 35 días de rebrote y eficiencia.

Tratamiento		Vm ¹	S ²	L ³	Ef ⁴
LI ⁵	Cn ⁶	ml g ⁻¹	h ⁻¹	h	%
0	100	126.667 ^d	0.0243667 ^d	9.3286 ^a	22.469 ^d
25	75	178.333 ^c	0.0233667 ^d	5.9073 ^b	41.352 ^c
50	50	214.933 ^b	0.0290667 ^c	5.7130 ^b	56.362 ^b
75	25	225.333 ^b	0.0318667 ^b	5.1997 ^b	62.180 ^b
100	0	268.567 ^a	0.0336333 ^a	5.3106 ^b	85.512 ^a

¹Volumen máximo de gas, ²Velocidad de fermentación, ³Fase de retardo, ⁴Eficiencia de transformación de la materia seca digerida.

⁵*Leucaena leucocephala*, ⁶*Cynodon nleufensis*

Mililitros de gas por gramo de sustrato, 1/horas, horas, porcentaje.

Se encontró que a mayor proporción de *Leucaena leucocephala* en combinación de *Cynodon nleufensis* en la fermentación in vitro la eficiencia aumenta relativamente, puesto que un mayor porcentaje dentro de esta, indica una mayor producción de gas, teniendo como referencia que el producto principal en la fermentación es bióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) lo que provoca un mayor impacto en la contaminación ambiental puesto que son los principales gases de efecto invernadero y contribuyentes al calentamiento global, por lo que en este aspecto el suministro de *Leucaena leucocephala* determina los grados de producción de gas, fase de retardo o de comienzo en la fermentación pero favorece la velocidad de la misma; la fase de retardo o comienzo de la fermentación conjuga el tiempo en el que el rumiante puede disponer de los nutrientes (productos de la fermentación) para obtención de energía. Cabe destacar que para que la flora y fauna microbiana se contengan en un ambiente estable y en simbiosis con el rumiante debe haber una cantidad considerable de carbohidratos por lo que tampoco se debe omitir el suministro de leguminosa; según Annison y Lewis (1981) los carbohidratos son indispensables para los microorganismos del rumen, ya



que a partir de estos sustratos el animal obtiene la energía en forma de ácidos grasos volátiles los cuales aportan dos terceras partes de la energía total que los rumiantes no obtendrían si no existiera tal simbiosis.

La producción fraccional de gas por gramo de MS mostró diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.01$; Cuadro 2). El volumen fraccional de rápida fermentación (Va), el volumen fraccional de media fermentación (Vb), y la digestibilidad *in vitro* de MS fueron mayores al incrementar la proporción de *Leucaena* y disminuir la de *Cynodon* en los tratamientos; sin embargo, el volumen fraccional de fermentación lenta (Vc) fue mayor para el tratamiento 25:75 y menor para el tratamiento 0:100, encontrándose el resto estadísticamente iguales a ambos.

Cuadro 2. Producción fraccional de gas (mL) por gramo de materia seca incubada 72 h de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis* solos y combinados a los 35 días de rebrote y digestibilidad *in vitro*.

Tratamiento		Va ¹	Vb ²	Vc ³	DIVMS ⁴
Li ⁵	Cn ⁶	ml g ⁻¹	ml g ⁻¹	ml g ⁻¹	%
0	100	14.210 ^d	74.910 ^d	33.860 ^c	35.533 ^d
25	75	31.403 ^c	98.420 ^c	49.297 ^a	46.467 ^c
50	50	39.827 ^{bc}	149.653 ^b	42.633 ^{abc}	52.467 ^{bc}
75	25	46.140 ^b	162.280 ^b	40.177 ^{bc}	55.200 ^b
100	0	57.020 ^a	198.770 ^a	42.983 ^{ab}	63.667 ^a

¹Volumen fraccional de rápida fermentación, ²Volumen fraccional de fermentación media ³Fracción de fermentación lenta, ⁴Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca.

⁵*Leucaena leucocephala*, ⁶*Cynodon nlemfuensis*

Mililitros de gas por gramo de sustrato, porcentaje.

Las combinaciones de leguminosa y gramínea, muestran que en la combinación de proporción 100:0 es la más digestible por existir mayor cantidad de carbohidratos a degradar por la fauna microbioana ruminal, lo que hace mayor el tiempo de fermentación y un aprovechamiento tardío de nutrientes por



parte del rumiante, además que a altos niveles de almidón se produce un trastorno metabólico a causa de concentración de ácido láctico en el rumen.

Las combinaciones 50:50 y 75:25 alcanzan grandes niveles en fermentación de azúcares simples y fibra están en contraste y existe un nivel intermedio en la fermentación de carbohidratos complejos, estableciendo un nivel promedio de fermentación para la flora ruminal general.

Conclusión

Utilizar una proporción mayor de *Leucaena leucocephala* favorece la velocidad de fermentación con lo que el rumiante puede disponer de los nutrientes de este alimento en un periodo de tiempo más corto ya que la digestibilidad de la materia seca es más eficiente; sin embargo, como consecuencia de una acelerada velocidad de fermentación la producción de gas es mayor comparada con tratamientos asociados con *Cynodon nlemfuensis* donde los niveles de gases contaminantes son menores, por lo que las combinaciones más eficientes de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis* son 25:75 y 50:50 respectivamente debido a que una cantidad muy elevada de *Leucaena leucocephala* produce timpanismo en los rumiantes y una cantidad muy baja de esta no ayuda en el aporte de proteínas para el animal, en cambio el balance entre una planta leñosa y un pasto a iguales proporciones es más favorable por que mantiene un equilibrio de aporte de nutrientes y una baja producción de gas, esto no solo representa un beneficio para el bienestar animal, si no que disminuye los niveles de gases de efecto invernadero (CO₂ y CH₄).

Literatura citada

- Beuvink, J.M.W. & Spoelstra, S.F. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganism in vitro Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:505
- Tilley, J.A. & Terry, R.A. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Br. Grassl. Soc., 18:104
- Van Keuren, R.N. & Heinemann, W.W. 1962. Study of a nylon bag technique for in vivo estimation of forage digestibility. J. Anim. Sci., 21:340



TIPO Y NIVEL DE ACEITE EN LA FERMENTACIÓN *In vitro* DE *Leucaena leucocephala* POR CONSORCIOS MICROBIANOS DEL RUMEN DE OVINOS

Juárez Luna M.A.¹, Melo Solís A.L.¹, Reyes Benítez E.¹, Razo Herrera G.², Miranda Romero L. A.²

Departamento de Zootecnia¹, Posgrado de Producción Animal², Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Chapingo, México. any_marylu@hotmail.com

Resumen

Se investigó el efecto del aceite de atún (AT) y de linaza (AL) a 0, 3, 6 y 9%, en la actividad fermentativa y digestibilidad de la materia seca *in vitro* (DIVMS) de *Leucaena leucocephala* de 49 días de edad rebrote, por bacterias ruminales. Se usó la técnica de producción de gas para medir el volumen máximo (V_m ; mL g⁻¹), tasa de producción (S ; h⁻¹) y tiempo de retardo (L ; h) de la producción de gas, volumen fraccional de gas de 0 a 14 h (V_a), 15 a 48 h (V_b) y 48 a 72 h (V_c) de incubación, así como la DIVMS. Los tratamientos fueron: 3%AL (T1), 6%AL (T2), 9%AL (T3), 3%AT (T4), 6%AT (T5) y 9%AT (T6), en un diseño completamente al azar. La fermentación fraccional (V_a , V_b , V_c) representó la fermentación de tres grupos de nutrientes: azúcares y oligo-sacáridos solubles, polisacáridos de fermentación media (almidones y pectinas) y, polisacáridos de la fibra. Para las variables de volumen de gas, tasa de fermentación, horas en los que inicia la fermentación y la digestibilidad, no se encontró diferencias ($P > 0.05$). La adición de aceite a 3, 6 y 9 % de inclusión a dietas altas en forraje, no deprime la acción microbiana.

Introducción

El uso de aceites en dietas para rumiantes trae consigo múltiples beneficios, dentro de los cuales se encuentran la mejora en las características físicas del alimento como reducir la polvosidad y separación de las partículas en la dieta, incrementar la palatabilidad del alimento (Bauman et al., 2008), y el constituir una fuente concentrada de energía.

El aporte de lípidos en el alimento es moderado en comparación con la ingesta total (Shimada et al., 2003). Cuando la alimentación se basa principalmente en forrajes, los lípidos más abundantes son los glucolípidos, mono y digalactogliceridos. En contraste con la absorción de ácidos grasos volátiles de cadena corta que se lleva a cabo en el rumen, la mayoría de los ácidos grasos que llegan al intestino delgado son saturados como consecuencia del metabolismo ruminal (Bauman et al., 2003).

En años recientes se ha puesto en práctica el empleo de grasas para la alimentación de rumiantes en sistemas intensivos de producción. Son básicamente mezclas de aceites y grasas, o bien, ácidos



grasos no esterificados, triglicéridos o ambos, que se someten a procesos químicos y físicos, que evita la acción fermentativa de la microbiota ruminal, permitiendo al producto sobrepasar el retículo-rumen.

Se sabe que al adicionar más del 7% de aceite en la dieta de rumiantes disminuye el intercambio de nutrientes y baja la digestibilidad de los forrajes; por tanto, el objetivo del estudio fue determinar el efecto de adicionar aceite de atún y linaza a diferentes concentraciones sobre la acción fermentativa de la microbiota ruminal.

Materiales y Métodos

La prueba de fermentación *In vitro* se realizó en el laboratorio de Microbiología Pecuaria de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México. Se utilizó como sustrato *Leucaena leucocephala* de 49 días de rebrote, los tratamientos fueron 3% de aceite de linaza (T1), 6% de aceite de linaza (T2), 9% de aceite de linaza (T3), 3% de aceite de atún (T4), 6% de aceite de atún (T5) y 9% de aceite de atún (T6), se utilizó tres repeticiones por tratamiento. Se pesó 0.5 g de MS de leucaena molida incluyendo el porcentaje de aceite de cada tratamiento y se depositó en frascos de color ámbar de 125 mL de capacidad. Se agregó a cada uno 90 mL de inóculo ruminal. Los frascos se cerraron herméticamente y colocaron en baño maría a 39 °C (Menke y Steigass, 1988). Se determinó la presión de gas en los frascos a 0, 2, 4, 6, 8, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 horas de incubación con un manómetro (0-1 kg cm⁻²). Con los datos de volumen se obtuvieron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas (V_m ; mL g⁻¹) tasa de producción de gas (S ; h⁻¹) y tiempo lag (L ;h), del modelo logístico $V_a = V_m / (1 + \exp(2 \cdot 4 \cdot S \cdot (T - L)))$, descrito por Schofield y Pell (1995), usando el paquete estadístico SAS (2009).

El inóculo ruminal usado en esta prueba se extrajo de dos borrego fistulado alimentados con una dieta alta en forraje, se filtró a través de ocho capas de gasa y una parte de este fue diluido en nueve partes de una solución mineral reducida, conteniendo cada litro: K₂HPO₄ (0.45 g), KH₂PO₄ (0.45 g), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g), NaCl (0.90 g), MgSO₄ (0.18 g) y CaCl₂ · H₂O₂ (0.12 g). Al término del período de incubación (72 h) se filtró el residuo de cada frasco en papel filtro Watman y se secó a 60 °C durante 48 h para calcular la digestibilidad de la MS.

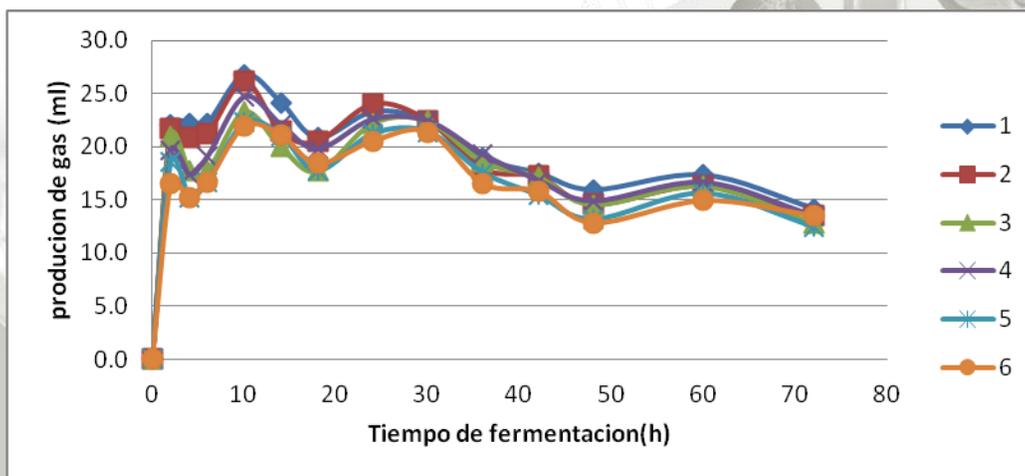
Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y las medias de los tratamientos se compararon usando la prueba de Tukey.



Resultados y discusiones.-

La figura 1, muestra el comportamiento fraccional de producción de gas *in vitro*, sin haber diferencia estadística ($P > 0.05$) entre tratamientos. La fermentación fraccional presentó tres grupos de nutrientes, el primer grupo se fermentó de la cero a las diez horas correspondiendo a carbohidratos altamente solubles, el segundo grupo se presentó de las 18 a 24 horas y presenta a los carbohidratos de mediana fermentación tales como hemicelulosas, pectinas y amilopectinas, finalmente el tercer grupo se presentó de las 48 horas a las 60 identificando como la presencia de aceite de linaza que deprime la acción bacteriana que degrada la celulosa.

Figura 1.



Producción fraccional de gas in vitro al incluir aceite de linaza y atún

Cuando se comparó el aceite de linaza y atún y los distintos niveles de inclusión (cuadro 1) las variables de volumen de gas, tasa de fermentación, horas en los que inicia la fermentación y la digestibilidad, no se encontró diferencias ($P > 0.05$). Para las variables de acumulación de gas, volumen de gas de 0-14 horas (V_a), volumen de gas acumulado de 15-48 horas (V_b) y volumen de gas acumulado de 48-72 horas (V_c) se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) para V_a y V_c entre los tratamientos que contenían 3% de linaza con 6 y 9% de aceite de atún, para V_b solo existe diferencia entre el tratamiento que contiene 3% de aceite de linaza y 9% de aceite de atún.



Cuadro1. Parámetros de la fermentación *in-vitro* al adicionar dos tipos de aceite y tres niveles

Tipo de aceite	Nivel (%)	Vm	S	L	Va	Vb	Vc	MSDES
			0.025	0.000				
Linaza	3	251.9	a 1	a 0	a 138.3	a 98.0	a 31.5	56.8 A
		243.1	0.025	0.149				
Linaza	6	7	a 3	a 1	a 132.0	ab 96.2	ab 29.8	56.9 A
		166.8	0.023	0.366				
Linaza	9	7	a 8	a 5	a 117.3	bc 94.9	ab 29.0	55.9 A
		235.8	0.024	0.945				
Atun	3	3	a 7	a 2	a 122.7	bc 96.0	ab 30.1	58.1 A
		216.3	0.100	0.936				
Atun	6	7	a 3	a 5	a 111.5	c 88.7	ab 28.0	56.5 A
		212.7	0.025	1.357				
Atun	9	3	a 1	a 4	a 109.8	c 87.0	b 28.4	56.0 A

Vm, Volumen máximo; S, tasa de fermentación; L, fase de retardo. Va, Vb y Vc, volúmenes fraccionales de gas de 0 a 14 h, 15-48 h y 48-72 h de incubación. DIVMS, digestibilidad in vitro de la MS a 72 h de incubación.

Bibliografía

- Bauman, D. E., J. W. Perfield, M. J. De Veth, and A.L. Lock. 2003. New perspectives on lípidos digestión and metabolism in ruminants. Proc. Cornell Nutr. Conf. pp. 175-189
- Church, D. C. 1988. El Rumiante Fisiología Digestiva y Nutrición. Editorial Acriba. Zaragoza, España.641p
- Gonzales, G. L. E. 2003. Constituyentes Químicos, Producción de Gas y Espuma por la Fermentación *In vitro* de Estratos de Alfalfa con Distinta Edad de Rebrote. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. México. 59 Pp.
- McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh. 1988. Nutrición animal. Cuarta edición. Editorial Acriba. Pp 555.
- Shimada, M. A. Nutrición Animal. Primera Edición. Editorial Trillas. México. Pp 117.



ACTIVIDAD FERMENTATIVA Y BIOMASA MICROBIANA EN FUNCION DE LA PROPORCION *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis*.

Hernández-Hernández C.J.¹, Luna-Nieto D.¹, Martínez-Aragón E.A.¹, Sandoval González L.¹, Miranda Romero L. A.²

¹Departamento de Enseñanza Investigación y Servicio en Zootecnia, ²Posgrado de Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo.

agroenginn@gmail.com

Resumen.

El crecimiento microbiano depende del aporte de nutrientes y de la velocidad a la cual los organismos del rumen se eliminan, las proteínas o el N no proteico y los carbohidratos son utilizados para la producción ruminal de microbios, AGV, metano, bióxido de carbono y amoníaco. Se realizó un experimento de fermentación *in vitro* para evaluar efecto de tratamiento en biomasa microbiana, producción de gas, digestibilidad verdadera de la materia seca, energía metabolizable y eficiencia verdadera de *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis* a 35 días de rebrote con cinco tratamientos. Se observó efecto de tratamiento con las variables EM (energía metabolizable), BM (biomasa microbiana) y VT (volumen total), Se observó diferencia de tratamientos de la variable dependiente DVMS (digestibilidad verdadera de la materia seca) ($P < 0.05$) esta última no con significancia mínima. No se observó efecto de tratamiento en la variable dependiente EFV (eficiencia verdadera) ($P > 0.05$). Se concluye que a mayor concentración de *Leucaena leucocephala* aumenta el volumen total de gas y masa microbiana.

Palabras clave: crecimiento bacteriano, biomasa microbiana, eficiencia verdadera, DVMS.

Introducción.

El forraje es la principal fuente de alimentación en los rumiantes bajo pastoreo, la presencia de leguminosas en la postura de gramíneas es deseable, ya que incrementa el contenido de proteína cruda de la mezcla, actúa como un suplemento para el bajo porcentaje de proteína de las gramíneas. Cuando la dieta del animal está formada únicamente por gramíneas la actividad ruminal se reduce por la ausencia de nitrógeno en la dieta, como consecuencia inmediata un déficit energético. Se sabe que un forraje maduro presenta alto contenido de lignina, lo cual está asociado con una baja disponibilidad de los carbohidratos estructurales (Van Soest 1969). La celulosa y hemicelulosa son fermentadas por los microorganismos del rumen, produciendo ácidos grasos volátiles (AGV) (Martín *et al.*, 1979). La



lignina es virtualmente indigestible y a su vez reduce la digestibilidad de la celulosa y hemicelulosa protegiéndolas físicamente contra la degradación de enzimas por la formación de enlaces covalentes con la hemicelulosa. (Capper *et al.*, 1977). La relación existente entre la disponibilidad de carbohidratos y de proteínas ejerce un fuerte impacto sobre la producción de células microbianas y por lo tanto sobre la nutrición del rumiante. Bajo las siguientes circunstancias se realizó este experimento, para conocer la actividad fermentativa y biomasa microbiana de *Cynodon nlemfuensis* y *Leucaena leucocephala* a los 35 días de rebrote.

Material y Métodos.

Se realizó un experimento de digestibilidad *in vitro* de las especies *Leucaena leucocephala* y *Cynodon nlemfuensis* a una edad de 35 días de rebrote. Las especies fueron cultivadas en un sistema silvopastoril en San Luis Potosí, las muestras se secaron en una estufa a 35 °C y posteriormente se molieron con una criba de 2 mm. Se pesó aproximadamente 0.2 g de sustrato y se agregó a frascos de vidrio color ámbar de 60 ml, utilizando diferentes proporciones (0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0) de *Cynodon nlemfuensis* y *Leucaena leucocephala* respectivamente considerando a cada proporción como un tratamiento. Se agregaron 30 ml de inóculo preparado previamente con una solución mineral reducida y líquido ruminal de ovino con una relación de 2:1. El líquido ruminal se obtuvo con bomba de vacío a partir de dos ovinos con fistula ruminal alimentados con heno de alfalfa y silo de maíz a libre acceso. Los frascos se taparon herméticamente al vacío y se incubaron por 24 horas a 39°C.

El diseño experimental fue completamente al azar. Considerando una unidad experimental cada frasco, asignando aleatoriamente los tratamientos a las unidades experimentales, con un total de tres repeticiones por tratamiento y dos blancos sin sustrato como testigos es decir un total de 18 unidades experimentales y 2 testigos. Se registró la producción de gas a las 6, 12, 18 y 24 h utilizando una jeringa de vidrio de 20 ml. El gas obtenido de las lecturas se depositó en frascos color ámbar de 80ml con 40ml de solución de KOH 0.05 M para calcular el volumen total de gas (VT), volumen de CO₂ (VCO₂) y volumen residual (VR) o VCH₄ y otros gases). A las 24 h se lavó con detergente neutro cada unidad experimental y posteriormente se filtró el residuo a través de una bomba de vacío y con papel filtro de filtración rápida que previamente se pesó y secó, el papel filtro con el residuo se secó en una estufa a 60°C durante 48 h, se pesó y mediante diferencia de papel filtro seco sin residuo y papel filtro seco con residuo se determinó la FDNr (fibra detergente neutro residual) para poder calcular la DVMS (digestibilidad verdadera de la materia seca) y a EFV (eficiencia verdadera). Para calcular las variables EM (energía metabolizable) y BM (biomasa microbiana) se utilizaron modelos matemáticos.



Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS, con diseño experimental completamente al azar, y con la prueba de rango estudentizado de Tukey para cada variable dependiente.

Resultados y discusión.

Se observó efecto de tratamiento en la variable VT (volumen total), es decir a mayor proporción de *Leucaena leucocephala* en el tratamiento mayor producción de gas ($P < 0.05$), en función de esto las variables VR y VCO₂ no tuvieron cambios significativos ($P > 0.05$) en cada tratamiento, cabe recalcar que en el tratamiento 1 y 2 (donde existe mayor proporción de *Cynodon nlemfuensis*) existe una cantidad porcentual mayor de VR (volumen residual) respecto a los demás tratamientos (Cuadro 1). Se observa efecto de tratamiento en la variable DVMS (digestibilidad verdadera de la materia seca), es decir aumenta con una proporción mayor de *Leucaena leucocephala* ($P < 0.05$) a diferencia de la variable EFV (eficiencia verdadera) en la cual se observa efecto de tratamiento de manera inversa ya que al aumentar la proporción de *Leucaena leucocephala* la EFV disminuye aunque no con significancia ($P > 0.05$) (Cuadro 1). Las variables EM (energía metabolizable) y BM (biomasa microbiana) presentan una relación directa con la proporción de *Leucaena leucocephala* en los tratamientos y con diferencia significativa según Tukey ($P < 0.05$) (Cuadro 2).

CUADRO 1. PRODUCCION TOTAL DE GAS (VT) EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS Y VARIABLES DEPENDIENTES.

PROPORCIÓN		VARIABLES			
Cn-LI	VT ¹ ml	VR ² %	VCO ₂ ³ %	DVMS ⁴	EFV ⁵ (mlg ⁻¹)
100:0	16.9733 ^E	33.153 ^A	66.847 ^A	14.667 ^B	609.5 ^A
75:25	21.0067 ^D	30.637 ^A	69.363 ^A	21.000 ^B	519.8 ^A
50:50	24.9733 ^C	26.417 ^A	73.583 ^A	31.000 ^{AB}	437.9 ^A
25:75	29.3733 ^B	25.803 ^A	74.197 ^A	38.833 ^{AB}	386.8 ^A
0:100	33.4067 ^A	25.640 ^A	74.360 ^A	54.333 ^A	328.2 ^A

¹volumen total, ²volumen residual o volumen de CH₄ y otros gases, ³volumen de CO₂,

⁴digestibilidad verdadera de la materia seca, ⁵eficiencia verdadera.

La EM es mayor cuando aumenta la proporción de proteína cruda del tratamiento es decir a mayor proporción de *Leucaena leucocephala* debido a que la calidad nutrimental de esta es mejor que la de *Cynodon nlemfuensis*. La biomasa microbiana BM presenta efecto de tratamiento, es decir con mayor proporción de *Leucaena leucocephala* ya que representa un sustrato más completo (mayor contenido de proteína cruda) para las bacterias y su crecimiento se ve acelerado, debido a que las proteínas son



particularmente vulnerables a la fermentación ruminal las cuales se pueden reducir aún más y proveer de energía a los microorganismos ruminales, a medida que las proteínas son atacadas por enzimas extracelulares son absorbidos al interior del microorganismo y son utilizados para la producción de proteína microbiana.

Cuadro 2. Energía metabolizable (EM) y biomasa microbiana (BM) EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

PROPORCION	VARIABLES	
	EM ¹ (Mcal)	BM ² (mg)
Cn-LI		
100:0	1.2333 ^E	37.3633 ^E
75:25	1.3633 ^D	46.2500 ^D
50:50	1.4966 ^C	54.9967 ^C
25:75	1.6400 ^B	64.6933 ^B
0:100	1.7700 ^A	73.5967 ^A

^{A,B,C} Medias con distinta literal en la misma columna , son diferentes (P<0.05)

Conclusiones.

Bajo las condiciones de este experimento podemos comprobar que existe variación significativa en la BM y EM en los cinco tratamientos (P<0.05).

De tal manera, se concluye que a mayor proporción de *Leucaena leucocephala* a 35 días de rebrote existe una mayor cantidad de biomasa microbiana BM y por lo tanto más proteína cruda de origen bacteriano que puede ser aprovechada por el rumiante.

Literatura citada.

- Iturbide Angel M. 1981. Producción y Utilización de Forrajes en el Trópico: Compendio. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Cap. Rol de las leguminosas en las praderas, Programa de Producción Animal, Turrialba Costa Rica: El Centro.
- Henzell, E.F. 1970. Problems in comparing the nitrogen economies of legume-based and nitrogen-fertilised pasture systems. Proc. 11th. Int. grass. Congr. Surfers Paradise, Australia A112-A120.,.



ABONOS ORGÁNICOS EN CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR Y SU EFECTO EN LA MICROBIOTA DEL SUELO

Ramírez-Villalobos J. M.^{1*}, Martínez-Vizcarra K. F.¹, López J.J.¹.

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

jesicamrv_901@hotmail.com

Resumen

En los ingenios de Jalisco el uso de abonos orgánicos es casi nulo, el uso de fertilizantes químicos eleva los costos, además de que perjudica a la microbiota benéfica del suelo y en general contaminan el ambiente. Por medio de una revisión bibliográfica se evaluó el efecto que tiene la aplicación de abonos orgánicos en los cultivos de caña de azúcar, sobre la microbiota del suelo (hongos, bacterias y actinomicetos). Los resultados indican que la aplicación de los abonos orgánicos que se utilizan en los ingenios, propician un cambio en las características químicas y físicas del suelo, lo que promueve el óptimo desarrollo de los microorganismos.

Palabras claves: Hongos, bacterias, actinomicetos, Jalisco.

Introducción

En las últimas décadas se ha retomado la importancia en el uso de las fuentes orgánicas debido al incremento de los costos de los fertilizantes químicos, al desequilibrio ambiental que estos ocasionan en los suelos y a la necesidad de preservar la materia orgánica en los sistemas agrícolas. Muchos agricultores se han vuelto dependientes de estos productos porque desconocen la eficacia de los abonos orgánicos y sus beneficios. La adición de abonos orgánicos al suelo está catalogada como una práctica agrícola deseable por tener efectos positivos en los microorganismos benéficos del suelo y en las características del mismo, y es una práctica que no se lleva a cabo en sistemas de producción cañero en los ingenios de Jalisco (SAGARPA, 2009). Por ello, el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto que tiene la aplicación de los abonos orgánicos sobre la microbiota del suelo (hongos, bacterias y actinomicetos) en el cultivo de caña de azúcar en Jalisco.



Materiales y métodos

Se realizó una revisión bibliográfica, para determinar el efecto de los abonos orgánicos que se utilizan en el cultivo de la caña de azúcar en Jalisco, sobre la microbiota del suelo (bacterias, hongos y actinomicetos). Para el análisis de los datos se tomó como referencia los seis ingenios azucareros que existen en Jalisco que son: Bellavista, José María Martínez, José María Morelos, Melchor Ocampo, San Francisco Ameca y Tamazula.

Resultados y discusión

En los ingenios de Jalisco solo el 2.2 % de los productores utilizan abonos orgánicos, de los cuales el 1.3 % los aplica esporádicamente y el 0.9 % la mayor parte del tiempo (SAGARPA, 2009). Los más utilizados son el Agri-Bat® y el Supermagro®, además de la vermicomposta y la composta a base de estiércol bovino. Los cuales tienen diversos efectos en la microbiota del suelo como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Abonos orgánicos utilizados en los Ingenios de Jalisco, y su efecto sobre la microbiota del suelo.

Tipo de abono	Composición	Aplicación	Efecto en la microbiota
Agri-Bat® (comercial)	Guano de murciélago, estiércol bovino, lodos marinos, ácidos fúlvicos y azúcares.	Sobre la superficie del suelo.	Podría actuar como un inoculante, debido a que el guano contiene una gran flora microbiana, compuesta por millones de microorganismos (hongos, actinomicetos y bacterias) (Bernaza y Paez 2003).
Supermagro® (liquido/orgánico /mineral)	Estiércol de vaca, leche, melaza, sulfato de zinc, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, cloruro de calcio, ácido bórico, trióxido de molibdeno, sulfato de cobalto, sulfato de hierro.	Foliar o directa al suelo alrededor de la raíces.	En mezclas de abonos orgánicos y minerales, se ha observado que las poblaciones microbianas fijadoras de N de éste alcanzan hasta 38×10^8 UFC/g, y son incorporadas al suelo, logrando que su densidad aumente en la medida en que haya carbono orgánico oxidable (Gracia <i>et al.</i> , 2011).
Vermicomposta	Es muy variado, en general contiene	Directa en el suelo.	Los azúcares que excreta la lombriz, favorecen a la población microbiana



reguladores de crecimiento, alto contenido de ácidos húmicos, fúlvicos, humus, micro y macro elementos (Rodríguez *et al.*, 2007).

(Pérez *et al* 2008).

Se han disminuido algunas enfermedades inducidas por fitopatógenos del suelo como: *Phytophthora nicotianae*, *P. drechsleri*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Plasmodiophora brassicae*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. cepivorum* (Villa *et al*, 2008).

Composta

Estiércol de bovino.

Directa en el suelo.

Mayor cantidad de microorganismos aerobios mesófilicos, similar en cantidad de hongos y levaduras, y menos cantidad de actinomicetos; en comparación con los de origen vegetal (Pérez *et al.*, 2008).

Los abonos orgánicos modifican las características físicas y químicas del suelo, por lo que estas a su vez van a influir en la composición de la microbiota que se encuentra en el suelo. En el Cuadro 2 se muestra el efecto que los abonos orgánicos tienen sobre la temperatura, pH, humedad, materia orgánica y la relación C/N, y se observa a su vez el efecto sobre bacterias, hongos y actinomicetos.

Cuadro 2. Efecto de los abonos orgánicos sobre diferentes variables fisicoquímicas y cómo influyen en la microbiota.

Variables	Efecto en las variables	Efecto en la microbiota		
		Bacterias	Hongos	Actinomicetos
Temperatura	No afecta	No afecta	No afecta	No afecta
pH	Estabilización (Stamatiadis <i>et al</i> , 1999)	Aumentan (Ramos y Zúñiga, 2007)	Estables (Alexander, 1980)	Estables (Alexander, 1980)
	Mayor retención de humedad (Hernández <i>et al</i> , 2010)	Aumentan (Ramos y Zúñiga, 2007)	Aumentan (Ramos y Zúñiga, 2007)	Aumentan (Ramos y Zúñiga, 2007)
Materia	Aumenta	Aumentan	Aumentan	Aumentan



orgánica	(Hernández <i>et al.</i> , 2010)	(Acuña <i>et al.</i> , 2006)	(Acuña <i>et al.</i> , 2006)	(Acuña <i>et al.</i> , 2006)
Relación	Aumenta	Aumentan	Aumentan	Aumentan
C / N	(Kass, 1998)	(Alexander, 1980)	(Alexander, 1980)	(Alexander, 1980)

Conclusiones

Los abonos orgánicos que son utilizados en los ingenios de Jalisco, según la literatura revisada, tienden a mejorar las características químicas y físicas del suelo, favoreciendo con ello el aumento de la comunidad microbiana.

Debido a que el problema con la infertilidad de los suelos, causado por el uso excesivo de los fertilizantes inorgánicos, ha ido en aumento, es recomendable tener como alternativa el uso de biofertilizantes (abonos orgánicos), que son más baratos y, además, benéficos para la microbiota del suelo, o en todo caso optar por una fertilización combinada.

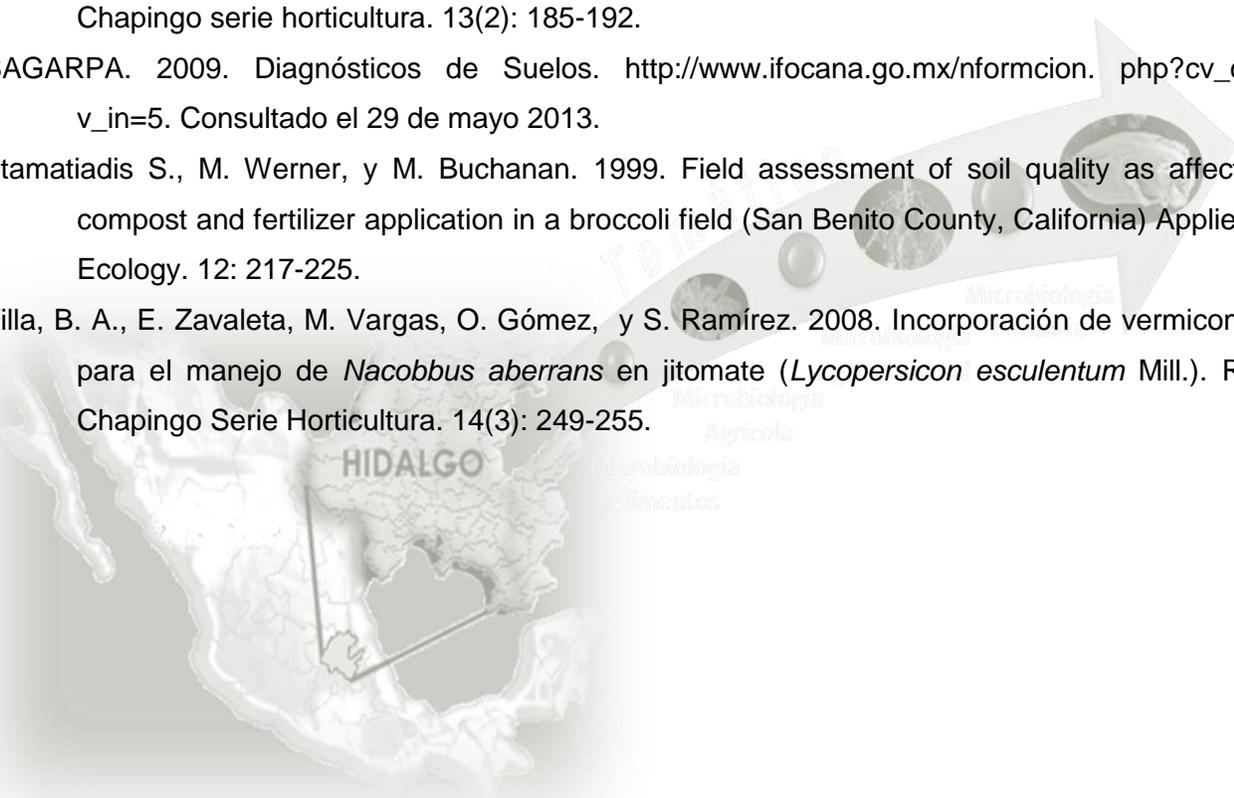
Ya que estas prácticas influyen en la fertilidad del suelo, podrían contribuir a una mayor productividad del cultivo de caña de azúcar y a la disminución de enfermedades producidas por fitopatógenos.

Literatura citada

- Acuña, O., W. Peña, Serrano E, L. Pocasangre, F. Rosales, Delgado E, J. Trejos y A. Segura. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. San José, Costa Rica. <http://www.monografias.com/trabajos95/determinacion-indicadores-biologicos-suelos-agricolas/determinacion-indicadores-biologicos-suelos-agricolas2.shtml#ixzz2WB0SQtsF> (consultado 2 junio 2013).
- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor. México. 491 p.
- Bernaza, M. G. y O. Páez. 2003. ¿Cuáles son las principales características del guano de murciélago como mejorador de los suelos? <http://www.bat-guno.com/espagnol/articulo-guano4.html>. (Consultado 10 Junio 2013).
- Gracia, F., Jaramillo S., Carrillo A. 2011. Efectos del abono orgánico mineral sobre la población microbiana de un haplustalf vértico. *Cultura Científica*. 1:81-89.
- Hernández, R. O. A., D. Ojeda, J. López, y A. Arras. 2010. Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *TECNOCENCIA Chihuahua* 4(1): 1-6.
- Kass D. C. L. 1998. Fertilidad de suelos. EUNED. San José, Costa Rica. 272 p.



- Pérez, A., C. Céspedes, P. Núñez. 2008. Caracterización física-química y biológica de enmiendas orgánicas aplicadas en la producción de cultivos en República Dominicana. R.C. Suelo Nutr. Veg. 8 (4):10-29.
- Ramos, E. y D. Zúñiga. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. Ecología Aplicada. 7(1,2): 123-130.
- Rodríguez D. N., P. Cano., E. Favela, U. Figueroa, V. Paul, A. Palomo, C. Márquez, A. Moreno. 2007. Vermicomposta como alternativa orgánica en la producción de tomate en invernadero. Revista Chapingo serie horticultura. 13(2): 185-192.
- SAGARPA. 2009. Diagnósticos de Suelos. http://www.ifocana.go.mx/nformcion.php?cv_cl=2&v_in=5. Consultado el 29 de mayo 2013.
- Stamatiadis S., M. Werner, y M. Buchanan. 1999. Field assessment of soil quality as affected by compost and fertilizer application in a broccoli field (San Benito County, California) Applied Soil. Ecology. 12: 217-225.
- Villa, B. A., E. Zavaleta, M. Vargas, O. Gómez, y S. Ramírez. 2008. Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura. 14(3): 249-255.





PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* CON DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE CROMO EN LA DIETA DE OVINOS EN CRECIMIENTO

Zacarías-Reynoso A. L.¹, Hernández-Gómez L.¹, Ramírez-Briebesca J. E.², Piloni-Martini J.¹, Molina-Mendoza P.¹, Almaráz-Buendía I.¹, Del Razo-Rodríguez O. E.¹

¹Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. ²Posgrado en Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
oscare@uaeh.edu.mx

Resumen

Se realizaron dos experimentos *in vitro* con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de *Cr* complementario en la producción de gas acumulada (PGA), pH, volumen de gas máximo (V_{max}) y tasa de producción de gas (*S*), utilizando picolinato de *Cr* en una dieta para ovinos en crecimiento. En el experimento 1, las concentraciones utilizadas fueron 0, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mg $Cr kg^{-1}$ MS; mientras, en el experimento 2 fueron 0, 0.3, 5, 10, 15 y 20 mg $Cr kg^{-1}$ MS. Se incubó a 39°C por 48 h una muestra de 0.5 g de sustrato con 40 mL de un inoculo (líquido ruminal mezclado con soluciones amortiguadora, macro mineral, micro mineral, resazurina y reductora), en frascos de 120 mL. Se midió la producción de gas a 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h de incubación por desplazamiento de agua. Los datos se analizaron con el procedimiento MIXED de SAS. En el experimento 1 no hubo efecto de la concentración de *Cr* en PGA, V_{max} y *S*; sin embargo, en el experimento 2 la PGA y V_{max} disminuyeron linealmente y el pH incrementó linealmente ($P \leq 0.05$), conforme incrementaba la concentración de *Cr*. Con 20 mg de *Cr* la PGA fue menor que con las otras concentraciones ($P \leq 0.05$). Los resultados del experimento 1 no permiten identificar una concentración de *Cr* óptima que mejore la fermentación bacteriana; pero, con 20 mg de *Cr* disminuye la actividad bacteriana.

Palabras clave: volumen máximo, tasa de producción de gas, pH, picolinato de cromo.

Introducción

El cromo (*Cr*) es un microelemento esencial para los animales de interés zootécnico. Su función está asociada al metabolismo de la glucosa ya que incrementa la actividad de la insulina por formar parte del factor de tolerancia a la glucosa. En ovinos, el requerimiento de *Cr* no está bien definido (NRC,



2007), sin embargo la recomendación en productos comerciales es de 0.3 mg Cr complementario kg⁻¹ MS (materia seca), mientras que en estudios experimentales se han utilizado en concentraciones de 0.25 a 0.5 mg kg⁻¹ MS (Bunting, 2007). En general, el contenido de Cr en dietas experimentales ha sido muy variable (0.3 a 1.6 mg kg⁻¹ MS) y se considera que es baja la biodisponibilidad del Cr de los alimentos para rumiantes. La fermentación ruminal afecta la biodisponibilidad de muchos minerales esenciales para los animales, ya que las bacterias ruminales son capaces de incorporarlos en su masa microbiana o cambiar su estructura química (Stolz, 2002). También, hay evidencia de que la complementación con Cr produce cambios en la degradabilidad de nutrientes (Chavez Solis, 2012). El presente estudio tiene el objetivo de determinar el efecto de diferente concentración de Cr complementario sobre la producción de gas acumulada *in vitro* y algunos parámetros de la cinética de la producción de gas, utilizando picolinato de cromo en una dieta para corderos en crecimiento.

Material y Métodos

Se realizaron dos experimentos de digestibilidad *in vitro* por la técnica de producción de gas. El sustrato utilizado fue una dieta para ovinos en crecimiento a base de heno de alfalfa, grano rolado de sorgo, pulpa de cítrico, grano seco de destilería, urea y premezcla mineral sin fuente de Cr (90% MS, 14.5% PC, 2.6 Mcal EM kg⁻¹ MS; NRC, 2007).

Los tratamientos consistieron en diferentes concentraciones de Cr complementario en la dieta, utilizando picolinato de Cr, el cual se mezcló en las cantidades necesarias para alcanzar las concentraciones deseadas. En el experimento 1 se probaron cinco concentraciones (0, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mg Cr kg⁻¹ MS); mientras, en el experimento 2 fueron seis (0, 0.3, 5, 10, 15 y 20 mg Cr kg⁻¹ MS).

Para la inoculación, se mezcló una solución amortiguadora (bicarbonato de amonio y bicarbonato de sodio), una solución macro mineral (fosfato de sodio, fosfato de potasio y sulfato de magnesio), una solución micro mineral (cloruro de calcio, cloruro de manganeso, cloruro de cobalto y cloruro férrico) y una solución de resazurina. También, se obtuvo líquido ruminal de un bovino recién sacrificado en rastro, se filtró con cuatro capas de manta de cielo y se mezcló con la mezcla de soluciones a razón de 1:2, bajo flujo constante de CO₂ y a 39°C. Finalmente, se adicionó una solución reductora.

En el experimento 1, se prepararon 50 frascos de vidrio de 120 mL con boca de 20 mm de diámetro (10 repeticiones por tratamiento) más 9 blancos; mientras, en el experimento 2 se prepararon 36 frascos (6 repeticiones por tratamiento) más 6 blancos. En cada frasco se depositó una muestra de 0.5 g de la dieta experimental, previamente molida a 1 mm de tamaño. Se agregaron 40 mL del inóculo preparado, seguido de flujo de CO₂ por 10 s. Inmediatamente después, se taparon herméticamente con tapón de hule sólido y aro de aluminio, y se incubaron a 39°C por 48 h. La medición de gas se



realizó a 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h de incubación, mediante un sistema de desplazamiento de agua. Se consideró el volumen de agua desplazada como el volumen de gas producido, el cual se corrigió restando el volumen de gas producido por los blancos. En la última medición, los frascos se colocaron en refrigeración por 20 min, posteriormente se destaparon y se registró el pH final.

Las variables de respuesta fueron producción de gas acumulada (PGA, mL) y pH, así como la producción máxima (V_{max} , mL) y tasa de producción de gas (S , h^{-1}) obtenidas con el modelo logístico de acuerdo a Villegas-Castañeda *et al.* (2010). Los datos PGA se analizaron con el procedimiento Mixed de SAS (Littlell, 1996) considerando como efectos fijos la concentración de *Cr* en la dieta (CONC), tiempo (T) y la interacción CONC*T; y como efecto aleatorio la unidad experimental. Los datos de pH, V_{max} y S también se analizaron con el procedimiento Mixed de SAS, considerando solamente la CONC como efecto fijo y la unidad experimental como efecto aleatorio. Las medias de mínimos cuadrados se obtuvieron con el enunciado LSMEANS usando la opción PDIFF para la comparación de medias. Para la PGA se utilizó la opción SLICE para probar el efecto de CONC dentro de cada tiempo, cuando la interacción fue significativa. Finalmente, se usaron polinomios ortogonales para obtener la probabilidad de la respuesta lineal y cuadrática de las medias.

Resultados y Discusión HIDALGO

En el experimento 1, no hubo efecto de CONC sobre la PGA, ni interacción CONC*T ($P > 0.05$), solamente hubo efecto de T ($P \leq 0.05$). La PGA fue de 52.11, 117.50, 187.66, 244.83, 281.70, 337.67 y 373.75 (± 1.55) mL en la hora 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 48. El valor promedio de V_{max} fue de 349.92 (± 4.30) mL y el de S fue de 0.079 (± 0.002) h^{-1} .

No hay información disponible respecto a la producción de gas *in vitro* utilizando *Cr*. Sin embargo, Chávez-Solis (2012) encontró mayor degradabilidad de la MS, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) utilizando 0.99 mg *Cr* kg^{-1} MS, a partir de levadura enriquecida con *Cr*, pero no encontró efecto en pH y concentración de ácido grasos volátiles (AGV) y de nitrógeno amoniacal. En el presente estudio, la PGA no refleja un efecto del *Cr* complementario sobre la fermentación de carbohidratos de la dieta.

En el Cuadro 1 se presentan las medias de la PGA, pH, V_{max} y S , obtenidas en el experimento 2. No hubo efecto de CONC sobre la PGA ($P > 0.05$), pero sí de T e interacción CONC*T ($P \leq 0.01$). El efecto de la CONC de *Cr* se presentó solamente a las 24 y 48 h de incubación ($P \leq 0.05$), observándose menor PGA con 20 mg *Cr* kg^{-1} MS que con las otras concentraciones ($P \leq 0.05$). También, se observó respuesta lineal de la PGA a las 9, 12, 24 y 48 h de incubación ($P \leq 0.05$), observándose menor PGA a medida que incrementaba la CONC de *Cr*.



Cuadro 1. Producción de gas acumulada (mL g^{-1} MS) y parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro*, con concentraciones altas de cromo (Cr) en la dieta de ovinos en crecimiento.

Tiempo (h)	Concentración de Cr (mg kg^{-1} MS)						EE	P		
	0	0.3	5	10	15	20		CON	LIN	CUA
1	44.91	44.43	43.93	44.28	45.96	44.21	2.43	0.99	0.97	0.85
3	86.20	85.01	83.81	84.16	85.80	83.63	2.43	0.96	0.58	0.70
6	151.82	151.20	148.27	149.28	149.51	146.16	2.43	0.62	0.11	0.92
9	191.05	190.92	187.58	187.73	188.19	183.15	2.43	0.24	0.02	0.81
12	225.12	226.70	223.50	222.76	222.40	216.51	2.43	0.09	<0.01	0.34
24	270.13 ^a	271.60 ^a	268.23 ^a	267.61 ^a	267.80 ^a	259.59 ^b	2.43	0.02	<0.01	0.21
48	304.52 ^a	305.88 ^a	301.71 ^a	301.95 ^a	301.96 ^a	291.53 ^b	2.43	<0.01	<0.01	0.12
pH	6.66	6.68	6.69	6.69	6.70	6.72	0.02	0.20	0.01	0.92
Parámetros de la cinética de producción de gas										
V	287.57	289.05	285.45	285.22	285.55	275.92	3.07	0.07	0.01	0.25
S	0.64	0.65	0.64	0.64	0.63	0.64	6.52×10^{-4}	0.53	0.21	0.87

^{ab} Medias con literales distintas dentro de hilera son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

V: producción máxima (mL); S: tasa de producción de gas (h^{-1}).

P: probabilidad del efecto principal de la concentración de Cr (CON), respuesta lineal (LIN) y respuesta cuadrática (CUA).

Tampoco hubo efecto de CONC en pH ($P > 0.05$), pero sí respuesta lineal ($P \leq 0.05$), siendo mayor el pH a medida que se incrementaba CONC. Así mismo, no se observó efecto de CONC en Vmax y S ($P > 0.05$), pero si respuesta lineal en Vmax ($P \leq 0.01$), siendo menor a medida que incrementaba CONC. No hay información disponible en la literatura relacionada con la producción de gas *in vitro* con la complementación de Cr. Sin embargo, la disminución lineal en la PGA y Vmax, así como el incremento



lineal del pH, indican cambios importantes en la fermentación bacteriana, a tal grado que la PGA fue significativamente menor con 20 mg Cr kg⁻¹ MS a las 24 y 48 h de incubación. Esto puede deberse a un cambio en el tipo o cantidad de bacterias ruminales debido al Cr. Muchos de los microelementos, en altas concentraciones, pueden resultar tóxicos, incluso para los microorganismos. El consumo de elementos tóxicos puede inhibir la actividad fermentadora y el crecimiento de los microorganismos del rumen (Forsberg, 1978). Sin embargo, la concentración máxima tolerable de Cr establecida para rumiantes es de 3,000 mg kg⁻¹ MS en forma de óxido y de 1,000 mg kg⁻¹ MS para la forma de cloruro. También, se ha establecido que las formas trivalentes de Cr en las dietas son seguras y no tóxicas, como el caso del picolinato de Cr (NRC, 2001). En el presente estudio se utilizaron concentraciones altas, pero muy por debajo de las concentraciones indicadas como tóxicas.

Conclusiones

La producción de gas *in vitro* en el experimento 1 no permite identificar una concentración óptima de Cr, en el rango de 0.3 a 1.2 mg kg⁻¹ MS, que mejore la fermentación bacteriana. Mientras, con altas concentraciones de Cr, la actividad bacteriana se mantiene constante hasta con 15 mg kg⁻¹ MS, pero disminuye con 20 mg.

Literatura Citada

- Bunting L. D. 2007. Chromium and Dairy Nutrition: What do we know? Dairy Technical specialist. ADM Animal Health and Nutrition and Moormans, Inc. Quincy, IL. 62301.
- Chávez Solís A. U. 2012. Efecto del cromo y selenio en la degradación y fermentación ruminal en dietas para novillos en finalización. Tesis de Maestría. Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 48 p.
- Forsberg C.W. 1978. Effects of heavy metals and other trace elements on the fermentative activity of the rumen microflora of functional important rumen bacteria. Can. J. Microbiol. 24:298–306.
- Littell R. C., Milliken G. A., Stroup W. W., and Wolfinger R. D. 1996. SAS Systems 354 for mixed models. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press. Washington, DC. 408 p.
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press. Washington, DC. 381 p.
- Stolz J. F., Basu P. and Oremland R. S. 2002. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. International Microbiology. 5: 201–207.



USO DE *Beauveria bassiana* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS AGRÍCOLAS

Cruz-Méndez A. S.¹, Montesinos-Matias R.³, Miranda-Hernández J. F.², Arce-Cervantes O.^{1*}

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias

²Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa

³Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. SENASICA.

arcecerero@hotmail.com

Resumen

Las pérdidas que provocan anualmente las plagas en cultivos de importancia agrícola son considerables. Los bioinsecticidas son una alternativa en la agricultura sostenible y el manejo integrado de plagas. El uso de bioinsecticidas ha aumentado debido a que muchas especies de insectos han desarrollado resistencia a insecticidas convencionales; además, el público ha adquirido más consciencia de cuidar y preservar el ambiente y la salud humana. Los hongos entomopatógenos son un grupo con potencial para el manejo de plagas; entre los hongos más utilizados está *Beauveria bassiana*, el cual tiene la capacidad de infectar más de 200 especies de insectos y ser la especie más ampliamente distribuida de su género en el mundo.

Palabras clave: bioinsecticida, agricultura sostenible, insectos.

Introducción

Existen alrededor de 2,000 especies de microorganismos entomopatógenos, de los cuales 750 son especies de hongos (Candas y Bulla, 2003). La mayoría de ellos pertenecen al orden de los Entomophorales (Zygomycota) o son hifomicetos productores de conidios del Filum Ascomycota. Un factor a tomar en cuenta es que los hongos se encuentran asociados con insectos que viven en diversos hábitats, como el agua y el suelo; por su particular manera de infección, los hongos son los principales microorganismos que infectan insectos (Carruthers y Hural, 1990).

Comprendiendo el mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos se deduce la importancia de las unidades infectivas de éstos conocidas como conidios. Zhang *et al.* (2009) observaron que *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, presentaba un efecto positivo de la luz en la producción de conidios. Otra variable que influye en la producción de conidios es la relación de carbono: nitrógeno. La producción de conidios del hongo entomopatógeno *B. Bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. se realiza principalmente en cultivo en medio sólido (CMS) utilizando productos agrícolas y sus



residuos, como arroz (*Oryza sativa*) y bagazo de caña (*Saccharum officinarum*). El objetivo del presente trabajo es conocer las principales plagas sobre las que *Beauveria bassiana* ha tenido efecto de control.

Materiales y métodos.

Se realizó una revisión bibliográfica para conocer los principales estudios que se han realizado en México sobre el control biológico de insectos plaga por medio del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Resultados y discusión.

Los hongos entomopatógenos son microorganismos que liberan enzimas y toxinas capaces de causar la muerte a insectos, para luego producir esporas sobre el cadáver, lo que ayuda a su diseminación. La invasión del hongo en el insecto hospedero ocurre a través de la cutícula, partes bucales, membranas intrasegmentales o a través de los espiráculos, sitios donde existe alta humedad lo cual promueve la germinación de las esporas y permite la penetración de las hifas (St. Leger, 1993) Una de las características en el proceso infectivo de los hongos entomopatógenos es que los conidios actúan por contacto, adhiriéndose a la superficie de la cutícula del insecto a partir de fuerzas hidrofóbicas, lo anterior es posible debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas conocidas como hidrofobinas (Charnley, 1997).

En el proceso infectivo, primeramente, los conidios se adhieren a la cutícula del hospedero para después germinar produciendo un tubo germinativo y un apresorio (estructura de penetración). La cutícula se rompe por la combinación de presión mecánica y la acción de enzimas degradadoras de cutícula. El hongo se desarrolla por crecimiento vegetativo en el homocelo para, finalmente, producirse conidios en la superficie del hospedero muerto. En el Cuadro 1 se presentan las especies de insectos plaga que *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (St. Leger, 1993).



Cuadro1. Plagas controladas por *Beauveriabassiana*.

Nombre común	Nombre científico	Estado
Picudo del algodón	<i>Anthonomusgrandis</i>	Adulto
Palomilla de la manzana	<i>Cydiapomonella</i>	Adulto
Barrenador del tallo de maíz	<i>Diatraeasaccharalis</i>	Larva
Gusano de la harina	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva
Broca del café	<i>Hypothenemushampeii</i>	Adulto
Chinche ligus	<i>Lyguslineolaris</i>	Adulto
Mosca del Mediterráneo	<i>Ceratitiscapitata</i>	Adulto
Gusano elotero	<i>Heliothiszea</i>	Larva
Gusano minador del tomate	<i>Tuta absoluta</i>	Larva
Gusano blanco de las rosáceas	<i>Asynonychuscervinus</i>	Larva

El sustrato comúnmente utilizado en la producción de conidios de hongos entomopatógenos es el arroz. Grimm (2001), utilizando granos de arroz, menciona que la producción de conidios por los hongos *Metarhiziumanisopliae* y *Beauveriabassiana* fue de 8×10^8 y 5×10^9 por gramo de sustrato seco inicial (gssi), respectivamente. Otro ejemplo del uso de granos de arroz para la producción de conidios son los estudios realizados por Neves y Alves (2000), los cuales utilizaron dicho sustrato para la selección de aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que produjeran gran cantidad de conidios. Garza-López *et al.* (2008) también utilizaron como sustrato granos de arroz y determinaron la influencia de la concentración de O_2 y CO_2 para la producción de conidios por *B. bassiana*, obteniendo una producción de 1.80×10^8 por gssi.

Conclusiones

La diversidad de hospederos del hongo *B. bassiana* lo mantienen como el principal hongo entomopatógeno para el control de plagas. A pesar de lo anterior los procesos de producción de conidios viables y altamente infectivos está determinada por el medio de cultivo en el que se desarrolla, por lo que la producción de estas unidades infectivas y su efectividad se mantiene con oportunidad de evaluación *in situ*.



Referencias

- Candas, M., Bulla, L.A. 2003. Microbial Insecticides. Encyclopedia of Environmental Microbiology Copyright © 2002 by John Wiley & Sons.
- Carruthers, R., Hural, K. 1990. Fungi as natural occurring enthomopathogens. En Baker RR, Dunn PE (Eds.) New directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases. Liss. Nueva York, EEUU. Pp. 115-138.
- Charnley A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In The Mycota IV, Environmental and microbial relationships. (Wicklow D and Soderstorm M., eds), pp. 185-201, Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania.
- Garza-López, M., Konisberg, M., Saucedo, G., Loera, O. 2008. Cambios fisiológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como respuesta a la composición atmosférica. Congreso de control biológico Zacatecas 2008.
- Grimm, C. 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. Crop Protection. 20:623-630.
- Neves, P.J., Alves, S.B. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhiziumanisopliae* (Metsch.) Sorok. Strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar.) Brazilian Archives Biology and Technology. 43:373-378.
- St. Leger, R.J. 1993. Biology and Mechanisms of Insect-Cuticle Invasion by Deuteromycete Fungal Pathogens, pp. 211-229. In: Parasites and Pathogens of Insects. Vol.2: Pathogens. Academic Press, Inc.
- Zhang, Y.J. Li, Z.H., Luo, Z.B., Zhang, J.Q., Fan, Y.H., Pei, Y. 2009. Light simulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Bio. Sci. and Tech. 19:91-101.



EVALUACIÓN *in vitro* DE PATRONES DE DEGRADACIÓN RUMINAL Y LIBERACIÓN DE AGV's EN SEMILLA DE CANOLA MÁS ASOCIACIONES CON GRANO DE MAÍZ Y SORGO

Ortega Álvarez N. I.^{1*}, Buendía Rodríguez G.², Vallejo Hernández L. H.³, González Muñoz S. S.³, Crosby Galván M. M.³, Montoya Flores M. D.².

¹Universidad Nacional Autónoma de México, ²CENIDFyMA, INIFAP, Querétaro, ³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

lina_y702@hotmail.com

Resumen

Un rubro económicamente difícil de cubrir en la formulación de dietas, es el aporte de energía. El uso de aceites o grasas se ha aceptado como una buena opción para este fin. Sin embargo, en rumiantes está comprobado que los aceites disminuyen la adición bacteriana al sustrato y con ello la digestibilidad de la dieta y las variables de fermentación: ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno amoniacal (N-NH₃). En dietas para rumiantes, la pasta de canola es utilizada como fuente de proteína. La semilla de canola contiene aproximadamente 40% de aceite vegetal, que representa un valor energético de 6130 cal/kg para rumiantes, además de un aporte de 23% de proteína, lo cual justifica su uso en la alimentación de rumiantes. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* los patrones de degradación y producción de ácidos grasos volátiles (AGV) de la semilla de canola y de su asociación con grano de maíz (50:50, 60:40 y 70:30) y grano de sorgo (50:50, 60:40 y 70:30).

Palabras clave: Canola, digestibilidad, AGV's.

Introducción

El grano de canola es utilizado como fuente de proteína y lípidos en dietas para rumiantes. La canola contiene aproximadamente 40% de extracto etéreo (EE) y 20% de proteína cruda (PC) (Khorasani *et al.*, 1991). El aceite está compuesto principalmente de ácido oleico (52.8%), ácido linoleico (23.5%) y ácido linolénico (10.5%, Khorasani *et al.*, 1991), Moore *et al.*, (1986) reportaron que los niveles de grasa >4% en dietas a base de forrajes resultan en una disminución de FDA, MS, y la digestibilidad de la materia orgánica (MO). Khorasani *et al.*, (1992) reportaron que la suplementación de grano de canola



protegida ruminalmente en niveles >3% de la dieta, disminuye la concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV) y la proporción molar de acetato, propionato y butirato.

Datos para alimentación de ganado sugieren que la canola entera es un grano relativamente resistente a la digestión en el rumen (Khorasani *et al.*, 1992, Hussein *et al.*, 1995). En el grano de canola procesado, los contenidos son accesibles a la degradación enzimática ruminal y absorción intestinal (Aldrich *et al.*, 1997a).

Material y Métodos

Se realizó un experimento de DIVMS por producción de gas utilizando como sustratos grano entero de Canola, Cártamo y asociaciones de grano de Canola con Maíz y Sorgo con tres diferentes porcentajes de inclusión respectivamente (50:50, 60:40 y 70:30). Éstas mezclas fueron procesadas en un molino convencional con criba de 2 mm. Para la producción de gas *in vitro* se usó la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994) y se evaluó la producción de AGV. Se usaron 8 frascos de vidrio (125 mL color ámbar) por tratamiento con 0.5 g de sustrato y tres blancos. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar, en el que el sustrato fue el criterio de bloqueo. La unidad experimental fue cada frasco, asignando aleatoriamente los tratamientos a las unidades experimentales. El inóculo ruminal se extrajo de 2 borregos canulados. Para la concentración AGV se tomaron 4 mL del medio líquido a las 24 h de incubación y se mezclaron con 1 mL de ácido metafosfórico al 25%. De cada muestra se tomaron 2 mL, se centrifugaron a 9,000 rpm durante 15 min y se inyectó 1 μ L del sobrenadante en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Claurus 500. La presión de gas se midió y liberó a las 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h de incubación. Para determinar la degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS) se utilizó la metodología propuesta para el incubador DAYSI II Ankom Technologies®, 0.5 g de las muestras fueron colocadas en bolsas F-57, e incubadas en frascos que contenían líquido ruminal:solución buffer 4:1, los periodos de incubación por duplicado fueron: 3, 6, 12, 24 y 48 h. Los datos fueron analizados de acuerdo a un diseño en bloques al azar generalizado con el procedimiento GLM (SAS, 1997) y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1996).

Resultados y Discusión

La producción acumulada de Ácido Acético, Propiónico y Butírico por gramo de MS cambió por efecto del sustrato y tiempo ($P \leq 0.05$; Cuadro 1). Se encontró una interacción entre el tiempo y concentración máxima de producción de AGV en los diferentes sustratos. A las 3 h el grano de canola mostró la concentración más alta de AGV pero con el transcurso de las horas ésta producción fue disminuyendo



en comparación con los demás sustratos. En el caso del Cártamo sólo mostró diferencias con los demás sustratos en la producción de ácido acético ya que en los demás se mantuvo en niveles inferiores. Para las asociaciones de grano de Canola y Maíz la inclusión 60:40 a las 24 h registró la mínima producción en sus diferentes AGV. La mezcla 70:30 mostró un comportamiento uniforme con máxima producción de AGV a las 6, 12 y 24 h. Para la asociación grano de Canola y Sorgo la inclusión 50:50 mostró una máxima producción de AGV a las 24 h, la proporción 60:40 resalta una máxima producción uniforme de AGV a las 9 h y en el caso de la inclusión 70:30 a las 6 h registra la mínima producción en comparación con los demás sustratos pero una máxima a las 48 h. A medida que avanzó el tiempo de incubación hubo un incremento en la producción de gas, registrando su máxima entre las 24 y 48 h de incubación.

Se observó un aumento lineal en la producción de gas desde las 24 h de incubación en los diferentes sustratos, en el caso de la asociación grano de canola y maíz la inclusión 70:30 es la que mostró una máxima producción más o menos constante en el transcurso de las horas en comparación con los otros sustratos. El Cártamo registró los valores más bajos de producción de Propiónico y Butírico a las 48 h pero la máxima en producción de ácido Acético.

Cuadro 1. Producción de AGV por gramo de MS en diferentes periodos de incubación.

ACÉTICO	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h
Canola	41.57 ^a	40.78 ^c	51.76 ^a	52.41 ^a	53.44 ^b	48.71 ^c
Cártamo	40.71 ^a	40.76 ^c	50.77 ^a	47.93 ^c	50.15 ^b	66.29 ^a
50:50	39.90 ^b	36.88 ^d	47.02 ^b	47.42 ^c	57.44 ^a	53.54 ^{bc}
Canola/Maíz	60:40 41.05 ^a	42.58 ^b	38.92 ^d	50.86 ^b	46.87 ^c	51.54 ^c
	70:30 40.31 ^{ab}	46.59 ^a	47.00 ^b	52.08 ^a	58.15 ^a	59.31 ^b
50:50	36.91 ^c	40.48 ^c	47.42 ^b	47.43 ^c	57.71 ^a	49.98 ^c
Canola/Sorgo	60:40 33.98 ^d	43.23 ^b	51.75 ^a	45.78 ^d	48.00 ^c	59.24 ^b
	70:30 40.86 ^a	33.24 ^e	44.74 ^c	45.03 ^d	51.90 ^b	64.28 ^a
PROPIÓNICO	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h
Canola	4.97 ^a	4.55 ^b	4.46 ^c	7.26 ^b	8.36 ^c	8.30 ^d
Cártamo	3.82 ^b	4.08 ^c	5.53 ^b	5.20 ^d	8.01 ^c	7.22 ^e
Canola/Maíz	50:50 4.12 ^b	4.46 ^b	6.37 ^a	6.66 ^c	9.15 ^b	8.90 ^c
	60:40 4.11 ^b	4.85 ^b	5.78 ^b	7.19 ^b	7.94 ^c	8.26 ^d



	70:30	3.79 ^b	5.19 ^a	6.57 ^a	9.16 ^a	9.69 ^a	10.21 ^b
	50:50	3.64 ^c	4.35 ^b	5.67 ^b	6.41 ^c	8.98 ^b	8.14 ^d
Canola/Sorgo	60:40	3.15 ^d	4.54 ^b	6.49 ^a	6.51 ^c	7.99 ^c	9.78 ^b
	70:30	3.95 ^b	3.65 ^d	5.72 ^b	6.58 ^c	9.54 ^a	11.10 ^a
<hr/>							
	BUTÍRICO	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h
	Canola	3.60 ^a	3.85 ^b	3.84 ^e	5.94 ^b	6.79 ^c	6.73 ^d
	Cártamo	3.03 ^c	3.37 ^d	4.60 ^d	4.23 ^d	6.67 ^c	5.03 ^e
	50:50	3.37 ^c	3.84 ^b	4.92 ^c	5.20 ^c	7.22 ^b	6.60 ^d
Canola/Maíz	60:40	3.39 ^b	4.10 ^b	4.81 ^c	5.84 ^b	6.62 ^d	7.19 ^c
	70:30	3.26 ^b	4.48 ^a	5.40 ^b	6.60 ^a	8.05 ^a	8.49 ^a
	50:50	3.11 ^{bc}	3.9 ^b	5.11 ^c	5.32 ^c	7.70 ^a	7.34 ^c
Canola/Sorgo	60:40	2.83 ^c	3.96 ^b	5.71 ^a	5.44 ^c	6.50 ^c	7.96 ^b
	70:30	3.33 ^b	3.52 ^b	4.81 ^c	5.46 ^c	7.40 ^b	8.73 ^a

Medias en una columna con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Khorasaniy Kennelly (1998), reportarontendencias de mayor pH ruminal, menores concentraciones totales de AGV y porcentajes molares de propionato con un aumento de la cantidad de semillas de canola 0 a 145 g/kg de MS en la dieta de las vacas lecheras. Los cambios en las proporciones de propionato y acetato en el rumen con suplementos de semillas de canola (Leuppet *et al.*, 2006) se han atribuido a una disminución en la digestión ruminal de la fibra.

Cuadro 2. DIVMS en diferentes periodos de incubación.

		3h	6h	9h	12h	24h	48h
	Canola	22.54 ^a	24.69 ^a	27.45 ^a	31.53 ^{ab}	45.44 ^b	59.69 ^b
	Cártamo	17.53 ^b	18.73 ^{cd}	20.40 ^c	24.39 ^d	31.15 ^c	41.10 ^c
Canola/maíz	50:50	15.53 ^c	18.69 ^{cd}	25.11 ^b	29.05 ^c	48.82 ^{ab}	70.09 ^a
	60:40	17.61 ^b	19.72 ^{cd}	26.12 ^{ab}	31.39 ^b	50.79 ^a	69.87 ^a



III Congreso Internacional de Microbiología Pecuaria
IV Congreso Nacional y XIV Congreso Estudiantil de Microbiología Pecuaria
24 y 25 de Octubre de 2013



	70:30	17.94 ^b	20.87 ^b	25.99 ^{ab}	31.86 ^a	52.01 ^a	67.20 ^a
	50:50	15.52 ^c	18.47 ^d	24.57 ^b	30.20 ^{abc}	48.14 ^{ab}	69.87 ^a
Canola/sorgo	60:40	16.91 ^{bc}	19.79 ^{bc}	26.12 ^{ab}	29.28 ^{bc}	49.35 ^{ab}	69.96 ^a
	70:30	18.03 ^b	20.33 ^b	26.14 ^{ab}	31.25 ^{abc}	50.60 ^{ab}	70.98 ^a

Medias en una columna con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$)

La mayoría de las muestras registró la mayor DIVMS a partir de las 9 h manteniéndose constante hasta las 48 h, siendo el grano de canola quien se mantuvo con los valores altos desde el primer registro (3 h), pero disminuyó después de las 12 h. El cártamo registró las menores digestibilidades en el transcurso de todo el periodo.

Castro *et al* (1991) mencionan que la suplementación de dietas forrajeras con concentrados ricos en almidón o azúcares fácilmente fermentables da lugar a un descenso en la digestibilidad de las distintas fracciones de la pared celular. En los estudios sobre la dinámica de las fermentaciones ruminales, se ha podido comprobar que al aumentar la cantidad de concentrado en la ración, la producción de AGV aumenta rápidamente, lo que produce un descenso en el pH ruminal (por debajo de 6.2). El descenso en el pH motivado por el aporte de hidratos de carbono fácilmente fermentables, da lugar a un descenso en la actividad celulolítica de los microorganismos del rumen.

Conclusión

La asociación de semilla de canola con granos aumenta la liberación de AGV. La DIVMS también fue afectada por esta asociación. La utilización de semilla de canola en este estudio, tuvo parámetros de fermentación y degradación *in vitro*.

Investigación financiada por Proyecto, *Incorporación de las oleaginosas con mayor potencial en México, para la solución de una problemática fundamental en los mercados agrícola, industrial y pecuario.*

Literatura Citada

Aldrich, C. G., N. R. Merchen, J. K. Drackley, G. C. Fahey, Jr., and L. L. Berger. 1997a. The effects of chemical treatment of whole canola seed on intake, nutrient digestibilities, milk production, and milk fatty acids of Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 75:512–521.



- Castro, T., Bermúdez, F. F. y Sanz-Arias R. 1991. Efecto de la relación forraje:concentrado de la ración sobre la digestibilidad de la materia seca y los componentes de la pared celular. Arch. Zootec. 40:85-90.
- Hussein, H. S., N. R. Merchen, and G. C. Fahey, Jr. 1995. Effects of forage level and canola seed supplementation on site and extent of digestion of organic matter, carbohydrates and energy by steers. J. Anim. Sci. 73:2458–2468.
- Khorasani, G. R., and J. J. Kennelly. 1998. Effect of added dietary fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. J. Dairy Sci. 81:2459–2468.
- Khorasani, G. R., G. de Boer, P. H. Robinson, and J. J. Kennelly. 1992. Effect of canola fat on ruminal and total tract digestion, plasma hormones, and metabolites in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 75:492–501.
- Khorasani, G. R., P. H. Robinson, G. de Boer, and J. J. Kennelly. 1991. Influence of canola fat on yield, fat percentage, fatty acid profile, and nitrogen fractions in Holstein milk. J. Dairy Sci. 74:1904–1911.
- Leupp, J. L., Lardy, G. P., Soto-Navarro, S. A., Bauer, M. L. and Caton, J. S. Effects of canola seed supplementation on intake, digestion, duodenal protein supply, and microbial efficiency in steers fed forage-based diets. J. Anim. Sci. 84:499-507.
- Moore, J. A., R. S. Swingle, and W. H. Hale. 1986. Effects of whole cottonseed, cottonseed oil or animal fat on digestibility of wheat straw diets by steers. J. Anim. Sci. 63:1267–1273.
- SAS. System for Windows. 1997. SAS User's Guide Statistics, SAS Inst. Inc. Cary. North Carolina. U. S. A.
- Steel, R. G. D., y J. H. Torrie. 1996. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Segunda edición. McGraw-Hill. México, D.F.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197.