

EFECTO DE LA PROPORCIÓN CONCENTRADO / FORRAJE DE LA DIETA, SOBRE LAS POBLACIONES DE BACTERIAS UTILIZADORAS DE HIDRÓGENO DEL RUMEN

EFFECT OF CONCENTRATE/FORAGE PROPORTION DIET, ON RUMEN HYDROGEN-CONSUMING POPULATION BACTERIA

Miramontes Carrillo JM¹, Ramírez-Rangel M², Ibarra Arias J², Ibarra Arias FJ¹, Alcantar Díaz BE³, Miramontes Huizar J², Aguiar García P, Lezama Gutiérrez R⁴.

¹Investigación Biotecnológica SC., Juárez No. 62 Ote, Compostela Nayarit, México. ²Centro de Investigación de Desarrollo Educativo "Compostela" AC. Av. Mina No. 25, Colonia Barrio de Santa Ana, Compostela Nayarit, México. ³Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Medicina. Cd. De la Cultura Amado Nervo S/N., C.P.63190, Tepic Nayarit, México. ⁴Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Km 40 Autopista Colima-Manzanillo, C.P. 28100, Tecomán Colima, México.

Resumen

Las Archae metanogénicas, las bacterias Acetogénicas y Sulfato reductoras son los tres grupos últimos de microorganismos dentro de la cadena de degradación de los sustratos en el ecosistema del rumen y la manipulación del tamaño de estas poblaciones es benéfica para la maximización de la energía en el rumiante. Para evaluar el efecto de dietas con diferente proporción de forraje/concentrado, sobre el número de bacterias utilizadoras de hidrógeno en el rumen *in vivo*, 16 ovino machos fueron colocados en cajas metabólicas y se alimentaron con cuatro dietas a base forraje de maíz más concentrado en las proporciones: C20, C40, C60 y C80. El concentrado fue a base de maíz molido, harina de soya y trigo. Se tomaron muestras de contenido del rumen cada dos horas durante 24 horas, para determinar número de bacterias, concentraciones de acetato, propionato, amonio y pH. El número de bacterias se determinó por el método del número más probable. El diseño en cuadro latino fue para evaluar el efecto del factor A=4 dietas, el factor B los tiempos de incubación, el factor C cuatro repeticiones y sus interacciones. La proporción forraje: concentra-

do de la dieta, muestra diferencia significativas ($p < 0.001$) entre el número de bacterias metanogénicas y acetogénicas y sulfato reductoras. Las dietas C60 y C80, tienen el mayor número de bacterias acetogénicas. El efecto de la dieta y tiempo de fermentación, también presentó diferencias en los valores de acetato ($p < 0.0006$), propionato ($p < 0.0001$), amonio ($p < 0.0001$) y pH ($p < 0.0001$). La manipulación de la proporción forraje: concentrado de la dieta usada en la alimentación de rumiantes es una estrategia para establecer determinado grupo de bacterias utilizadoras de hidrogeno y las propiedades del ambiente en el rumen.

Palabras clave: Acetogénicas, Dieta, Metano, Alimentación de rumiantes, bacterias utilizadoras de hidrogeno.

Abstract

Methanogenic Archae, acetogenic and sulfate reducer bacteria are the last three microorganisms in the rumen food chain degradation. Manipulation of the size of this microbial popu-

Autor Corresponsal:

Miramontes Carrillo, J. Investigación Biotecnológica SC. Juárez No. 62 Ote. Compostela, Nayarit, México. Correo electrónico: imancar2006@hotmail.com.

lation is beneficial for maximization of energy in ruminants. In order to evaluate the effect of diets with different ratio of concentrate/forage on the number of hydrogen-consuming bacteria in the rumen *in vivo*, sixteen sheep were used in individual metabolic pens. They were fed with diets with four different concentrate/forage ratios. Diets consisted of maize roughages and concentrate, in the next proportions: 80:20 (C20), 60:40 (C40), 40:60 (C60), and 20:80 (C80). Concentrate consisted of ground corn, wheat and soybean flour. Rumen fluid samples were taken every two hours throughout 24 hours to determine number of bacteria, acetate, propionate, ammonia concentration and pH. The most probable number method was used to determine the population's number of hydrogen-utilizing bacteria in the samples. Latin square design was used to evaluate the effect of diet as factor A, incubation time as factor B, four repetitions and its interactions as factor C. The proportion forage : diet concentrate shows significant differences ($p < 0.001$) between the number of methanogenic, acetogenic and sulfate reducer bacteria. Diet C60 and C80 forage/concentrate rate has the largest number of acetogenic bacteria. Diet effect and fermentation time also showed significant differences in acetate ($p < 0.0006$), propionate ($p < 0.0001$), ammonia concentration ($p < 0.0001$) and pH values ($p < 0.0001$). Manipulation of forage/concentrate proportion diet used to feed ruminant is a strategy for the establishment of a given group of hydrogen-consuming bacteria and the properties in the rumen ecosystem.

Key words: Acetogenic bacteria, Diet, Methane, Ruminant feeds, H₂ Utilizing bacteria.

Introducción

Los constituyentes de la dieta, al ser ingerido por los rumiantes, afectan las condiciones ambientales del ecosistema del rumen y determinan la estructura de las poblaciones microbianas y sus interacciones metabólicas de ese ecosistema (Hart and Doyle, 1985; Dixon and Stockdale, 1999; Tajima et al., 1999; Vlaeminck et al., 2006). Se conoce que cuando los rumiantes son alimentados con dietas ricas en forrajes, el fenómeno de adaptación a

los nutrientes en el rumen favorece el establecimiento de metanogénicas (Archae) y por su interacción, con microorganismos productores de hidrógeno (bacterias, hongos y protozoarios) en ambientes anaerobios (Bernalier et al., 1991; Ferry, 1992; Breznak, 1994; Baker, 1999; Yan Fen Cheng et al, 2009). Rumiantes alimentados con dietas ricas en concentrado ocasionan cambios en el rumen, que favorecen la interacción de microorganismos productores de hidrógeno y las bacterias acetogénicas (Greening y Leedle, 1989; Karnholz et al., 2002; Brown et al., 2006).

Otras investigaciones puntualizan que si se alimenta a rumiantes con dietas ricas en forrajes de cultivo fertilizados con azufre, la adaptación a la dieta favorece las interacciones de bacterias sulfato reductoras y su crecimiento (Posgate, 1984). La presencia de estos tres grupos de bacterias ha sido reportada también bajo diferentes condiciones y en diferentes ecosistemas anaerobios tales como, como sedimentos marinos, colon de humanos y sedimentos de aguas residuales (Bedziong et al., 1978; Gibson et al., 1990). Su importancia y beneficio para la industria de la explotación de rumiantes estriba en la posibilidad de manejo de los componentes de las dietas, de tal manera que la variación en la proporción forraje / concentrado determina la estructura de las poblaciones residentes del rumen y el establecimiento y predominio de uno de los tres grupos de bacterias utilizadoras de hidrógeno y por consiguiente, las interacciones metabólicas influyen en la eficiencia de utilización de la materia orgánica por los microorganismos productores y utilizadores de hidrógeno (Russell and Wilson, 1996; Rusell et al., 1996; Rusell, 1998; Lee et al., 2000).

Las repercusiones de estas interacciones metabólicas microbianas en el ambiente del rumen, ocasionadas por la composición de la dieta, pueden ser una estrategia para la optimización de la energía para el rumiante (Weimer et al., 1999), porque la eliminación o inhibición de algunas de estas tres últimas poblaciones requiere una mayor participación de las otras dos

y su importancia es determinante para aprovechamiento sustentable de animales (Stefan et al., 1992; Jo et al., 1996; Allen, 1997). Por lo que la alimentación de rumiantes con dietas de una determinada proporción de forraje / concentrado ocasiona cambios en el ambiente del rumen, que repercuten en una mejor utilización de nutrientes, una disminución en la producción de metano y la síntesis de compuestos energéticos a partir del CO₂ y el hidrógeno (Grant, 1997). El estudio del fenómeno de adaptación de rumiantes a dietas con diferente proporción forraje / concentrado y su efecto sobre el número de las poblaciones microbianas utilizadoras de hidrógeno del rumen, crea una oportunidades para maximizar la utilización de los nutrientes de la dieta y también, contar con estrategias para la cría y aprovechamiento de rumiantes con bajas emisiones de metano a la atmósfera (Benchaar et al., 1998; Weimer, 1998; Leedle et al., 1982; Newbold y Rode, 2006). El objetivo del presente

estudio fue evaluar el efecto de dietas con diferente proporción de forraje / concentrado, sobre las poblaciones de bacterias utilizadoras de hidrógeno en el rumen, *in vivo*.

Materiales y métodos

Las dietas y su evaluación

Las dietas se elaboraron en cuatro combinaciones de rastrojo de maíz y concentrado: 80:20 (C20), 60:40 (C40), 40:60 (C60) y 20:80, (C80), como se describe en Valdez et al. (2000). Los componentes y las proporciones de la dieta se muestran en el cuadro 1. La composición de las dietas con diferente proporción de forraje y concentrado, fue determinada por medio de determinaciones de Nitrógeno total (PC), Humedad, Extracto etéreo, cenizas totales de acuerdo a la AOAC (1985), como se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 1. Los ingredientes de las cuatro dietas y sus análisis proximales.

Ingredientes (Kg)	C20	C40	C60	C80
Rastrojo de maíz	69,52	55,73	42,33	23,07
Maíz molido	6,75	14,03	21,22	30,6
Harina de soya	13,68	13,75	13,06	12,66
Salvado de trigo	2,87	13,47	20,36	29,4
Melaza	2,87	2,99	3,01	3,26

C = proporción de concentrado en la dieta

Cuadro 2. Análisis proximal

Determinaciones	C20	C40	C60	C80
% PC (NX 6.25)	11,9	12,9	13,5	14,5
% ELN	42,2	47,4	51,8	57,7
% EE	2,3	2,4	2,6	2,8
% C	4,8	4,2	3,7	3,0
EM kg	2,0	2,2	2,3	2,6

Los animales

Dieciséis corderos machos de 1 año de edad, desparasitados y vitaminados con A, D y E, con un peso comprendido entre 34 y 38 kg, fueron fistulados y equipados con cánulas ruminales, como se explica en Harmon y Richard (1997). Posteriormente se colocaron en jaulas metabólicas individuales provistas de comederos, bebederos y charola para remoción de excretas. Se formaron cuatro grupos de cuatro animales cada uno y cada uno de ellos fue alimentado con las cuatro dietas en cuatro diferentes periodos. Los alimentos se ofrecieron a las 8:00 y a las 16:00 h. Los animales se sometieron a un período de adaptación a la dieta de 30 días antes de su evaluación.

La obtención de las muestras

Cada 2 horas, se recolectaron 50 ml de contenido del rumen, con una jeringa adaptada a una manguera de caucho, durante un periodo de 24 horas; la primera muestra se tomó a partir de las 7:00 h. Cada muestra se colocó en frascos de plástico de 100 ml previamente calentados a 39 °C y gaseado con CO₂ tratado en una columna de cobre, para obtener CO₂ libre de oxígeno como se describe en Hungate (1969). De las muestras iniciales se apartaron 10 ml para las determinaciones de ácidos grasos volátiles (acetato, propionato) y amonio.

Manejo de las muestras

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a Morvan et al. (1996), en una cámara de anaerobiosis (Anaerobic Chamber, Model 855-AC, ACB, Plas-Labs, INC. Lansing, Michigan, U.S.A.). A cada matraz con 10 ml de muestra se le añadió 0.2 ml de sulfuro de cisteína al 2.5%, excepto, para una fracción de inóculo de 5 ml, que fue apartada para la cuantificación de bacterias sulfato reductoras. Las muestras fueron colocadas en frascos de plástico y cada uno de ellos fue gaseado con CO₂ libre de oxígeno, rotuladas y almacenadas a -20° C para su posterior evaluación.

Número más Probable (NMP) de metanogénicas Archae

El medio de cultivo fue el medio de fosfato buffer de Bedziong como se describe en Bryant y Burkey (1953), se le adicionó 0.2% de solución de resazurina, (1ml / 1000 ml de medio). Se colocaron 9 ml de medio en tubos de ensayo de 15 X 20 y se sellaron con tapones de hule y sello de aluminio, después se esterilizaron a 121°C por 25 min. Una vez esterilizados se les adicionó 0.1 ml, de solución de vitaminas, esterilizada por filtración, 0.1 ml de fosfato buffer y 0.2 ml de solución de agentes reductores más penicilina, cycloserina y vancomicina. La cuantificación fue realizada por la técnica del NMP como se describe en Clarke y Owens (1983).

NMP de bacterias Sulfato reductoras

El medio de cultivo fue el descrito por Doré *et al.* (1995) y adaptado por Morvan *et al.* (1996). El medio fue ajustado a un pH de 7.4 y esterilizado en autoclave dentro de tubos de ensayo con tapa de teflón y sello de aluminio (Bellaco Glas Co). Después de esterilizar se les añadió por cada 5 ml de medio, 150 µl de solución estéril de NaHCO₃ (8.4%) y 100 µl de solución de ditionite de sodio preparada y esterilizada anaeróticamente como se indica en Posgate (1984).

NMP de bacterias acetogénicas

El medio de cultivo utilizado fue el AC11 Morvan et al. (1996), al cual se le adicionó, resazurina 0.1 %, 0.02 g; metales traza, 10 ml, solución de vitaminas, 10 ml; extracto de levadura, 0.5 g y 100 ml de fluido ruminal clarificado, de acuerdo con Leedle et al., (1982). A todos los tubos con el medio se les adicionó una solución de ácido 2-bromoetanosulfónico a una concentración de 2% (v/v), como se indica en Doré *et al.*, (1995).

Condiciones de cultivo para conteos microbianos

Todas las incubaciones se hicieron a 39° C, como se señala en Bryant y Burkey (1953). Para las metanogénicas Archae, el

tiempo de incubación fue de 4 semanas, para las sulfato reductoras de dos y para acetogénicas de tres. Los conteos de bacterias fueron estimadas por triplicado, aplicando el método (NMP) de acuerdo con Clarke y Owens (1983).

La identificación de los tubos positivos para bacterias sulfato reductoras se estimó por la aparición de un precipitado color negro en el fondo de los tubos. Para metanogénicas Archae fue por medición del metano, una concentración de por arriba de 1000 ppm, se tomó como positivo. Los tubos con más de 10 mM de acetato, asociados con el consumo de gas fueron tomados como positivos para acetogénicas, de acuerdo a Morvan *et al.* (1996) y Jouany (1982). El hidrógeno fue determinado en el espacio de cabeza del tubo de cultivo por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo de gases (Marca Perkin Elmer), equipado con una malla molecular, 5A-60/80, empacada dentro de una columna de Aluminio de 2 mm, un detector de ionizador de flama y como gas acarreador Argón. La temperatura del inyector y la del horno fueron de 120°C.

El acetato y ácido propiónico se determinaron por cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC), en un equipo marca Waters y la concentración de amonio en el rumen, con el método del electrodo de vidrio. Antes del análisis, cada una de las muestras se sometió a un proceso de ultra centrifugación a 15 000X G, después se practicaron micro filtraciones con filtros de intercambio de resina y con filtros a base de membrana en discos preparados o acrodix (Marca Millipore. No. de catálogo 9004-70-0).

Diseño experimental

El modelo es un diseño de cuadro latino donde el factor A= cuatro proporciones de forraje/concentrado de la dieta. El factor B cuatro periodos experimentales. El factor C=12 tiempos de incubación y el factor D cuatro repeticiones.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza el paquete estadístico SAS (1985).

Resultados y Discusión

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre la cantidad de metanogénicas Archae del rumen

El efecto de las dietas sobre las metanogénicas Archae, el tiempo de fermentación y sus interacción, mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$). Las dietas C20 y C40 presentaron la de mayor población de metanogénicas Archae. La dieta C60 ocupó el tercero lugar y la C80 el último (Cuadro 3). Para el efecto del tiempo de fermentación, la prueba de Tukey separó en primer lugar a los tiempos 4 con el mayor número de metanogénicas Archae. Los tiempos 3 y 9 ocuparon el segundo si diferencias entre ellos. Los tiempos 1, 2, 5, 6, 7,8 y 12, fueron los que presentan las poblaciones de metanogénicas más bajas (Cuadro 4).

Cuadro 3. Promedios del NMP de bacterias utilizadoras de hidrógeno

Dietas	Metanogénicas (NMPX10 ¹⁰)	Acetogénicas (NMPX10 ⁸)	Sulfato reductoras (NMP/ml)
C20	0.147771a	0.0726c	285042 b
C40	0.067354c	0.0818c	259646 c
C60	0.103042b	5.3626a	299375 a
C80	0.047687d	3.7924b	254035 c

*Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna son diferentes significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey)

Cuadro 4. Promedios del número de bacterias utilizadoras de hidrógeno, durante los 12 tiempos de incubación.

No. de Muestra	Hora	Metanogénicas	Acetogénicas	Sulfato reductoras
1	07:00	0.089250 d	1.5798 d	257917 b
2	09:00	0.093250 d	1.5233 e	279979 a
3	11:00	0.101625 b	1.9995 c	265875 b
4	13:00	0.107938 a	2.2544 c	287292 a
5	15:00	0.076687 d	2.8644 b	266875 b
6	17:00	0.076500 d	2.4924 b	290208 a
7	19:00	0.078583 d	1.7489 d	269979 a
8	21:00	0.076187 d	1.1908 e	298750 a
9	23:00	0.105125 b	1.8752 d	266875 b
10	01:00	0.094500 c	2.2142 d	266875 b
11	03:00	0.094500 c	2.2142 d	266875 b
12	05:00	0.077750 d	3.8457 a	285000 a

*Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey).

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre las acetogénicas del rumen

El análisis de varianza para todas las fuentes de variación, mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$). Las dietas C60 y C80, fueron más favorables para el crecimiento de las bacterias acetogénicas. La dieta C60 presenta mayor cantidad de acetogénicas, seguida por la C80. En tercer lugar las dietas C20 y C40, sin diferencias entre estas últimas (Cuadro 3). Para el tiempo de fermentación, el tiempo 12 registró el mayor número de acetogénicas. En segundo lugar los 5 y 6, sin diferencias entre sí y en último lugar lo presentaron los tiempos 2 y 8 (Cuadro 4).

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre las bacterias sulfato reductoras del rumen

El efecto de las dietas, el tiempo de fermentación y sus interacciones, mostró diferencias significativas ($P < 0.001$). La dieta

C60 presentó la mayor cantidad de sulfato reductoras. Le sigue la dieta C20. Las dietas C40 y C80, presentan las más bajas cantidades de sulfato reductoras (Cuadro 3). El número de sulfato reductoras con respecto al efecto del tiempo de fermentación, presentaron los valores más elevados para los tiempos 2, 4, 6, 7, 8 y 12, sin diferencias estadísticas entre ellos (Cuadro 4).

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre la concentración de propionato

Las dietas 40:60 y 80:20 presentaron la mayor concentración de propionato con 17.342 y 19.008 Mm / L, respectivamente, seguida por la 60:40; la dieta 20:80 fue la de menor concentración (Cuadro 5), con diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.001$). Los tiempos 9 y 12 fue donde se registró las más altas concentraciones y los de menor concentración se encontraron en el tiempo 4 (Cuadro 6).

Cuadro 5. Promedios de las concentraciones de propionato, acetato, amonio y valores de pH.

Dieta	Propionato mM	Acetato mM	Amonio MG/ DI.	pH
C20	14.025c	28.875a	28.093b	6.44917a
C40	17.342a	30.175a	27.09b	6.24333b
C60	16.033b	20.967b	21.01c	6.0066c
C80	19.008a	22.627b	31.61a	6.17583b

*Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna, son diferentes significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey).

Cuadro 6. Promedios para las concentraciones de propionato, acetato, amonio y valores de pH en los 12 tiempos de incubación.

Tiempo	Propionato	Acetato	Amonio	Valores de pH
1	16.516b	29.016a	344.55a	6.22469c
2	15.600c	24.463b	195.19c	6.57734a
3	18.825b	26.186b	188.90c	5.94594d
4	12.477d	26.486a	352.07a	5.82469d
5	16.192c	25.155b	333.30a	6.18422c
6	15.147c	23.420b	229.64b	6.17031c
7	14.627c	27.730a	196.37c	6.18453c
8	16.659b	25.558b	336.64a	6.44781b
9	19.692a	28.342a	319.22b	6.29578c
10	15.917c	27.363a	199.26c	6.61828a
11	16.764b	22.047b	174.70c	6.22859c
12	14.850a	24.942b	375.44a	5.94500d

*Valores seguidos por letra diferente dentro de la columna son diferentes significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey)

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre la concentración de acetato

Se observaron diferencias significativas para el efecto de la proporción forraje: concentrado de la dieta sobre la concentración de acetato ($P < 0.001$). Las dietas C20 y C40, fueron las de más alta concentración de acetato. Le si-

guió en nivel de concentración las dietas C60 y C80 (Cuadro 5). También para al tiempo de fermentación se observaron diferencias (Cuadro 6). La producción de acetato durante el tiempo de fermentación, presenta variaciones que pueden colocarse en un primer y segundo lugar: los tiempos 1, 9, 7, con los de mayores concentraciones, sin diferencias significativas entre ellos ($P < 0.001$). Los tiempos 10, 4, 3, 8, 5, 12, 2, 6 y 11, son los de valores más bajos.

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre la concentración de amonio

La dieta C80 presenta los mayores valores de amonio ($P < 0.001$). Las dietas C20 y C60 en segundo lugar sin diferencias significativas y en tercer lugar a la dieta, C40 (Cuadro 5). Entre los tiempos de fermentación se registró el valor más alto en los tiempos 1, 4, 5, 8 y 12, seguida por los tiempos 6, y 9, Las concentraciones más bajas son en los tiempos 2, 3, 10 y 11 (Cuadro 6).

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre valores de pH en rumen

El valor más alto de pH es para la dieta C20, le siguen las dietas C40 y C80 y el valor más bajo es para la C60, observando diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.001$) (Cuadro 5). Para el efecto del tiempo de fermentación las pruebas de Tukey, separaron al tiempo 10 y 2 como las de mayor valor, los tiempos 8 y 9, en segundo, los 11, 1, 7, 5, 6 y 3 en tercero y el último los tiempos 4 y 12 (Cuadro 6).

Se pudo demostrar que la variación de la proporción y los constituyentes de las dietas, que consumen un rumiante, afecta el tamaño de las poblaciones microbianas (bacterias, hongos y protozoarios) y sus interacciones, lo que ocasiona cambios favorables en el ambiente del rumen que repercutirán en una mejor utilización de nutrientes (Dixon and Stockdale, 1999; Brown et al., 2006). La proporción forraje/concentrado de la dieta afectaron los tamaños de las poblaciones de bacterias utilizadoras de hidrógeno, las cuales determinan la interacción metabólica del rumen (Weimer et al 1999; Lee et al., 2000). Las dietas con diferentes proporciones de forraje/concentrado permitieron la manipulación del metabolismo en el rumen y el rumiante se beneficia por una relación simbiótica entre los microorganismos de este ecosistema (Hart and Doyle, 1985, Brown et al., 2006). Por otro lado, dietas que favorecen el aumento de bacterias acetogénicas en el rumen,

permite la disminución en la producción de metano por los rumiantes, un gas de invernadero que se produce en la fermentación entérica de los compuestos celulósicos en proporciones de 77 millones de toneladas por año, considerando la población mundial de estos animales (Ferry, 1992).

El efecto de las diferentes proporciones de concentrado/ forraje y el tiempo de fermentación, sobre las bacterias acetogénicas del rumen

El tamaño de poblaciones de bacterias acetogénicas con valores de 5.3626×10^8 y 3.7924×10^8 para las dietas C60 y C80 respectivamente, están de acuerdo con los publicados por Greening y Leedle (1989), quienes encuentran poblaciones de acetogénicas mayores de 10^8 /ml de contenido ruminal en bovinos alimentados con una proporción de forraje/concentrado de entre 3:1 a 1:3. En contraste, los resultados no coinciden para ningunas de las 4 proporciones de las dietas, con los publicados por Morvan *et al.* (1996), quienes encontraron tamaños de poblaciones menores de 10^2 acetogénicas /ml, en bovinos alimentados con una dieta a base de heno y cebada en proporción (7:3). Posiblemente el tipo de forraje hace la diferencia entre los valores encontrados en este estudio a los de Morvan *et al.* (1996).

Tomando en cuenta que las poblaciones para la dieta 60:40 y 80:20 son las de mayor población de acetogénicas, con valores de 5.3×10^8 y 3.79×10^8 respectivamente, los resultados tampoco coinciden con los de Van Nevel y Demeyer (1996), donde ellos reportan poblaciones menores de 10^2 / ml, en ovejas, 10^2 / ml en venados y 10^3 en bisontes alimentados con dietas ricas en granos. Es posible que el ecosistema ruminal de diferentes especies afecte las poblaciones de estas bacterias.

Por otro lado, los resultados para las proporciones 20:80 y 40:60 coinciden con los reportados por estos mismos autores, cuando reportan poblaciones de 2.5×10^5 / ml, en digesta del rumen de bovinos alimentados con dietas con una proporción forraje concentrado de 50:50. Igualmente, tamaños de poblaciones

de bacterias acetogénicas de 6.6×10^8 y 8.1×10^8 , han sido reportados por Doré *et al.* (1995) en el tracto gastro- intestinal de humanos excretadores y no excretadores de metano. De igual manera para los reportados en Bernalier *et al.* (1992) quienes reportan tamaños de poblaciones en un rango de 4.1×10^8 a 8.3×10^8 , en humanos no productores de metano.

Los resultados para el tiempo de fermentación coinciden con los reportados en Van Nevel y Demeyer (1996) quienes mencionan que las acetogénicas limitan su crecimiento en presencia de alimento y agua dentro del rumen. Posiblemente la presencia de estos dos nutrientes disminuya la concentración por dilución de hidrógeno en el ecosistema del rumen.

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación sobre, las metanogénicas Archae del rumen

Los resultados de tamaños de las poblaciones de 0.14777×10^{10} de metanogénicas en la proporción C20, están de acuerdo con los publicados por Baker *et al.* (1999) quienes reportan el número de metanogénicas en el rumen de ovejas alimentadas con heno de avena y grano de Lupin blanco (*Lupinus albus*) como concentrado, en una proporción 88:12, los tamaños de las poblaciones varían entre 10^5 a más de 10^8 / ml de inóculo de rumen. Igualmente con los reportados por Jarvin *et al.* (2000) quienes reportan poblaciones de más de 10^8 / ml de digesta del rumen en animales alimentados con heno de alfalfa (*Medicago sativa*).

Estos mismos autores Jarvin *et al.* (2000) reportan que el número de bacterias metanogénicas en bovinos alimentados con dietas de diferentes proporciones de forraje / concentrado es de 10^8 metanogénicas / ml de contenido del rumen y difiere poco cuando el tamaño de las poblaciones en diferentes tiempos después de la alimentación. Esto resultados, también están acordes con los obtenidos para las dietas de las proporciones C40 y C60. Para la dieta C80, los resultados coinciden con

lo expuesto por Joblin (1981), quien menciona que las dietas ricas en concentrado ocasionan una disminución en los valores de pH del contenido del rumen y que en estas condiciones el tamaño de las poblaciones de bacterias metanogénicas en el rumen disminuye. Sin embargo, aunque reportan una disminución en el tamaño de la población de metanogénicas, no mencionan el tamaño de estas poblaciones en animales alimentados con estas dietas. Los resultados también concuerdan con los publicados por Van Nevel y Demeyer (1996) quienes reportan que los alimentos con alto contenido de concentrado disminuyen el pH en el rumen e inhiben la metanogénesis. Los resultados coinciden también con los reportados por Wanapat, Pilahun, y Konmung (2009) en cuanto a la variación de metanogénicas con respecto a la cantidad de concentrado y amonio en la dieta, aunque usaron como modelo de rumiante un búfalo.

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación sobre las bacterias sulfato reductoras

Los resultados coinciden con los reportados por Morvan *et al.* (1996), quienes determinan tamaño de las poblaciones de bacterias sulfato reductoras en diferentes rumiantes, reportando que estas bacterias fueron encontradas en ovejas, bovinos, búfalos, venados y caballos.

Para las ovejas se reporta valores de poblaciones de 2.0×10^6 . Posiblemente estos valores son bajos comparados con los de este estudio, pero coinciden con Morvan *et al.* (1996), quienes explican que estos tamaños de poblaciones son bajos para ovejas alimentadas con dietas bajas en sulfatos o con el uso de forrajes deficientes en este elemento. Aunque en un modelo biológico diferente, los resultados del tamaño de las poblaciones de entre 2.5×10^5 a 2.9×10^5 de sulfato reductoras coinciden con las reportadas por Gibson *et al.* (1988), quienes reportan poblaciones de entre 10^5 a 10^{10} /g de heces secas, de muestras de excretas de humano bajo diferentes condiciones de alimentación y adaptación.

Estos hallazgos han permitido clasificar a las poblaciones humanas como productoras de metano y no productoras de metano y dar por hecho que las bacterias sulfato reductoras y metanogénicas compiten por el sustrato (hidrógeno y acetato) en diferentes ecosistemas (Lecrec *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1988; Hinrichs *et al.*, 1999) y aún bajo diferentes tipos de dietas. Aunque, datos reportados por Puoli *et al.* (1991), no reportan tamaños de poblaciones de bacterias sulfato reductoras, afirman que forrajes fertilizados con una adecuada proporción de nitrógeno y sulfatos incrementan el consumo voluntario y la digestibilidad aparente, los autores recomiendan la determinación de la concentración de azufre en forrajes antes de incluirlos a las dietas.

El efecto de las diferentes proporciones de forraje/ concentrado y el tiempo de fermentación, sobre la concentración de metabolitos y valores de pH en el rumen

El cambio de proporción de forraje a concentrado fue acompañado por el cambio en la composición química del contenido del rumen. La concentración de acetato para las 4 dietas presenta diferencias significativas y estos resultados son acordes con los reportados por Tajima *et al.* (1999), aunque el modelo usado en su estudio es bovino y los tamaños de las poblaciones para dietas con alta proporción de concentrado son más altas, las concentraciones de acetato de 28.8, para la dieta C20, 29.1 para la C40, 22.9 para la C60 y 322.6 para la C80 obtenidos en este experimentos si coinciden.

Los resultados no están de acuerdo con los de Hart y Doyle (1985), quienes encontraron que la concentración de acetato se incrementó por la fuente de concentrado. Tampoco son acordes con los reportados por Wanapat, Pilajum y Kongmun (2009) debido a que los autores no reportan diferencias significativas en la concentración de los metabolitos evaluados ni el valor de pH. Posiblemente los resultados no concuerdan debido al modelo animal utilizados en ambos estudios. Las diferencias encontradas en la concentración de propionato no están

de acuerdo a las reportadas por Hart y Doyle (1985) debido a que estos autores no reportan diferencias significativas para la concentración de propionato en las dietas utilizadas. Par la dieta C20 donde la concentración de propionato es mayor, los resultados concuerdan con los reportados por Tajima *et al.* (1999), quién reportan concentraciones aumentadas de este compuesto en el rumen de animales alimentados con dietas altas en forraje.

Las concentraciones de propionato con respecto al tiempo de fermentación no están de acuerdo con las reportadas por Nagaraja *et al.* (1992), pero aunque los valores de las concentraciones de propionato no son de acuerdo con este estudio, las diferencias entre los tiempos de fermentación para dietas altas en concentrado como la 80:20, si es acorde cuando reportan concentraciones de propionato de 10.4 mM a las cero horas, 15.2 mM a las dos horas, 12.7 mM a las 4 horas, 12.5 mM a las 6 horas, 10.1 mM a las 8 h y 7.9 mM a las 12 h, para novillos alimentados con dietas a base de 85% de concentrado.

Para la concentración de amonio, los resultados encontrados para todas las dieta, coinciden con los de Lapierre y Lobley (2001) y los de Eimer *et al.* (1999) quienes mencionan que en ganado alimentado con dietas a base de concentrados decrece la absorción de amonio en el rumen de animales alimentados con forraje. Los resultados también coinciden con los reportados por Driedger y Loerch (1999), quienes no reportan diferencias para la producción de amonio entre dietas con igual concentración de proteína. Para valores amonio no coinciden con los reportados por Wanapat, Pilajum y Kongmun (2009), debido a que estos autores no registran diferencias significativas. Los resultados del presente trabajo permiten concluir que la proporción de forraje: concentrado 40:60, de la dieta permite el crecimiento de las poblaciones de bacterias acetogénicas en el rumen. La alimentación con estas dietas es una estrategia para obtener un mejor beneficio de los nutrimentos por el rumiante, la disminución de emisiones de metano y mayor rendimiento de la energía metabólica del rumen.

Su efecto ha sido estudiado tratando de dar una respuesta práctica a los problemas que presentan la emisión de gases de invernadero por las bacterias metanogénicas cuando la alimentación de los rumiantes es a base de dietas con alto contenido de forraje (Minami y Takata, 1997; Hegarty, 2000; Talbot et al (2008). Sin embargo, estudios sobre el efecto de la variación de las proporciones forraje/concentrado o la suplementación de la dieta con otros nutrientes sobre las bacterias acetogénicas y sulfato reductoras son escasos (Eimer et al., 1999). Hacen falta mas investigaciones para caracterizar las bacterias acetogénicas presen-

tes en animales adaptados a estas dietas, así como la medición *in vivo* de los parámetros nutritivos y reproductivos de rumiantes.

Agradecimiento

Los autores agradecen a la Secretaría de Educación Pública por medio del programa PROMEP, quienes apoyaron en el financiamiento del presente trabajo. Igualmente a las autoridades de la Universidad Autónoma de Nayarit y de la Universidad de Colima por su valioso apoyo, para la realización de la presente investigación.

Literatura citada

- Allen MS. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1447-1462.
- AOAC. Official methods of analysis. 15 th edition. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists. 1985.
- Baker SK. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. *Austrian Journals of Agricultural Research* 1999; 50: 1293-1298.
- Bedziong W, Thauer RK, Zeikus JC. Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy sources. *Archives in Microbiology* 1978; 116: 41-49.
- Benchaar CJ, Rivest J, Pomar C, Chiquette J. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanism model and regressions equations. *Journal of Animal Science* 1998; 76, 617-627.
- Bernalier A, Fonty G, Gouet P. Cellulose degradation by two anaerobic fungi in monoculture in co-culture with rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*. 1991; 32: 131-136.
- Bernalier A, Fonty G, Gouet P. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Current of Microbiology*. 1992; 25: 143-148.
- Breznak JA. Role of microorganism in the digestion of lignocelluloses by termites. *Annals Reviews Entomological* 1994; 39: 453-487.
- Brown MS, Ponce CH, Pulicanty R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science* 2006; 84: E25-E33.
- Bryant MP, Burkey LA. Cultural methods and some characteristic of some more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science* 1953; 36: 205-217.

- Cheng YF, Joan EE, Gordon GA, Zhu W, Michael KT. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch cultura. *Bioresurce Technology* 2009; 100. 20: 4821-4828.
- Clarke KR, Owens JP. A simple and versatile microcomputer program for the determination of "most probable number". *Journal of Microbiology Methods*. 1983; 1: 133-137.
- Dixon RM, Stockdale CR. Associative effects between forages and grain: consequences for feed utilization. *Austrian Journal Agriculture Research* 1999; 50: 757-773.
- Doré J, Pochart P, Bernalier A, Goderel I, Morvan B, Rambaud JC. Enumeration of H₂ Utilizing methanogenic bacteria Archaea, acetogenic and sulfate reducing bacteria from human feces. *FEMS Microbiology Ecology* 1995; 17: 279-284.
- Driegder LJ, Loerch SC. Effect of Protein concentration and Source on Nutrient Digestibility by Mature Steer Limit-Fed High-Concentrate Diet. *Journal of Animal Science* 1999; 77: 960-966.
- Eimer U, Grabarse W, Shima S, Goubeaud M, Thauer RK. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: The key enzyme of biological methane formation. *Science* 1999; 278: 1457-1461.
- Ferry GJ. Biochemistry of methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1992; 27: 473-503.
- Gibson GR, Cumming JH, Macfarlane T. Competition for hydrogen between sulfate reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology* 1988; 65: 241-247.
- Gibson GR, Cumming JH, Macfarlane T. Competition for hydrogen between sulfate reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology* 1988; 65: 241-247.
- Gibson GR, Cumming JH, Mcfarlane GT, Allison C, Seal I, Vorster HH, *et al* Alternative pathway for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut* 1990; 13: 679-683.
- Grant RJ. Interactions among forages and non forages fiber sources. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1438-1446.
- Greening RC, Leedle AZ. Enrichment and isolation of *Acetivumaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov. acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Archives in Microbiology* 1989; 151: 399-406.
- Harmon DL, Richards CJ. Considerations for gastrointestinal cannulation in ruminant. *Journal of Animal Science* 1997; 75: 2248-2255.
- Hart SP, Doyle JJ. Adaptation of early-weaned lambs to high-concentrate diets with three grain source with or without sodium bicarbonate. *Journal Animal Science* 1985; 61: 975.
- Hegarty RS. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Austrian Journal of Agriculture Research*. 2000; 50: 1321-1327.

- Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG, De Long EF. Methane consuming Archaeobacteria in marine sediments. *Nature* 1999; 398: 802-805.
- Hungate RE. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology* 1969; 3B: 117-132.
- Jarvin GN, Strömpl S, Burgess DM, Skillman LC. Isolation and Identification of Ruminal Methanogens from Grazing Cattle. *Current Microbiology* 2000; 40: 327-332.
- Jo AS, Kessel V, Russell JB. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology* 1996; 20: 205-210.
- Joblin KN. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environmental Microbiology* 1981; 42: 1119-1122.
- Jouany. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial culture and anaerobic fermented contents. *Science Aliments* 1982; 2: 131-144.
- Karnholz A, Kusel K, Gobner A, Schramm A, Drake HL. Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 1005-1009.
- Lapierre H, Lobley GE. Nitrogen recycling in the Ruminant: A Review. *Journal Dairy Science (E. Suppl-)*: 2001; 84: E223-E236.
- Lecrec M, Bernalier A, Donadille G, Lelait M. H₂/CO₂ metabolism in acetogenic bacteria isolated from the human colon. *Anaerobe* 1997; 3: 307-315.
- Lee SS, Ha JK, Cheng KJ. Relative contribution of bacterial protozoa and fungi to in vitro degradation of Orchard grass cell walls and their interaction. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66: 3807-3813.
- Leedle AZ, Bryant MP, Hespell RB. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animal fed low-or- high forage diets. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 44: 402-412.
- Minami K, Takata K. Atmospheric methane: sources sink, and strategies for reducing agricultural emissions. *Water Science and Technology* 1997; 36: 6-7.
- Morvan B, Bennemeoy F, Fonty G, Gouet P. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe*. 1996; 2: 175-180.
- Nagarja TG, Towne G, Beharka AA. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992; 58: 2410-2414.
- Newbold CJ, Rode LM. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International congress series* 2006; 1293: 138-147.
- Posgate. The sulphate reducing-bacteria. In. *Anaerobic Microbiology*. 2d ed. Cambridge: Cambridge University Press, P. N. Levett, 1984. 201-220.

- Puoli JR, Jung GA, Reid RL. Effect of nitrogen and sulfur on digestion and nutritive quality of warm-season grass hays for cattle and sheep. *Journal of Animal Science* 1991; 69: 843-852.
- Russell JB. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 1955-1963.
- Russell JB, Wilson DB. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *Journal of Dairy Science* 1996; 79: 1503-1509.
- SAS. User's Guide: Statistic, 5 Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC., 1985.
- Stefan UC, Murgatroyd PR, Gibson GR, Cumming JH. Production, metabolism and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 1992; 102: 1269-1277.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, *et al.* Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16 rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology* 1999; 29: 159-169.
- Talbot G, Topp E, Palin MF, Massé DI. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water research* 2008; 42: 513-537.
- Valdes C, Carro MD, Ranilla MJ, González JS. Effect of forage to concentrate ratio in complete diet offered to sheep on voluntary food intake and some digestive parameter. *Journal of Animal Science* 2000; 70: 119-126.
- Van C, Demeyer DI. Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment* 1996; 42: 73-93.
- Vlaeminck VF, Demeyer D, Dewhurst RJ. Effect of Forage:Concentrate Ratio on Fatty Acid Composition of Rumen Bacteria Isolated From Ruminal and Duodenal Digesta. *Journal of Dairy Science* 2006; 89: 2668-2678.
- Wanapa MP, Kongmun P. Ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. *Animal feed science and technology* 2009; 151. 3-4: 205-214.
- Weimer PJ. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science* 1998; 76: 3114-3122.
- Weimer PJ, Waghorn GC, Odt CL, Mertens DR. Effect of diet on population of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1999; 82: 122-134.