

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROBIANA CON CARACTERÍSTICAS  
PROBIÓTICAS PARA MEJORAR LA FERMENTACIÓN RUMINAL EN GANADO  
VACUNO**

**CECILIA LARA MANTILLA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
PROGRAMA: DOCTORADO EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2005**

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROBIANA CON CARACTERÍSTICAS  
PROBIÓTICAS PARA MEJORAR LA FERMENTACIÓN RUMINAL EN GANADO  
VACUNO**

**CECILIA LARA MANTILLA**

**Química, MSc**

**Docente Universidad de Cordoba. Montería, Cordoba**

**Tesis de Grado para optar el título  
de Doctor en Química**

**Directora**

**Dra. Graciela Chalela Alvarez**

**MSc. Dr.rer.nat.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**PROGRAMA: DOCTORADO EN QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2005**

## **DEDICATORIA**

Con cariño dedico el presente trabajo.

A Dios, por darme la sabiduría y acompañarme siempre en mi camino.

A mis hijos: MABEL CECILIA Y NÉSTOR MAURICIO y a mi esposo, NÉSTOR EUGENIO por todo el apoyo, la paciencia y comprensión.

A mis padres, GUSTAVO y CECILIA, mis hermanos, ALBA ESPERANZA, CARLOS y PEDRO y demás familiares que compartieron conmigo todos los momentos brindándome alegría y ayuda incondicional.

A la UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA por darme la oportunidad de elevar mi nivel de estudios y apoyarme en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos:

A la Dra. GRACIELA CHALELA por su amistad, dirección y constante ayuda en la realización del presente trabajo.

A JUANITA AGAMEZ por su apoyo incondicional.

A la UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.

Al Centro de investigaciones Agropecuarias CORPOICA- Turipaná (Montería, Córdoba) y CORPOICA- Tibaitatá (Bogotá)

A mis Compañeros y Amigos.

A los Dres. RODOLFO QUINTERO, SONIA OSPINA Y ROLANDO BARAHONA, evaluadores del presente trabajo de investigación.

A la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. LOS MICROORGANISMOS RUMINALES Y SU IMPORTANCIA	21
1.1 NUTRICIÓN EN ANIMALES RUMIANTES	21
1.2 LOS MICROORGANISMOS DEL RUMEN	24
1.2.1 Bacterias	24
1.2.2 Protozoos	34
1.2.3 Hongos	36
1.2.4 Factores involucrados en el crecimiento microbiano	36
1.2.5 Importancia de los microorganismos ruminales	43
2. FERMENTACIÓN RUMINAL	49
2.1 METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS	49
2.2 DIGESTIÓN MICROBIANA DE LOS CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES O COMPONENTES FIBROSOS DE LOS FORRAJES	52
2.2.1 Adhesión al sustrato	52
2.2.2 Actividad enzimática	53
2.3 INTERACCIÓN MICROBIANA RUMINAL	55
2.3.1 Interacción entre protozoos	57
2.3.2 Sinergismo entre bacterias y hongos	57
2.3.3 Interacción entre bacterias	59
3. LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	69
3.1 GENERALIDADES	69
3.1.1 Definición	69
3.1.2 Efectos de los probióticos	70
3.1.3 Criterios de selección de los microorganismos como probióticos	70
3.2 PROBIÓTICOS EN RUMIANTES	71
3.2.1 ¿Cómo actúan los probióticos?	75

3.3 ESTADO ACTUAL SOBRE LA INVESTIGACIÓN DE PROBIÓTICOS EN RUMIANTES	78
3.4 CONSIDERACIONES PARA EL PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	80
3.4.1 Hipótesis	84
4. PARTE EXPERIMENTAL	85
4.1 METODOLOGÍA	85
4.1.1 Etapa I. Selección y caracterización de los microorganismos autóctonos	85
4.1.2 Etapa II. Adaptación de los microorganismos aislados a un nuevo medio de cultivo	88
4.1.3 Etapa III. Interacciones en co-cultivo entre <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> y los microorganismos aislados	92
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
5.1 MICROORGANISMOS AISLADOS	102
5.2 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	103
5.3 INTERACCIONES EN CO-CULTIVO ENTRE <i>BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS</i> Y LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.	126
6. CONCLUSIONES	144
7. RECOMENDACIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	148
ANEXOS	165

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Bacterias del rumen y sus características.	26
Tabla.2. Degradación de celulosa por bacterias ruminales solas y en combinación	60
Tabla 3. Degradación de Hemicelulosa por especies de microorganismos ruminales solos y en combinación.	61
Tabla 4. Degradación de Pectina por diferentes especies de microorganismos ruminales solos y en combinación	62
Tabla 5. Biomasa microbiana determinada en el medio de cultivo A a diferentes concentraciones de Ensilaje y Contenido ruminal	105
Tabla 6. Biomasa microbiana determinada a diferentes concentraciones de fruta.	107
Tabla 7. Conteo de los distintos tipos morfológicos de los microorganismos aislados en el medio líquido B (Guayaba agria).	109
Tabla 8. Análisis Bromatológico de la Guayaba agria, (Base seca)	110
Tabla 9. Análisis Químico del jugo de Guayaba agria ( <i>Psidium araca</i> ) al 25 %.	111
Tabla10. Biomasa microbiana determinada en el medio de guayaba agria y en un medio tradicional	113
Tabla 11. Composición de los medios tradicionales modificados para aislamiento de microbios ruminales	116
Tabla 12. Curva de crecimiento de <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> en el medio D (valores promedios ensayos por triplicado)	128
Tabla 13. Producción de ácidos acético, butírico y propiónico sin y con <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (valores promedio).	130
Tabla 14. Determinación del pH y de los ácidos Acético y Butírico en Co-cultivo.	132

## LISTA DE GRAFICOS

	pág.
Gráfico 1. Gráfico de la curva de crecimiento de <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> en el medio D	129

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Aparato digestivo de los rumiantes.	22
Figura 2. Actividad enzimática microbiana	23
Figura 3. Microfotografía de bacterias ruminales.	25
Figura 4. Microfotografía de <i>Ruminococcus albus</i>	27
Figura 5. Ruta general de la degradación de la proteína por los microorganismos ruminales.	30
Figura 7. Microfotografía de <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> .	33
Figura 8. Microfotografía de un protozoos del género <i>Entodinium</i> (izquierda) y del género <i>Osphryoscolex</i> (derecha).	34
Figura 9. Producción de ATP por los microorganismos ruminales.	37
Figura 10. Actividad Microbiana sobre el Forraje	44
Figura 11. Ruta del Metabolismo de los Carbohidratos y Síntesis de AGV por Microbios Ruminales	49
Figura 12. Conversión del propionato en lactosa.	51
Figura 13. Acción Enzimática sobre Celulosas y Hemicelulosas	54
Figura 14. Interacciones Microbianas	56
Figura 15. Producción de butirato y acetato por <i>Butyrivibrio spp</i>	64
Figura 16. Actividad de los Probióticos	75
Figura 17. Selección y caracterización de los microbios.	85
Figura 18. Preparación de medios de cultivo.	87
Figura 19. Adaptación al nuevo medio de cultivo: Guayaba agria	89
Figura 20. Determinación del Efecto Sinérgico.	92

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Aprovechamiento de los Carbohidratos de la Dieta	pág. 46
---	------------

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Caracterización Biológica de la Guayaba agria.	166
Anexo B. Observación macroscópica y microscópica de los Microorganismos aislados del rumen y del estiércol en medio de guayaba agria (medio B).	169
Anexo C. Curvas de calibración para los patrones de ácido acético y butírico	172
Anexo D. Clasificación e identificación de la levadura cepa No 18.	175
Anexo E. Análisis Estadísticos	179
Anexo F. Cromatogramas	186

## RESUMEN

**TÍTULO:** PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROBIANA CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS PARA MEJORAR LA FERMENTACIÓN RUMINAL EN GANADO VACUNO

**AUTOR:** LARA MANTILLA, Cecilia.

**PALABRAS CLAVES:** Microorganismos ruminales, medio de cultivo, guayaba agria, interacciones microbianas, ácidos grasos volátiles (AGV).

La presente investigación se llevó a cabo para establecer que existen poblaciones microbianas en el rumen y el estiércol son capaces de establecer interdependencias sinérgicas que permitan potenciar la actividad de la bacteria celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens*, productora de los ácidos acético y butírico (fuente de energía para los rumiantes) actuando sobre forrajes tropicales intactos. También fue evaluada la interacción en co-cultivo con el hongo no ruminal *Aspergillus oryzae* reconocido en estudios anteriores como Probiótico.

Para el desarrollo del trabajo investigativo se aislaron las cepas del contenido ruminal, estiércol y de fuentes no ruminales como arroz (para el caso de *Aspergillus oryzae*); mediante pruebas bioquímicas, observación microscópica y macroscópica en medios especiales se efectuó la caracterización de los microorganismos.

Se determinó la curva de crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* y se cultivó a gran escala para realizar la evaluación en co-cultivo con los microorganismos aislados.

La determinación de los ácidos acético y butírico se llevó a cabo por Cromatografía de gases empleando los derivados butilesteres. La técnica fue desarrollada, modificada y adaptada.

Como resultado se obtuvo un efecto sinérgico entre la bacteria ruminal y la levadura aislada del estiércol: *Debaryomyces hansenii* (*ZopF*) sobre forrajes intactos, reflejándose en el aumento en la producción de los ácidos: acético (13,2 mM) y butírico (0,3mM) en comparación con la producción de los mismos usando los microorganismos solos. Se propone a la levadura como un probiótico debido a que proporciona un efecto benéfico en la conversión del alimento.

También se elaboró un nuevo medio de cultivo a partir del jugo de Guayaba agria al 25 %p/v, para el aislamiento y mantenimiento de bacilos, cocos y levaduras de origen ruminal y del estiércol. Se efectuó conteo de células viables y se determinó biomasa microbiana en el nuevo medio de cultivo y en un medio tradicional. Se realizó análisis estadístico.

Como resultado se observó que todos los microorganismos aislados tanto del rumen como del estiércol se desarrollaron sin modificación morfológica, en el nuevo medio de cultivo y no se encontró diferencias estadísticamente significativas en comparación con el medio tradicional.

El medio de cultivo a partir de jugo de Guayaba agria fue caracterizado químicamente encontrándose que aporta los valores nutricionales requeridos por las especies microbianas a las cuales favoreció su desarrollo y crecimiento y se propone como una alternativa viable para el aislamiento y mantenimiento de esas poblaciones.

## SUMMARY

**TITLE:** PRODUCTION OF MICROBIAL BIOMASS WITH CHARACTERISTIC PROBIOTICS TO IMPROVE THE FERMENTATION RUMINAL IN BOVINE LIVESTOCK

**AUTHORS:** LARA MANTILLA, Cecilia

**KEY WORDS:** Microorganisms ruminalies, half of cultivation, sour guava, microbial interactions, volatile fatty acids (AGV).

The present work was carrying out to know that micro-flora which established the rumen and the cow excrement, are capable to made microbial synergism to enhance the activities of cellulolytic ruminal bacteria: *Butyrivibrio fibrisolvens*, which produce acetic and butyric acids (which are the energy sources for ruminants) acting over tropical forest. Also the interaction with the non ruminal fungi (*Aspergillus oryzae*) which is recognized as probiotic in other investigations was evaluated.

To develop this investigative work, ruminant fluid, cow excrement and non-ruminant elements like rice were isolated. Through out biochemical testings and microscopic observation the identification of microorganisms was done.

The curve of grow of *Butyrivibrio fibrisolvens* was determinated and this was grown in a big scale to realize the evaluation in co-culture with the isolated microorganisms.

Gas chromatographic was the technique used for determinate the production of acetic and butyric acids using butyl esters derivates. This method was developed, modificado and accepted.

As a result for this study, a microbial synergism between the ruminal bacteria and yeast isolated from the cow excrements: *Debaryomyces hansenii* (ZopF) was observed, which produced a significant increase on the acids production: Acetic (13.2 mM) and Butyric (0.2 mM) in comparison with the same production when the microorganisms was used alone. *Debaryomyces hansenii* (ZopF) is recommended as a Probiotic because it has a beneficial effect in the tropical forest conversion.

A new culture medium was made from the sour Guava (*Psidium araca* 25% p/v), to isolated and maintenance of ruminal microorganisms: bacilli, cocci and yeasts. The counting of viable cellules and determination of the microbial biomass in a traditional and new medium (Guava at 25%), and estatistical analysis were carried out.

As a result, it was observed that all the isolated microorganisms in the rumen as well as in the excrements were developed without morphological modification in the new culture and not diferences significative stadistical were found.

The medium of culture based on sour Guava was characterized chemically finding that it produces nutritional values required by microbial species. This helped to its growing and further develops. Then it is proposed as an alternative for the isolation and maintenance of such populations.

## INTRODUCCIÓN

Los forrajes existentes en las zonas tropicales colombianas se caracterizan por su baja calidad, debido a su alto contenido de compuestos fibrosos y bajo contenido celular, haciéndolos menos digestibles y reduciendo su valor nutricional para los rumiantes que los consumen.

La fermentación microbiana de los animales alimentados con esta clase de pastos, ricos en fibras, es deficiente y por lo tanto se reduce el aporte de energía y se disminuye la biomasa microbiana que suple la mayor parte de la proteína; pérdidas que restringen el crecimiento animal y la producción de carne y leche.

La explotación ganadera en el trópico se ve afectada y exige como estrategia la suplementación dirigida a suministrar los aportes necesarios y en cantidades apropiadas, para suplir los requerimientos nutricionales que el animal necesita ocasionando un incremento en los costos.

Por lo anteriormente dicho existe la necesidad de realizar investigaciones encaminadas hacia la búsqueda de nuevas alternativas biotecnológicas, sostenibles y competitivas, que permitan aumentar la eficiencia en la degradación y utilización de los forrajes de baja calidad, sin afectar la salud animal.

Dentro de las estrategias propuestas para el mejoramiento de la nutrición en rumiantes, los investigadores se han interesado en la manipulación del ecosistema ruminal para contribuir a mejorar los procesos fermentativos que desarrollan las poblaciones microbianas existentes (manipulación de la fermentación ruminal). Los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en este campo han demostrado que los microorganismos del rumen son un factor clave en el desarrollo y aprovechamiento de la dieta que el animal consume.

La fermentación en el rumen es el resultado de la interacción entre las especies microbianas con el sustrato y entre los diferentes microorganismos que forman parte del ecosistema ruminal (interacciones microbianas).

La fermentación ruminal observada desde el punto de vista de interacciones microbianas ha permitido establecer que tipo de interdependencias contribuyen en las actividades metabólicas del rumen especialmente en la degradación de los carbohidratos estructurales de los forrajes. Los resultados obtenidos de investigaciones llevadas a cabo “*In vitro*” entre microorganismos ruminales celulolíticos (degradadores de fibra) y no celulolíticos, han demostrado la existencia de interacciones tipo positivo o sinergismos, que mejoran tanto la degradación como la utilización del material fibroso presente en la dieta.

La degradación de la celulosa, hemicelulosa y pectina se ven aumentadas con el uso de combinaciones microbianas en comparación con la degradación de los mismos sustratos utilizando los microorganismos solos.

Es claro entonces que el trabajo conjunto de ciertas especies microbianas ha demostrado mayor efectividad en los procesos fermentativos ruminales permitiendo un mayor aprovechamiento de la dieta.

Considerando la importancia que reviste el estudio de las interacciones entre las bacterias comprometidas en la degradación de la fibra, (celulolíticas), con otros microorganismos del ecosistema ruminal, se llevó a cabo la presente investigación.

En el trabajo que aquí se describe se evaluó “*In vitro*” el efecto de interacción en co-cultivo de microorganismos celulolíticos del género *Butyrivibrio* spp (*Butyrivibrio fibrisolvens*) con otros microorganismos ruminales y del estiércol (bacilos, cocos y levaduras) y no ruminales, (*Aspergillus oryzae*) sobre la conversión de forrajes

intactos hacia la producción de los ácidos acético y butírico.

*Butyrivibrio fibrisolvens* es una bacteria ruminal de una gran diversidad metabólica que degrada celulosa, hemicelulosa, xilano, y proteína; fermenta glucosa, fructosa, celobiosa, maltosa, etc, produciendo entre otros butirato y acetato. Estos ácidos forman parte del grupo de los llamados Ácidos Grasos Volátiles, (AGVs) que constituyen los principales productos de la fermentación ruminal especialmente a partir de los carbohidratos. Los ácidos, acético y butírico, son de gran importancia para el rumiante como fuente primaria de energía en las dietas a base de forrajes y para la síntesis de la grasa corporal y de la leche.

Como resultado de la investigación, se obtuvo que la interacción “*In vitro*” de una levadura aislada del estiércol, identificada como *Debaryomyces hansenii* (*ZopF*) en co-cultivo con *Butyrivibrio fibrisolvens*, dio lugar a un efecto sinérgico, que se considera, permitió un mejoramiento en la degradación del forraje intacto; el efecto se reflejó en el aumento en la producción de los ácidos acético, (13,2 mM) y butírico, (0,3mM) en comparación con la producción de los mismos ácidos utilizando los microorganismos solos.

Como consecuencia del sinergismo encontrado, y asumiendo que la levadura *Debaryomyces hansenii* (*ZopF*) proporciona un efecto benéfico sobre la capacidad fermentativa de *Butyrivibrio fibrisolvens* en la degradación del material fibroso, se permite proponer al hongo como una biomasa con características Probióticas. El aumento observado en la producción de los ácidos, puede traducirse como un incremento en la energía disponible para el rumiante y productos precursores en la síntesis de la grasa corporal y de la leche y por consiguiente un mayor aprovechamiento de la dieta a base de forrajes de baja calidad por parte del ganado vacuno.

La anterior proposición está basada en el hecho de que los microorganismos Probióticos son definidos como "Suplemento microbiano vivo de alimentos que afecta positivamente el animal hospedante mejorando su equilibrio intestinal". El uso de probióticos en animales rumiantes, ha mostrado como efectos positivos: mayor efectividad en la conversión de alimentos, mejoramiento en la fermentación ruminal y la degradación de la fibra, favorecimiento de la producción de ácidos grasos volátiles, entre otros. Las investigaciones llevadas a cabo con levaduras (ej. *Saccharomyces cerevisiae*) han indicado, aumento en el número total de microorganismos y especialmente en la bacterias celulolíticas, incremento en la producción de ácidos grasos volátiles y aumento de peso en el animal en comparación con lotes de control.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación se quiere promover el uso de microorganismos benéficos y ofrecer al sector ganadero de Colombia, una posible alternativa viable, eficiente y sostenible para los sistemas de producción bovina, aprovechando el potencial autóctono y ajustándolo a las condiciones propias de las nuestras zonas que contribuyan a un mejor aprovechamiento de los recursos forrajeros tropicales de baja valor nutricional.

Se espera en el futuro, que la adición de la levadura *Debaryomyces hansenii* (*ZopF*) a la dieta consumida por el animal, (forrajes de baja calidad), pueda permitir un mejoramiento en la conversión de la fibra, ocasionando el incremento en la producción de los ácidos acético y butírico, (mayor aporte de energía), disminuyendo de esta manera la suplementación alimenticia y los costos de producción para el ganadero. Sin embargo el uso potencial de la levadura como inóculo (Probiótico) en dietas para rumiantes alimentados con forrajes ricos en material fibrosos, dependerá de una evaluación "*in vivo*" de la actividad del cultivo aislado.

Como aporte al conocimiento científico, la literatura consultada no muestra

investigaciones realizadas sobre la evaluación en la producción de los ácidos acético y butírico cuando interactúa la bacteria celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* con otros microorganismos ruminales y del estiércol (bacilos, cocos y levaduras) sobre forrajes intactos. El hallazgo sobre la existencia de un efecto sinérgico entre *Butyrivibrio fibrisolvens* y la levadura *Debaryomyces hansenii* (ZopF) en la producción de los ácidos, es el primer reporte al respecto y, contribuye al conocimiento de nuevas cepas que pueden constituir un potencial en el mejoramiento de la fermentación ruminal postulándose como candidato a Probiótico.

Es importante destacar que existe escasa información sobre la levadura y no se conoce reportes en la literatura sobre efectos en co-cultivo con otras especies microbianas.

En el presente trabajo de investigación también se elaboró un novedoso medio de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos ruminales y del estiércol (levaduras, cocos y bacilos), totalmente diferente a los medios tradicionalmente utilizados y reportados por la literatura; este medio preparado a partir de guayaba agria (*Psidium araca*), fruta originaria del Departamento de Córdoba, favoreció estadísticamente el crecimiento y desarrollo de los microorganismos aislados y, por grupos microbianos, a las levaduras.

Teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales para esta clase de microbiota y basados tanto en el análisis químico efectuado al nuevo medio de cultivo como en los resultados obtenidos del análisis estadístico, se asume que la calidad y cantidad de los nutrientes presentes en el medio de guayaba agria es la apropiada y, por tanto se propone como un medio alternativo para el aislamiento y mantenimiento.

El nuevo medio de cultivo, se considera, que representa una alternativa viable y efectiva a muy bajo costo, debido a que no se hace necesaria la adición de otras sustancias químicas, salvo la adición de bicarbonato de sodio para ajustar el valor del pH; se formuló para contribuir a la utilización de un recurso propio de la región de Córdoba a veces subutilizado. Son necesarias algunas pruebas experimentales para finalmente demostrar las ventajas y bondades del nuevo medio de cultivo.

Como aporte al conocimiento científico, es el primer medio de cultivo que se publica totalmente diferente a los medios tradicionales utilizados para estos fines.

La investigación desarrollada contribuyó a la generación de nuevo conocimiento y permitió además denotar la importancia y la utilidad que proporciona el saber de la Química en el área de la Biotecnología, así como su estrecha relación: metodología instrumental del análisis químico aplicado a la biotecnología y generación de sustancias químicas a partir de la biomasa.

Es claro que sin el conocimiento químico sería imposible desarrollar y controlar un proceso biotecnológico: a) cuantificar la respuesta que se desea evaluar, para el caso, la determinación de los ácidos acético y butírico mediante la adaptación, modificación y estandarización de técnicas de análisis químico (ej, cromatografía de gases) lográndose profundizar en el conocimiento; b) identificar los microorganismos aislados mediante el uso de las reacciones químicas a través de las pruebas de fermentación y asimilación de azúcares (pruebas bioquímicas); c) evaluar y cuantificar químicamente los nutrientes que son requeridos en el medio de cultivo (caracterización química) para desarrollo y crecimiento microbiano.

Se puede concluir que la Química constituye la herramienta fundamental para el desarrollo de la Biotecnología.

## **1. LOS MICROORGANISMOS RUMINALES Y SU IMPORTANCIA**

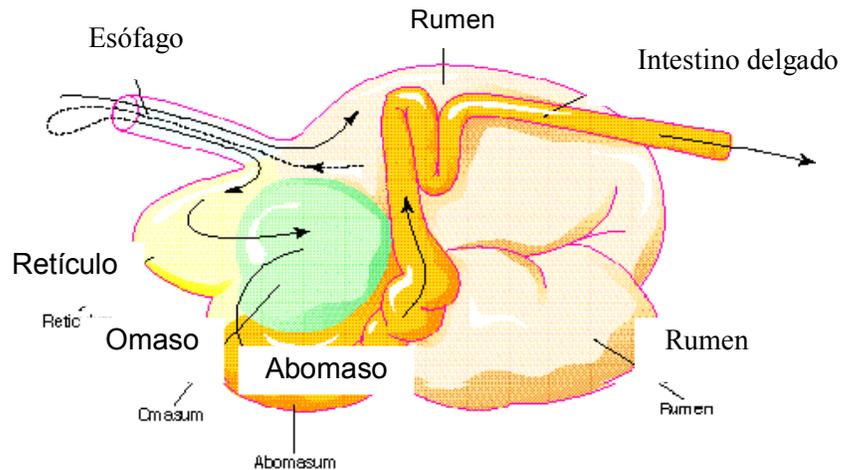
### **1.1 NUTRICIÓN EN ANIMALES RUMIANTES**

Idealmente la dieta debe proveer al rumiante los nutrientes que se requieren para construir y remover los componentes esenciales necesarios para su formación corporal, para suministrar la energía necesaria en los procesos metabólicos y para formar sus propios productos tales como leche y carne.

De acuerdo a Hans, (1975), Durand, (1980), Maynard *et al*, (1981) y Van Soest (1982), en el proceso de nutrición están involucradas diversas reacciones químicas y procesos fisiológicos que transforman los alimentos en tejido corporal y actividad. Esto comprende la ingestión, digestión, adsorción de los diferentes nutrientes, transporte a todas las células del cuerpo y eliminación de fracciones no utilizables como también de los productos de desecho metabólico.

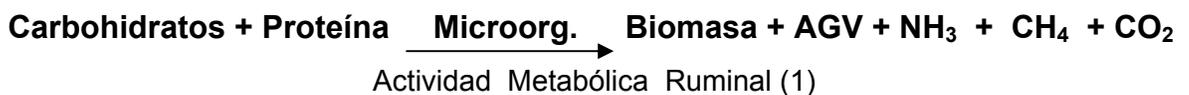
El tracto digestivo de los rumiantes se caracteriza por poseer varios compartimentos como se observa en la Figura 1: a) Rumen; b) Retículo; c) Omaso; y d) Abomaso.

Figura 1. Aparato digestivo de los rumiantes.



Fuente: Brock, 1997.

El rumen es un órgano especial y vital en la alimentación de los animales rumiantes, considerado como una cámara de fermentación que provee un ambiente apropiado para el desarrollo de una gran variedad de especies microbianas, cuya función es muy importante porque debido a la gran actividad metabólica que ellos ejercen, los alimentos se degradan no solo a biomasa microbiana sino a los productos de fermentación de vital importancia para el rumiante como son los ácidos grasos volátiles (AGV): acético, butírico y propiónico utilizados como fuente principal de energía, de acuerdo a la siguiente ecuación:

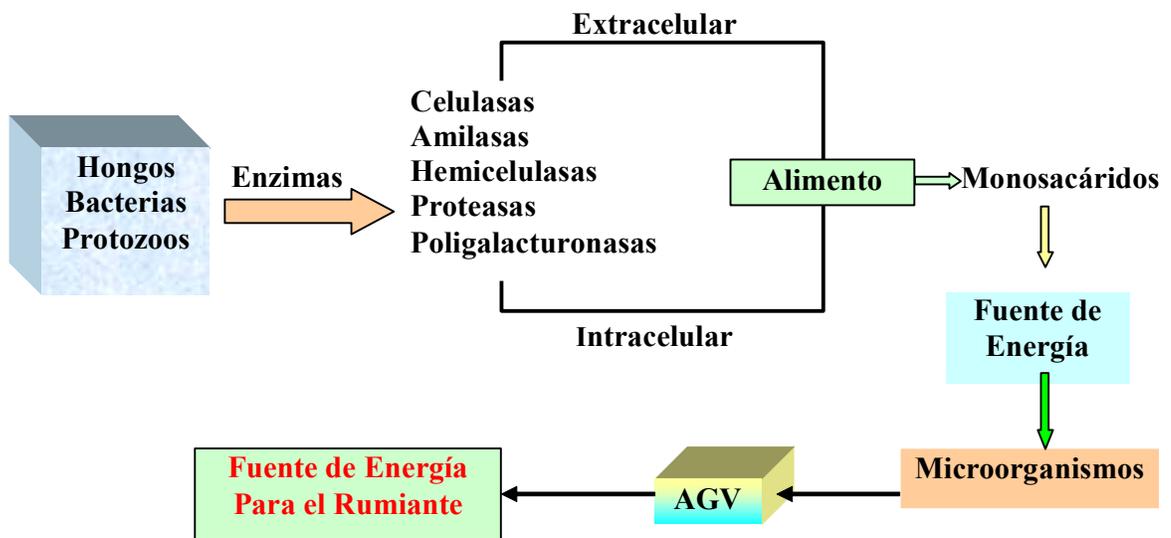


En la descripción de Hans (1975), Maynard *et al*, (1981) y Van Soest (1982), el ambiente ruminal presenta las siguientes condiciones: a) Temperatura entre 38-42° C; b) pH entre 5,5 y 7,0 y se mantiene estable debido a la presencia de ácidos orgánicos derivados de la fermentación, a la cantidad de secreciones salivales, (bicarbonatos y fosfatos) y al amoníaco producido; c) una mezcla gaseosa rica en

dióxido de carbono (65%) y metano (27%), pero pobre en oxígeno (0,2%), dependiendo de la dieta.

La digestión en rumiantes está acompañada por una población compleja de microorganismos que habitan su contenido ruminal. Cada género o especie de estos microorganismos tienen su propia provisión de enzimas o poseen la capacidad de segregarlas actuando sobre los grupos químicos del sustrato, mediante hidrólisis, oxidación, reducción u otros mecanismos, rompiendo algunos enlaces de las complejas moléculas para dar lugar a productos que sean estables en las condiciones dadas (Figura 2).

Figura 2. Actividad enzimática microbiana



Fuente: Autor.

Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares que no son segregadas por los tejidos animales, permitiendo así la degradación

de sustancias alimenticias no digeribles y protegiendo al animal de la acción dañina de microorganismos no benéficos<sup>1</sup>.

## 1.2 LOS MICROORGANISMOS DEL RUMEN

A lo largo del aparato digestivo de los rumiantes existe una gran cantidad de microorganismos pero quienes viven en verdadera simbiosis con el hospedante son los que habitan en el rumen. Esta población está constituida principalmente por Bacterias, Protozoos y Hongos, con capacidad de adaptarse a las condiciones propias del ecosistema como son: temperatura, pH, ausencia de oxígeno, abundancia de CO<sub>2</sub>, entre otras<sup>2</sup>.

**1.2.1 Bacterias.** De acuerdo a Dehory, (1965), Bryant, (1972), Dehority, (1977), Steward *et al*, (1988) y Russell (1996), las bacterias no siempre corresponden a la microbiota habitual, pueden proceder de la dieta o del medio ambiente que rodea al rumiante. Constituyen el mayor grupo de microorganismos en el rumen y su número oscila entre 10<sup>10</sup> y 10<sup>11</sup> cel / g de contenido ruminal. Se han identificado 22 géneros y 63 especies, de las cuales 16 géneros y 28 especies se consideran como funcionalmente importantes en términos de número y actividad metabólica.

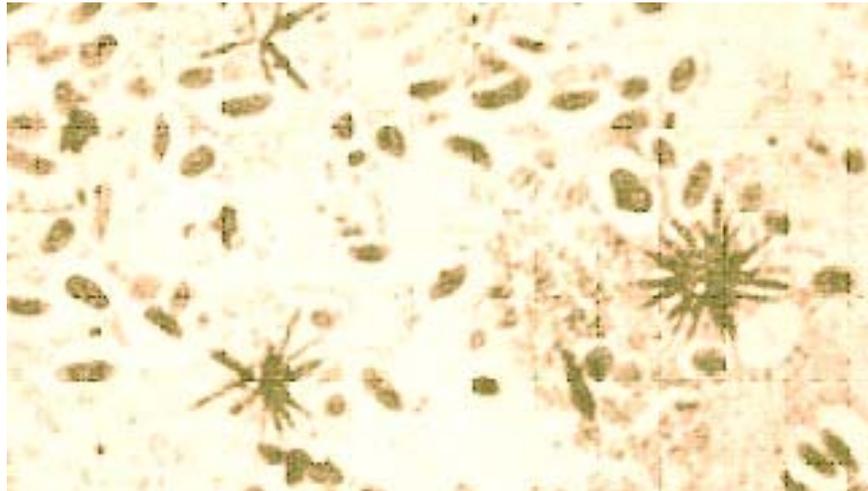
Las bacterias ruminales (Figura 3), suelen clasificarse en grupos nutricionales de acuerdo al substrato principal sobre el que actúan y a los productos de fermentación, con el objeto de determinar la contribución de cada especie bacteriana.

---

<sup>1</sup> Van Soest, 1982; Mackie, 1990; Hoover, 1991.

<sup>2</sup> Hungate, 1950; Hungate, 1966; Quigley, 1985; Steward *et al*, 1988; Mackie, 1990 ; Fondevila, 1998

Figura 3. Microfotografía de bacterias ruminales.



Fuente: Montalbetti, 2001

Algunas especies son altamente versátiles en su función mientras otras son muy especializadas. Los productos finales de la acción de algunas especies se metabolizan posteriormente por otras y por lo tanto no se acumulan.

Muchas bacterias poseen las enzimas necesarias para sintetizar una gran variedad de mezclas complejas de aminoácidos y pueden crecer con amonio como principal fuente de nitrógeno. Otras sin embargo requieren aminoácidos o ácidos grasos de cadenas ramificadas para su crecimiento.

Algunas bacterias del rumen y sus características se presentan en la Tabla 1<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Dehority, 1977; Weimer, 1996; Brock, 1997; Findlay, 1998; Montalbetti, 2001

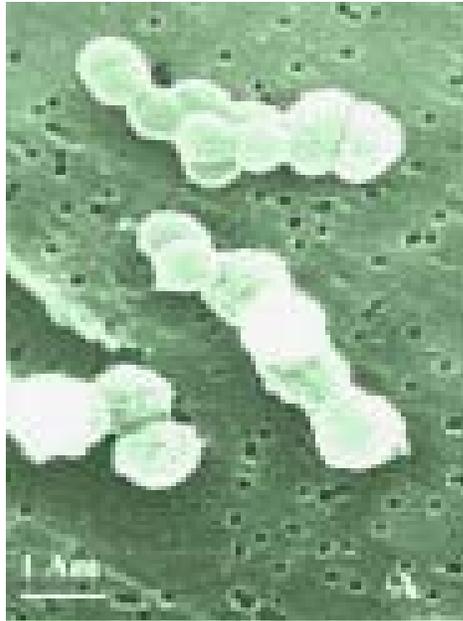
Tabla 1. Bacterias del rumen y sus características.

<b>Organismo</b>	<b>Morfología</b>	<b>Productos de fermentación</b>	<b>Sustrato</b>
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Bacilo	Succinato, acetato y formiato	Celulosa
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> Hemicelulosa	Bacilo	Acetato, formiato, lactato, curvado	Celulosa, xilano butirato, H <sub>2</sub> , y CO <sub>2</sub>
<i>Ruminococcus albus</i>	Coco	Acetato, Formiato H <sub>2</sub> , y CO <sub>2</sub>	Azúcares Celulosa, xilano pectina
<i>Clostridium locheadii</i>	Bacilo (endosporado)	Acetato, formiato, butirato H <sub>2</sub> , y CO <sub>2</sub>	Celulosa
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Coco	Succinato, acetato y H <sub>2</sub>	Celulosa, xilano pectina
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	Bacilo (endosporado)	Acetato, formiato butirato y H <sub>2</sub>	Celulosa y Almidón
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Bacilo	Acetato, formiato y succinato	Almidón
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Bacilo	Acetato, formiato y succinato	Almidón
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Bacilo curvado	Acetato, propionato y lactato produce amoniaco	Almidón
<i>Succinomonas amylolytica</i>	Ovalado	Acetato, propionato y succinato	Almidón
<i>Streptococcus bovis</i>	Coco	Lactato	Almidón
<i>Selenomonas lactilytica</i>	Bacilo curvado	Acetato y succinato	Lactato
<i>Megasphera elsdenii</i>	Coco	Acetato, butirato, propionato valerato, H <sub>2</sub> , y CO <sub>2</sub> , produce amoniaco	Lactato
<i>Veillonela parvula</i>	Coco	Acetato, propionato y H <sub>2</sub>	Lactato
<i>Lachnospira multiparus</i>	Bacilo curvado	Lactato, formiato, acetato H <sub>2</sub> , y CO <sub>2</sub>	Pectina
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Bacilo	Acetato, propionato y succinato	Lipolítico
<i>Eubacterium ruminantium</i>	Bacilo	Formiato, butirato, lactosa y CO <sub>2</sub>	Xilano
<i>Lactobacillus ruminis</i>	Bacilo	Lactosa	Azúcares
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	Bacilo	Lactosa	Azúcares
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	Bacilo	CH <sub>4</sub> ( de H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> o formiato)	Metanógenos
<i>Methanomicrobium mobile</i>	Bacilo	CH <sub>4</sub> ( de H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> o formiato)	Metanógenos
<i>Eurobacterium oxidoreducens</i>	Bacilo	Lactosa y H <sub>2</sub>	Aromáticos

Fuente: Autor.

➤ **Bacterias celulolíticas.** Dentro del grupo de microorganismos celulolíticos se encuentran como importantes: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, (Figura 4), *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium longisporum* y *Clostridium locheadii*.

Figura 4. Microfotografía de *Ruminococcus albus*



Fuente: G. Chalela

Estos microorganismos confieren al rumiante la capacidad de sobrevivir a base de forrajes fibrosos de mala calidad, porque tienen la capacidad de degradar celulosa<sup>4</sup>. Este sustrato formado por unidades de glucosa se degrada hasta ácido acético según la ecuación:



Las bacterias celulolíticas son bastante susceptibles al pH y su crecimiento se inhibe a valores por debajo de 6.2. Las bacterias celulolíticas son anoxigénicas

<sup>4</sup> Dehoriry, 1967; Fondeville, 1994; Fondeville, 1996; Russell, 1996

estrictas, requieren amoníaco en su mayoría como fuente de nitrógeno. Su ritmo de desarrollo depende de la disponibilidad de ácidos grasos de cadena ramificada<sup>5</sup>.

Mc Neill (1954), Scott (1965) y Fondeville (1994), encontraron que el crecimiento de las bacterias celulolíticas, está asociado con la presencia de ácidos grasos como el isobutírico, el isovalérico y el 2-metilbutírico, procedentes de la desaminación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, respectivamente; los cuales son necesarios en cantidades bajas para su crecimiento.

Las bacterias celulolíticas dependen de las no celulolíticas para que produzcan mediante la desaminación de los aminoácidos de cadenas ramificadas ácidos grasos, pues estos ácidos constituyen los esqueletos carbonados para la resíntesis de los correspondientes aminoácidos y lo que es más importante, para la síntesis de ácidos grasos de cadena más larga, como por ejemplo, el n-Pentadecanóico e Isotetranóico, que suelen incorporarse a la membrana celular de las bacterias.

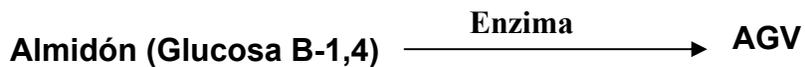
Las bacterias celulolíticas desarrollan diversos mecanismos muy especializados de adherencia íntima a estos substratos que evitan la degradación de las celulasas por las proteasas ruminales, protegiendo de la acción predatoria de los protozoos y evitan además su salida del rumen<sup>6</sup>.

➤ **Bacterias amilolíticas.** Fermentan almidón y son menos sensibles al cambio de pH que los microorganismos anteriores. Suelen predominar en dietas ricas en almidón aunque algunas prevalecen cuando existe poco almidón.

---

<sup>5</sup> Russell, 1996

<sup>6</sup> Latham, 1978; Rogere *et al*, 1988; Bhat, 1990; Fondeville, 1998



Fermentación Microbiana del Almidón (3)

La degradación la efectúan por la acción de la enzima alfa-amilasa extracelular partiendo al azar la cadena de almidón que posteriormente es degradada hasta AGV<sup>7</sup>.

En este grupo sobresalen: *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis* y *Bacteroides ruminicola*

➤ **Bacterias hemicelulolíticas y pectinolíticas.** Son de mucha importancia en la utilización y la degradación de la Hemicelulosa y de Pectina.



Degradación Microbiana de Hemicelulosas y Pectinas (4)

Se mencionan como hemicelulolíticas a *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Ruminococcus* spp. y como degradadoras de Pectina a *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Lachnospira multiparus*<sup>8</sup>.

➤ **Bacterias proteolíticas.** Una amplia gama de especies bacterianas tiene capacidad proteolítica. Las proteínas solubles, aminoácidos, péptidos, etc., se degradan hasta amoníaco. Las proteínas solubles se adhieren rápidamente a las paredes de las bacterias y por lo tanto se degradan fácilmente<sup>9</sup>.

<sup>7</sup> Van Soest, 1982; Steward *et al*, 1988; Hoover, 1991

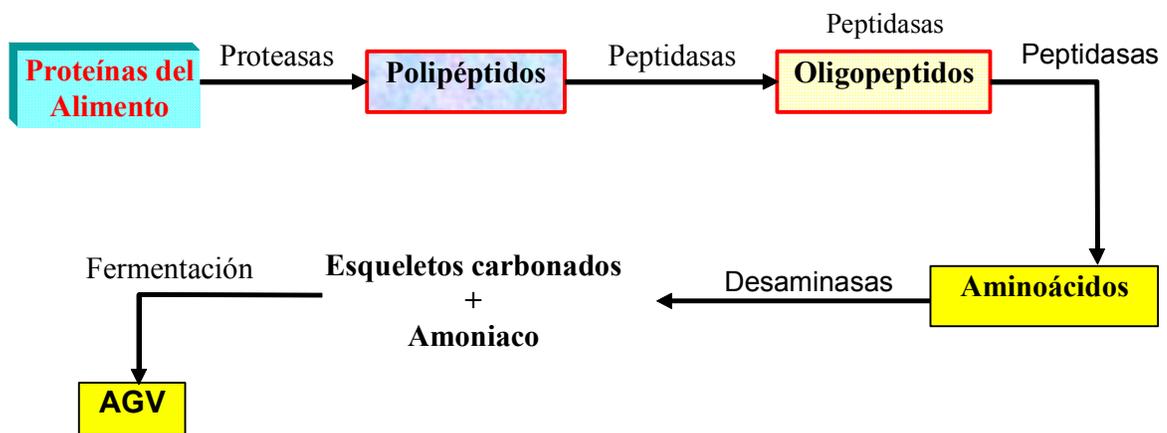
<sup>8</sup> Dehority, 1967; Akin, 1988; Fondeville, 1994; Fondevilla, 1998).

<sup>9</sup> Steward *et al*, 1988; Brooker, 1995; Russell, 1996

Los estudios practicados con inhibidores específicos indican que en el rumen existen al menos tres tipos de proteinasas microbianas, específicamente cisteína-proteinasa, serina-proteinasa y metalo-proteinasa.

La ruta general de la degradación de la proteína hasta amoniaco y finalmente ácidos grasos volátiles (AGV) asociada con enzimas es la siguiente:

Figura 5. Ruta general de la degradación de la proteína por los microorganismos ruminales.



Fuente: Mackie, 1990.

Las principales bacterias proteolíticas son: *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*. Muchas de estas especies bacterianas disponen de exopeptidasas para una posterior descomposición de oligopéptidos hasta aminoácidos y péptidos de cadena más corta<sup>10</sup>.

➤ **Bacterias productoras de amoníaco.** En general el amoniaco es la fuente de nitrógeno más importante para aquellas bacterias del rúmen que digieren

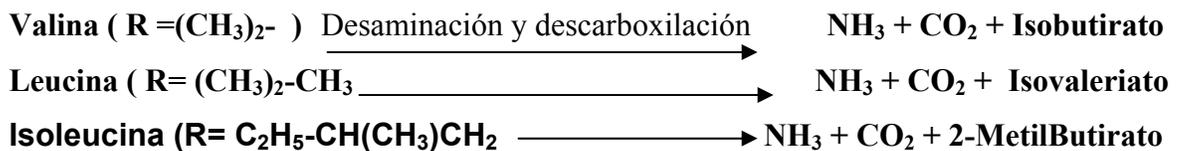
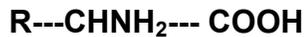
<sup>10</sup> Clark, 1993

carbohidratos complejos en lugar de azúcares sencillos. Muchas bacterias lo pueden producir por hidrólisis de la Urea<sup>11</sup>.



Producción de Metano por Bacterias Ruminales a partir de Urea (5)

A este grupo pertenecen también las productoras de amoniaco mediante desaminación de aminoácidos.



Desaminación de aminoácidos por Bacterias Ruminales (6)

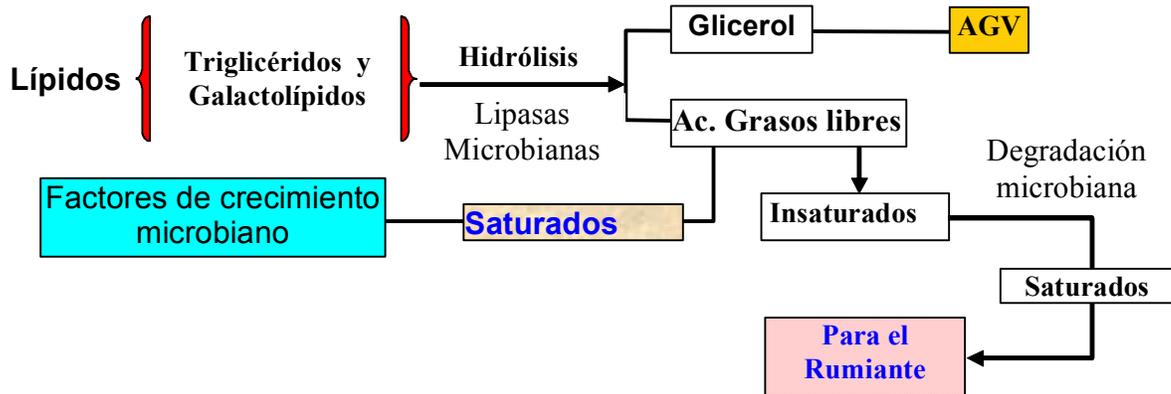
La desaminación oxidativa de valina hasta isobutirato, leucina hasta isovaleriato y de isoleucina hasta 2-metilbutirato con producción de NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub>, tiene particular importancia porque esos ácidos grasos de cadena ramificada son factores esenciales para el crecimiento de muchas bacterias del rúmen.

La producción de amoniaco mediante la desaminación de aminoácidos la realizan microorganismos tales como: *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* y algunas especies de *Butyrivibrio*.

➤ **Bacterias Lipolíticas.** Los lípidos se metabolizan activamente por la acción de estas bacterias del rumen para liberar glicerol y ácidos grasos.

<sup>11</sup> Hungate, 1966; Steward *et al*, 1988.

Figura 6. Metabolización microbiana de los lípidos del forraje.



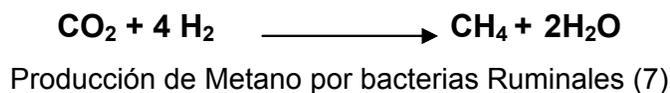
Fuente: Autor.

La hidrogenación de los ácidos grasos insaturados de cadena larga por las bacterias del rumen es la responsable de la descomposición relativamente constante de la grasa corporal de los rumiantes<sup>12</sup>.

La isomerización e hidrogenación parcial de los ácidos grasos insaturados que abundan en los piensos tales como los ácidos Linoléico y Linolénico pueden ser llevados a cabo por *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Treponema bryantii*, *Eubacterium* spp, y una cepa de *Ruminococcus albus*.

➤ **Bacterias productoras de metano.** Ejercen un papel importante en la regulación de la fermentación total porque eliminan el H<sub>2</sub> gaseoso.

La reducción de CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub> gaseoso es el método primario por el que se produce CH<sub>4</sub> en el rumen; sin embargo otros microorganismos pueden utilizar metanol, metilamina y acetato para producir metano.

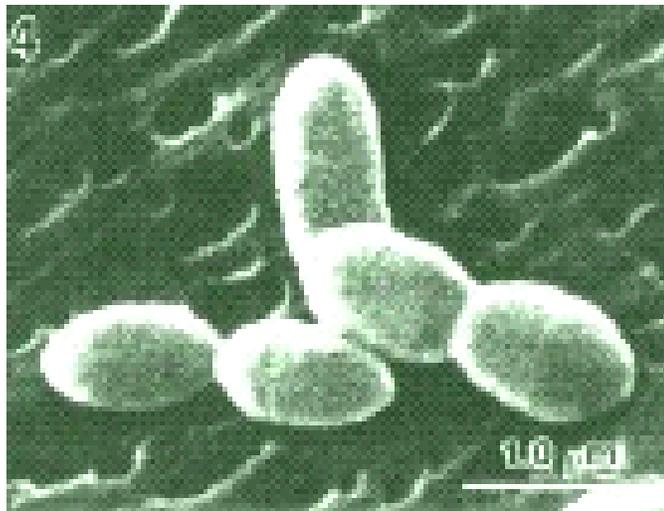


<sup>12</sup> Maynard *et al*, 1981; Van Soest, 1982

Al mantener baja la concentración de  $H_2$  en el rumen mediante la formación de  $CH_4$ , las bacterias metanogénicas promueven el crecimiento de otras especies bacterianas potenciadoras de los procesos fermentativos.

Las bacterias metanogénicas incluyen *Methanobrevibacter ruminantium*, (Figura 7), *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile*<sup>13</sup>.

Figura 7. Microfotografía de *Methanobrevibacter ruminantium*.



Fuente: Colección G. Chalela.

➤ **Bacterias que utilizan ácidos intermedios.** Estos microbios realizan la fermentación secundaria de los productos finales de otras bacterias del rumen. Entre los ácidos intermedios que usan se incluyen lactato, succinato y metanoato, El succinato, por ejemplo, es convertido a propionato y  $CO_2$  por *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella alcalescens*, *Anaerovibrio lipolytica* y *Propionobacterium spp*<sup>14</sup>.

<sup>13</sup> Hungate, 1966, Steward *et al*, 1988

<sup>14</sup> Hespell, 1987; Cotta, 1995; Dehority, 1998



**1.2.2 Protozoos.** El número de protozoos existentes en el rúmen es de unos  $10^5$  a  $10^6$  células/ml de contenido ruminal y en su mayoría son ciliados.

Han sido identificados 6 géneros y 16 especies pertenecientes a la familia *Isotrichidae*, de la que los géneros *Isotricha* y *Dasytricha* son prevalentes en el rumen y a la familia *Ophryoscolecidae* de lo que los géneros *Entodinium*, (Figura 8, izquierda) *Diplodinium*, *Epidinium* y *Osphryoscolex* (Figura 8, derecha), son prevalentes en el rumen<sup>15</sup>.

Figura 8. Microfotografía de un protozoos del género *Entodinium* (izquierda) y del género *Osphryoscolex* (derecha).



Fuente: Autor.

Todos los Protozoos ruminales son anoxigénicos estrictos, de mayor tamaño que las bacterias y se encuentran en menor cantidad. Cuando estos microorganismos se inhiben, el número de Bacterias se aumenta debido a que la fuente de

---

<sup>15</sup> Hungate, 1966; Hoover, 1991

nitrógeno para los protozoos proviene de las bacterias atrapadas y digeridas por los mismos. Por esta razón la producción de proteína microbiana es menor cuando los Protozoos están presentes.

Los Protozoos ingieren activamente bacterias como fuente de proteína y compiten eficazmente por substratos de forma que el número de bacterias del rumen puede reducirse a la mitad o más. Los protozoos no muestran preferencias por determinadas bacterias del rumen e ingieren también a las que no son nativas del rumen<sup>16</sup>.

La proteína y otros componentes bacterianos ingeridos los usan en gran medida para la síntesis celular. Carecen de capacidad Ureasa y el Amoniacó es por consiguiente, una mala fuente de Nitrógeno para su crecimiento.

Las especies del género *Entodina* digieren almidón; y por su parte los del género *Holotricha* absorben azúcares solubles rápidamente. El substrato dentro de la célula protozoaria se fermenta lentamente. La capacidad de los protozoarios para englobar partículas de almidón ha sido usada para aislarlos de las bacterias del rumen. Los protozoos ruminales son altamente proteolíticos<sup>17</sup>.

➤ **Protozoos ciliados.** Estos microorganismos son muy versátiles en su capacidad para degradar y fermentar una amplia gama de substratos, ingieren partículas de los alimentos y atacan a la totalidad de los principales componentes de los vegetales incluyendo Celulosa, Hemicelulosa, Pectina, Almidón, azúcares solubles y Lípidos<sup>18</sup>.

---

<sup>16</sup> Hungate, 1966; Amos, 1978; Brooker, 1995.

<sup>17</sup> Fondevilla, 1998, Dehority, 1998

<sup>18</sup> Amos, 1978

Todos los Protozoos almacenan grandes cantidades de polisacáridos tipo almidón de reserva, que utilizan cuando se agotan los suministros exógenos de energía. Los Aminoácidos y el Amoniaco se excretan como productos finales.

**1.2.3 Hongos.** Se han descubierto zoosporas de hongos anoxigénicos pertenecientes a los Oomycetes. Se han reportado 5 géneros.

Los hongos ruminales son productores de altos niveles de celulasa, hemicelulasa y xilanas. Ejemplos de estos microorganismos son: *Neocallimastix frontalis*, *N. hurleyensi*, *Piromyces comunis*, *Orpinomyces joyonii*, *Caecomyces comunis*<sup>19</sup>.

Los hongos se localizan en el material fibroso y se conocen como los más importantes degradadores de la pared celular; muestran una preferente colonización de la estructura de la lignocelulosa, celulosa y xilano. Sus hifas parecen penetrar profundamente dentro de las estructuras de la pared celular, haciendo a la fibra más accesible a las bacterias<sup>20</sup>.

Aunque su actividad sobre la pared no es muy clara parece ser que se debe a la actividad de colonización<sup>21</sup>.

**1.2.4 Factores involucrados en el crecimiento microbiano.** Estudios llevados a cabo por Mc Neill (1954), Bryant (1962), Scott (1965), Mackie (1990), Brooker (1995) y Dehority (1998), muestran que la actividad microbiana se dirige hacia la producción del ATP y a los requerimientos necesarios para el mantenimiento y crecimiento de la misma población microbiana. Cuando hay escasez o limitación de nutrientes, algunos microorganismos como los protozoos mueren rápidamente.

---

<sup>19</sup> Windham, 1984; Mackie, 1990; Akin, 1990; Fondevilla, 1998

<sup>20</sup> Bauchop *et al*, 1981

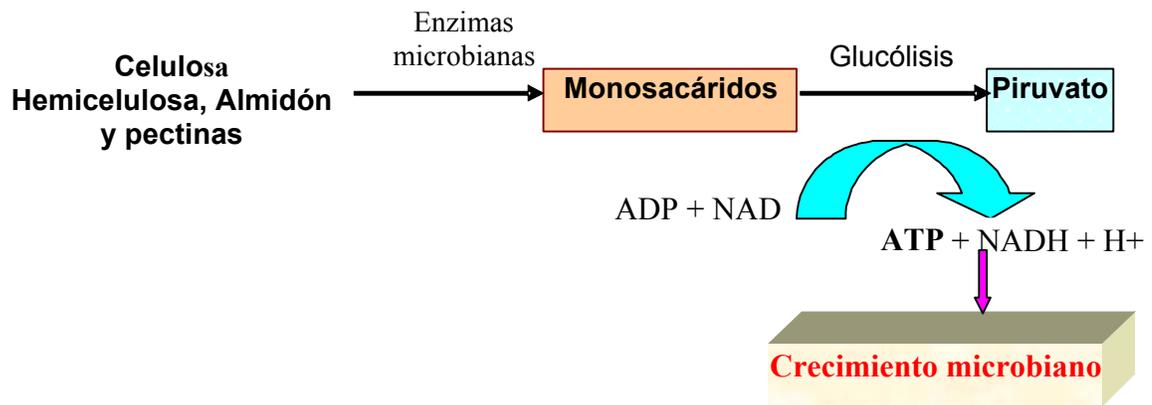
<sup>21</sup> Fondevilla, 1998

➤ **Compuestos nitrogenados.** Se ha demostrado que el 80% de las Bacterias existentes en el rumen pueden usar el Amonio como fuente de Nitrógeno para su crecimiento; el 26 % lo utilizan como nitrógeno y el 55 % como amonio y aminoácidos; como los Protozoos no usan Amonio asimilan los Aminoácidos directamente producidos durante la hidrólisis de péptidos y las proteínas cuando digieren bacterias ruminales.

Por su parte los protozoos rompen péptidos más rápidamente que las bacterias y excretan la mayoría de aminoácidos seguida por hidrólisis.

➤ **Carbohidratos.** La mayoría de los microorganismos ruminales utilizan carbohidratos como Glucosa, Manosa y Galactosa, como fuente de energía. La deficiencia de estas sustancias limitan la producción de ATP provocando una disminución en el desarrollo y la actividad microbianas<sup>22</sup>.

Figura 9. Producción de ATP por los microorganismos ruminales.



Fuente: Autor.

➤ **Lípidos.** Los Protozoos y Bacterias metabolizan lípidos pero no se encuentran datos sobre el metabolismo de estos compuestos por parte de hongos ruminales.

<sup>22</sup> Hungate, 1966; Steward *et al*, 1988; Mackie, 1990; Brock, 1997.

Los bajos niveles de grasas en las dietas (5% o menos) no afectan el crecimiento microbiano pero las altas cantidades de ciertas grasas son inhibitorias para los microbios, siendo especialmente tóxicas para las Bacterias metanogénicas, las celulolíticas y para los Protozoos<sup>23</sup>.

El mecanismo de la toxicidad no es claro, sin embargo se ha encontrado que:

- Las bacterias Gram (+) presentan mayor toxicidad que las Gram (-).
- Los ácidos grasos poliinsaturados son más nocivos que las grasas insaturadas aunque ambos son tóxicos. También se observa que las formas Cis son más tóxicas que las Trans.

➤ **Necesidades de azufre.** El azufre es un nutriente que los microorganismos requieren para alcanzar un crecimiento óptimo. La biomasa puede contener hasta 8 g de S/Kg materia seca. Los aminoácidos azufrados, Cisteína, Cistina y Metionina, representan una porción constante del total de los aminoácidos microbianos. La fuente de azufre para los microorganismos ruminales procede de la proteína de la ración, por lo que las deficiencias de este elemento se darán más cuando existan deficiencias de Nitrógeno<sup>24</sup>.

➤ **Necesidades de fósforo.** El Fósforo es un elemento esencial para las estructuras del ADN y ARN contribuyendo a la incorporación de estos ácidos a la doble hélice. Desde luego su función es esencial en todos los intercambios energéticos dentro de la célula, como por ejemplo la Adenosina-trifosfato y Guanina-trifosfato. El contenido de Fósforo de la microbiota ruminal se ha calculado entre 2 y 6 % de la materia seca<sup>25</sup>.

---

<sup>23</sup> Hoover, 1991

<sup>24</sup> Ibidem

<sup>25</sup> Mackie, 1990; Hoover, 1991

Las necesidades de Fósforo son mayores que las de Azufre, sin embargo se precisan más investigaciones para establecer si los requerimientos de Fósforo por parte del animal son mayores que los de la población microbiana y hasta que punto es utilizable por los microorganismos del rumen el Fósforo de la ración, en las condiciones normales de pH en el rumen<sup>26</sup>.

➤ **Necesidades de otros elementos y elementos traza.** Los microorganismos ruminales requieren minerales y elementos traza que aseguren el funcionamiento y metabolismo celular normales. Si uno o más de estos elementos están en cantidad insuficiente el ritmo de crecimiento y la producción microbiana se verán afectados.

Las raciones compuestas a base de forrajes, raíces o cereales no procesados, aportan la mayoría de los minerales necesarios, ya que las plantas requieren de estos mismos como factores de crecimiento<sup>27</sup>.

➤ **Componentes de las plantas.** Las plantas poseen un gran número de componentes que proporcionan una protección contra la invasión microbiana; los compuestos como Lignina, unidades de Fenilpropanoides y Taninos entre otros, afectan el crecimiento y la actividad metabólica de los microbios del rumen.

Existe una relación negativa entre el grado de lignificación y la digestión de la pared celular en los forrajes. La presencia de Fenil propanoides, p-Cumarinas y ácidos Ferúlicos o sus complejos con Hemicelulosa y Celulosa, reducen la digestión ruminal<sup>28</sup>.

---

<sup>26</sup> Van Soest, 1982; Mackie, 1990

<sup>27</sup> Van Soest, 1982; Hoover, 1991).

<sup>28</sup> Steward, 1988; Fondevila, 1998

Los Taninos, disminuyen el metabolismo microbiano inhibiendo enzimas como las celulasas y deprimiendo la digestión de materia seca, cuando se encuentran presentes en gran cantidad en los forrajes<sup>29</sup>.

➤ **Importancia de la dieta.** Los carbohidratos tales como la celulosa y otros polisacáridos representan la mayor parte de la dieta de los rumiantes, y constituyen el principal sustrato disponible para la fermentación. La dieta es probablemente el factor más importante de los influyentes en el número y en las proporciones relativas de las especies que habitan el rumen.

Variaciones en la dieta resultan cambios dramáticos en la población especialmente en periodo de adaptación, de forma específica en aquellas bacterias que utilizan lactato<sup>30</sup>.

Se ha observado que al cambiar bruscamente de dietas fibrosas a dietas ricas en concentrados, se produce una acidosis causada por la acumulación de ácido Láctico sin que la población microbiana se haya podido adaptar a éste. El pH ruminal puede ser tan bajo que únicamente sobreviven los lactobacilos.

Los microorganismos amilolíticos suelen predominar en el rúmen cuando se consumen dietas ricas en almidón, aunque algunos son más prevalentes cuando las dietas son pobres en este polisacárido. La degradación del almidón mediante la acción de los microbios amilolíticos supone la acción de alfa-Amilasas extracelulares que rompen al azar la cadena del almidón<sup>31</sup>.

Las dietas ricas en granos bajan el pH y permiten mayor crecimiento de bacterias amilolíticas reduciendo a las celulolíticas ya que aumentan la actividad de la amilasa; también hay reducción del crecimiento de los protozoos. El consumo de

---

<sup>29</sup> Mc Sweeney, 2000

<sup>30</sup> Hungate, 1966; Van Soest, 1982; Hoover, 1991

<sup>31</sup> Van Soest, 1982; Maynard *et al*, 1981

cantidades menores de concentrados estimula la aparición de elevadas concentraciones de protozoos, por ejemplo a pH 5,5 predominan los géneros *Isotricha* y *Entodinia*.

➤ **pH.** El pH es uno de los factores ecológicos más variables que puede influir profundamente en los microbios ruminales<sup>32</sup>.

La reducción del pH de 6,8 a 6 causa moderados efectos sobre la fermentación ruminal mientras que valores por debajo de 6 son bastante perjudiciales especialmente para los microorganismos fibrolíticos y proteolíticos inhibiendo su actividad severamente. Cuando el pH baja a 5, por una alta fermentación de almidones se favorecen las especies amilolíticas.

El pH alrededor de 6 puede causar disminución en la digestión de la fibra durante periodos cortos. A periodos más largos se produce severa reducción de la digestión fibra y de la materia orgánica, así como también la disminución de la producción de materia microbiana seca<sup>33</sup>.

El pH bajo puede retrasar la fijación de los microbios a la celulosa, debido a la ausencia de compuestos que estimulan dicha fijación como bicarbonatos o presencia de inhibidores de la fijación como es el almidón soluble. También se inhibe la digestión de la celulosa.

Un valor de pH bajo también reduce la tasa de división celular especialmente de las bacterias celulolíticas evitándose su multiplicación. Así mismo los protozoos se ven afectados por el descenso de los valores del pH.

---

<sup>32</sup> Mackie, 1990; Russel, 1996

<sup>33</sup> Steward *et al*, 1988; Russel, 1996

Con dietas de concentrados el pH del fluido ruminal oscila entre 5,5 y 6, y con alimentación de forrajes, oscila entre 6,2 y 7<sup>34</sup>.

➤ **Fijación de los microorganismos.** La fijación de los microorganismos a las superficies de los forrajes es un factor importante en la degradación de éstos. Para que las bacterias mantengan su número, es necesario que su tiempo de generación, es decir, el tiempo para que la duplicación microbiana sea más corto que la velocidad de intercambio de la digesta del rumen. Si no fuera este el caso, las bacterias podrían ser arrastradas fuera del rumen. Como la velocidad de salida de la fase particulada es mucho más lenta que la de la fase líquida en el rumen, las especies de crecimiento más lento evitan ser arrastradas fijándose a diversas superficies<sup>35</sup>.

La mayoría de las bacterias y protozoos presentes en el rumen se fijan a partículas de alimento. Las especies celulolíticas del rumen tales como *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*, se adhieren a las membranas de las células vegetales por medio de una envoltura de glicoproteína extracelular que rodea a la célula. Esta fijación al sustrato facilita una degradación más eficaz mediante enzimas localizadas en el material extracelular o en la superficie celular y se reducen también al mínimo la pérdida de productos hidrolíticos de celulosa y hemicelulosa para las especies que buscan nutrientes<sup>36</sup>.

El mismo comportamiento se puede aplicar a los protozoos. Actualmente se sabe que microorganismos del tipo Oligotricha pueden ser retenidos de forma preferencial en el rumen mediante su fijación a partículas de materia orgánica mientras que los Holotricha quedan secuestrados en la pared del retículo. Algunos

---

<sup>34</sup> Mackie, 1990; Hoover, 1991; Russell, 1996.

<sup>35</sup> Latham, 1978; Akin, 1988; Mc Gavin, 1989; Bhat, 1990; Rogere *et al*, 1990; Fondevila, 1998

<sup>36</sup> Latham, 1978; Fondevila, 1998

Protozoos del tipo *Epidinium* se han encontrado fijos a fragmentos vegetales, evitando así ser arrastrados totalmente con la fase líquida<sup>37</sup>.

A medida que avanza la digestión, la población adherente crecerá sobre el sustrato hasta que las células sean liberadas pasando al fluido del rumen bien para recolonizar un nuevo sustrato o para abandonar el rumen. Cabe anotar que no todos los microorganismos del rumen son adherentes.

Se ha observado también fijación de bacterias a protozoos aunque no se conoce bien sobre la importancia de esta asociación. Es posible que en algunos casos se facilite la transferencia interespecífica de H<sub>2</sub>. La frecuencia de la unión de las bacterias metanogénicas y los protozoos parece aumentar durante el ayuno y disminuye cuando el animal recibe alimento<sup>38</sup>.

**1.2.5 Importancia de los microorganismos ruminales.** Los microorganismos son el factor clave en el metabolismo del Nitrógeno y de los carbohidratos en los rumiantes; es la capacidad y actividad de la población microbiana existente la que da al animal la energía y los compuestos necesarios para su mantenimiento, crecimiento y producción<sup>39</sup>.

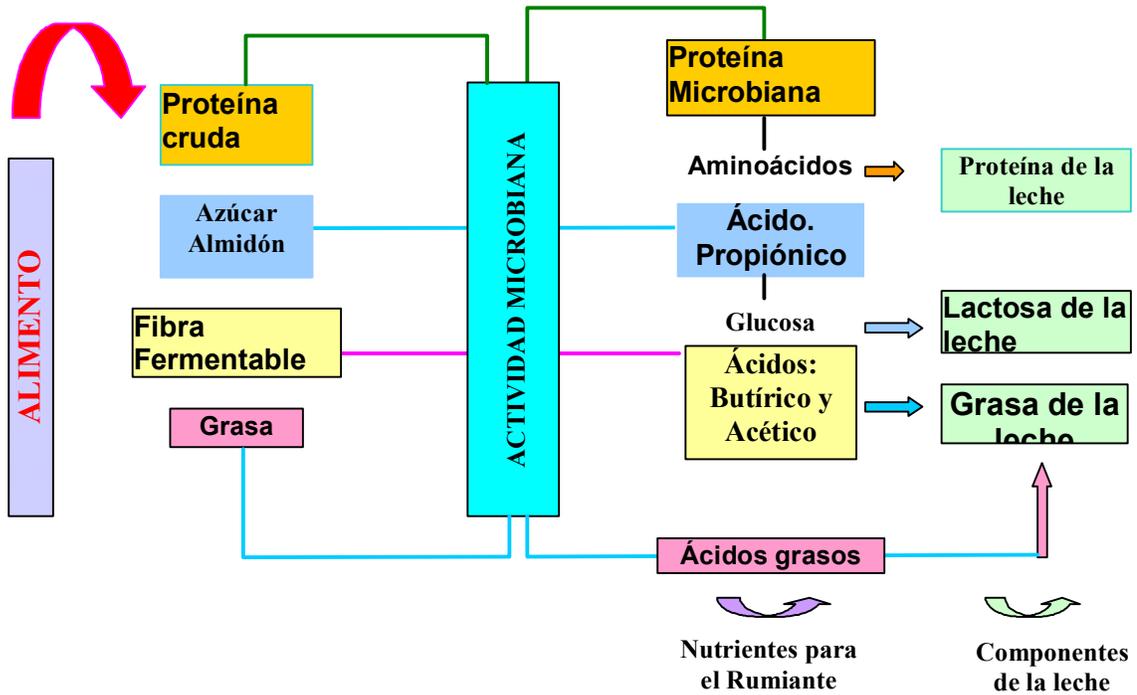
---

<sup>37</sup> Amos, 1978; Van Soest, 1982.

<sup>38</sup> Fondevila, 1998

<sup>39</sup> Maynard *et al*, 1981; Van Horn *et al*, 1992

Figura 10. Actividad Microbiana sobre el Forraje



Fuente: Autor.

La proteína bacteriana contiene grandes cantidades de aminoácidos esenciales y es una fuente de proteínas para el animal. A medida que las bacterias se multiplican, sintetizan proteínas para construir células obteniendo la materia prima a partir del alimento que se ingiere. Pueden usar amidas, sales de amonio, y aun nitratos así como la proteína misma. La proteína bacteriana que se forma en el rumen se digiere posteriormente en el estómago e intestino<sup>40</sup>.

Se considera que la proteína microbiana aporta cerca del 70% de los requerimientos proteicos de la vaca lechera; este valor depende del nivel de producción de leche y de la dieta<sup>41</sup>.

Después del destete los rumiantes obtienen su alimentación a partir de los vegetales. Las células de los pastos están formadas por pared celular, que

<sup>40</sup> Hans, 1975; Stalling, 1992

<sup>41</sup> Brooker, 1995; Carulla, 1999; Quigley, 1998).

contiene celulosa como mayor componente, hemicelulosa y lignina, y un contenido celular formado por proteína, carbohidratos, vitaminas y minerales; a medida que las hojas van creciendo el contenido celular va disminuyendo y la pared celular va aumentando, haciéndola menos digerible.

Según Van Soest (1982), Van Horn *et al*, (1992) y Fondevila, (1998), los carbohidratos estructurales o carbohidratos de la pared celular representan a los componentes fibrosos en la ración, y son importantes para el rumiante porque estimula el flujo, la producción de saliva, y la rumia; además mejora la salud animal y la función ruminal en general.

Hungate, (1966), Maynard *et al*, (1981), Clark, (1993) y Van Soest (1982), explican que el total de carbohidratos de la ración vegetal está dividido en dos fracciones: la que constituye la pared celular y que se fermenta a ácidos Acético y Butírico; y el contenido celular que fermenta a ácido Propiónico. Estos compuestos que conforman el grupo de los llamados Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), constituyen la mayoría de los ácidos producidos en el rumen y su importancia radica en que los rumiantes dependen de ellos como fuente primordial de energía para llevar a cabo sus procesos metabólicos y de producción.

En las raciones altas en fibra, propias de los pastos tropicales colombianos, la producción de ácido acético, es predominante, siendo éste el principal responsable de la producción de energía, de la síntesis de la grasa corporal animal y de la leche; también contribuye a este fin el ácido butírico. La concentración de ácidos en el rumen está repartida así, ácido acético en el rumen es del 65% (como porcentaje en moles), 20% como ácido propiónico y 15% como ácido butírico.

## Esquema 1. Aprovechamiento de los Carbohidratos de la Dieta



Fuente: Autor.

Al ser absorbido, el ácido propiónico, derivado de las fuentes de almidón y azúcares propicia una serie de funciones metabólicas; se convierte en glucosa, compuesto que es muy utilizado durante la lactancia para la producción de lactosa o azúcar de leche. La glucosa se convierte en glicerol y junto con el acetato y el butirato se utiliza en parte como unidad de construcción de los ácidos grasos que se encuentran en la leche.

Los rumiantes dependen principalmente de la actividad microbiana desarrollada en el rumen, para degradar los forrajes, obteniendo la proteína y la energía necesarias para su buen desarrollo, mantenimiento y producción.

A lo largo de este capítulo se ha querido denotar la importancia fundamental que tienen las diferentes clases de microorganismos encontrados en el rumen, en el proceso de nutrición animal y, la preferencia que esta clase de microbiota posee por determinados sustratos y sus productos finales de fermentación.

Los microorganismos ruminales tienen un impacto significativo en el aprovechamiento de la dieta. Las transformaciones microbiológicas llevadas a cabo sobre el alimento que consume el rumiante, dependen de la preferencia que las especies tengan por los diferentes componentes, convirtiendolos en, ácidos grasos volátiles, (AGV, principalmente acético, butírico y propiónico), metano, dióxido de carbono, amonio y proteína microbiana.

Los microorganismos que viven en el rumen dependen de los forrajes que consume el animal y de las condiciones ambientales existentes, (pH, temperatura, anoxigenia), para su supervivencia; algunas especies pueden incrementar el número otras por el contrario disminuirlo.

La población ruminal está conformada por una gran cantidad de microorganismos en las cuales se colocan en primer plano a las bacterias teniendo en cuenta el mayor número y diversidad metabólica. Algunas son muy especializadas en su actividad sobre determinado sustrato, otras tiene la capacidad de sobrevivir sobre diversos sustratos como se observa en la Tabla 1.

Los forrajes ricos en fibras, existentes en nuestros suelos tropicales, son aprovechados por los rumiantes gracias a la presencia de los microorganismos celulolíticos, especialmente las bacterias, por lo que este grupo microbiano es de gran importancia en el proceso digestivo.

La utilización del material fibroso se desarrolla en una verdadera relación simbiótica, de tal manera que el animal provee el ambiente apropiado para el crecimiento microbiano y, los microorganismos actuando sobre los componentes de la pared celular vegetal, (fibra), proporcionan al animal AGV (Ácidos grasos volátiles), principalmente el ácido acético que actúa como fuente esencial de energía y precursor de la síntesis de la grasa corporal y de la leche. Gracias a la microbiota ruminal celulolítica los carbohidratos fibrosos como la celulosa y hemicelulosa pueden ser aprovechados por el rumiante.

De otra parte, las bacterias celulolíticas también se ven beneficiadas con el proceso fermentativo llevado a cabo sobre los carbohidratos estructurales (material fibroso) porque a partir de ellos obtienen ATP para su desarrollo, multiplicación y actividad.

La cantidad de ácidos grasos volátiles generada por la actividad microbiana y presente en el rumen, depende de la dieta y se estima que para raciones ricas en fibra el porcentaje molar de los ácidos, acético y butírico, de suma importancia como productos energéticos, constituyen un 80-85 % de los AGV, producidos. Los rumiantes alimentados con forrajes tropicales obtienen la energía para su desarrollo, crecimiento y producción a partir de estos ácidos principalmente.

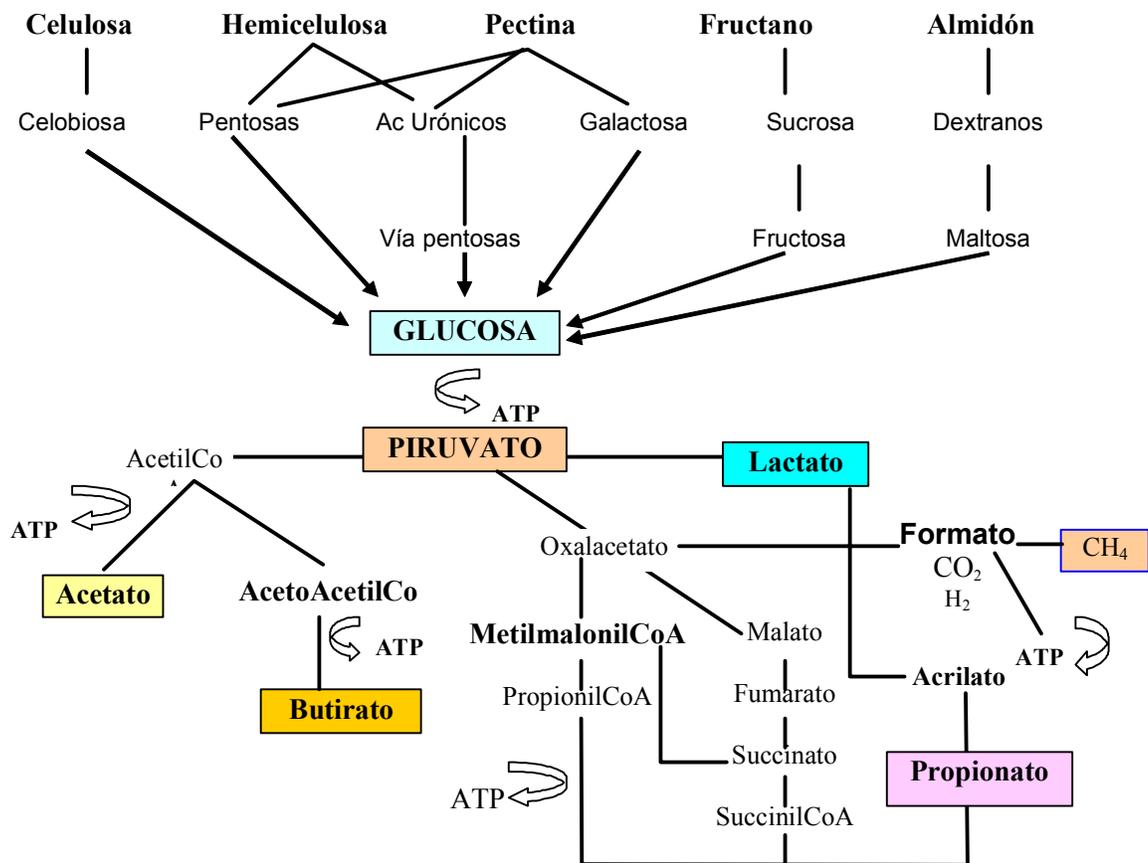
El conocimiento de la utilización que las poblaciones microbianas llevan a cabo sobre los componentes fibrosos de los forrajes en el trópico, permiten un mayor entendimiento de la actividad metabólica desarrollada en el rumen. Resulta de particular importancia la realización de investigaciones con microorganismos ruminales y poder establecer cuales poblaciones tienen mayor incidencia en la conversión del forraje de bajo valor nutricional, hacia la producción de compuestos útiles para el rumiante, como son los ácidos acético y butírico, evaluados en la presente investigación .

## 2. FERMENTACIÓN RUMINAL

### 2.1 METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

Durante la fermentación ruminal la población bacteriana principalmente, fermenta los carbohidratos para producir energía, gases como metano y dióxido de carbono, calor y ácidos.

Figura 11. Ruta del Metabolismo de los Carbohidratos y Síntesis de AGV por Microbios Ruminales



Fuente: Van Soest, 1982.

La estequiometría total de la fermentación ruminal es la siguiente:



Estequiometría de la Fermentación Ruminal (9)

Las hexosas se degradan en el rumen principalmente por vía glicolítica, la cual convierte glucosa a piruvato y éste es metabolizado por una variedad de mecanismos para producir los ácidos grasos volátiles (AGV) tipo Acético, Propiónico y Butírico, que constituyen la mayoría de los ácidos producidos en el rumen. El dióxido de Carbono al igual que el metano se producen y se eructan (Maynard, 1981; Van Soest, 1982; Clark, 1993)

La mayoría del acetato y todo el propionato se transportan al hígado; el acetato se integra a la corriente sanguínea, es fosforilado y entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) con producción de 10 moles de ATP por mol de ácido Acético absorbido.



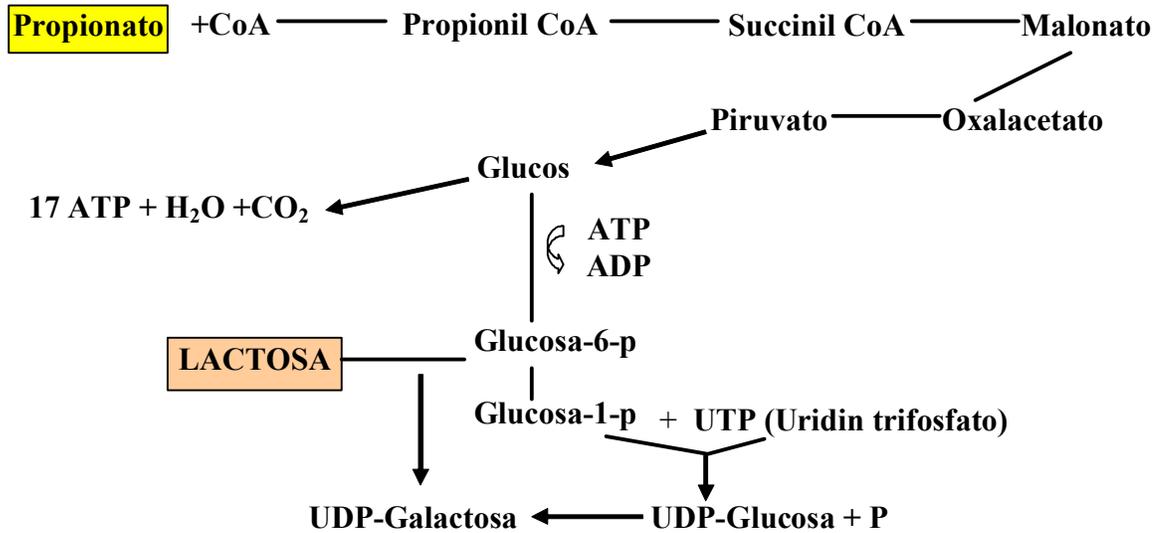
El acetato también participa en la síntesis de la grasa de la leche especialmente en la producción de los ácidos grasos de cadena corta; el proceso es muy complejo.

Los trabajos realizados por Hans (1975), Maynard (1981) y Van Soes (1982), muestran que en el hígado, el propionato se convierte en glucosa, compuesto que es muy utilizado durante la lactancia, principalmente para la producción de lactosa o azúcar de leche; en otras palabras, la cantidad de leche producida está estrechamente relacionada con la cantidad de lactosa y ésta a su vez con el

propionato producido.

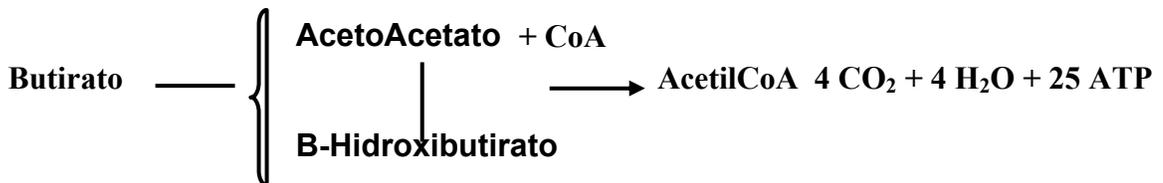
La conversión de Propionato a Glucosa y luego a Lactosa sigue una serie de pasos por medio de enzimas específicas como se muestra en la Figura 12.

Figura 12. Conversión del propionato en lactosa.



Fuente: Autor.

El butirato se convierte en la pared del rumen en cetonas que son fuente de energía.



Conversión del butirato en Fuente de Energía (11)

La glucosa también se convierte en glicerol y al igual que el acetato y el butirato producidos en el rumen se utiliza en parte como unidad de construcción de los ácidos grasos que se encuentran en la leche.

La fermentación en el rumen es el resultado de la interacción entre los microorganismos y el sustrato (digestión de forraje) y entre los diferentes microorganismos que forman parte del ecosistema ruminal (Interacciones microbianas).

## **2.2 DIGESTIÓN MICROBIANA DE LOS CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES O COMPONENTES FIBROSOS DE LOS FORRAJES**

Los microorganismos ruminales degradadores de fibra, constituyen la microbiota de mayor importancia en la utilización de forrajes y pastos de baja calidad proporcionando al rumiante la principal fuente de energía a través de la producción de los ácidos grasos volátiles como butírico, acético y propiónico.

Según los estudios de Dehority (1962), Copen (1970), Weimer (1996), y Fodevilla (1998), a pesar del papel de las poblaciones protozoarias y de las fúngicas especialmente que son muy importantes en los procesos degradativos de los componentes de la pared celular vegetal, son las Bacterias, los microorganismos más activamente implicados por su alta actividad enzimática y concentración en el rumen.

La digestión microbiana de los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina) en el rumen se lleva a cabo por dos procesos: 1) Colonización y adhesión a los sustratos y 2) Actividad enzimática sobre los mismos<sup>42</sup>.

**2.2.1 Adhesión al sustrato.** La adhesión íntima al sustrato permite una mayor eficiencia de hidrólisis enzimática y una mayor disponibilidad de los productos de la digestión de la pared, además de proteger contra la predación de otras especies.

---

<sup>42</sup> Dehory, 1965; Dehority, 1967; Akin, 1988; Rusell *et al*, 1992; Weimer, 1996; Fondevila 1998

La adhesión puede ocurrir por mecanismos inespecíficos que implican atracción fisicoquímica o interacciones con otros microbios adheridos a las partículas. La importancia de la adhesión se ha puesto de manifiesto en muchas investigaciones tales como las realizadas por Fondevila (1998) y Latham (1988), las cuales llegan a considerarla como un requisito indispensable para una óptima degradación de los forrajes.

El conocimiento de los mecanismos de adherencia por parte de los protozoos y los hongos es escaso<sup>43</sup>.

En el caso de las bacterias, el Glicocalix, los Celulosomas y los sectores de enlace de enzimas celulolíticas actúan como estructuras de adherencia. Los estudios de microscopía electrónica han detectado que los microbios celulolíticos *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*, poseen una cápsula glicoprotéica externa que envuelve a las bacterias denominada Glicocálix<sup>44</sup>.

**2.2.2 Actividad enzimática.** Las enzimas implicadas en los procesos de degradación de materiales fibrosos se encuentran ampliamente distribuidas entre las diferentes especies de microbios ruminales celulolíticos, tal es el caso de *Fibrobacter succinogenes*, uno de los microbios más estudiados y que presenta un complejo enzimático muy activo en la degradación de celulosa. Los hongos ruminales también producen un complejo enzimático muy activo.

Se ha observado que algunos de los complejos enzimáticos celulolíticos de los organismos ruminales poseen además de su parte catalítica, una parte

---

<sup>43</sup> Windham, 1984; Akin, 1988; Fondevila, 1998

<sup>44</sup> Rogere, 1988; Bhat, 1990; Weimer, 1996



(a) exo- 1, 4-  $\beta$  glucanasa (celobiohidrolasa). (b) endo- 1,4-  $\beta$  glucanasa. (c) celodextrinasa. (d) 1,4-  $\beta$  glucosidasa (celobiasa). (e) endo- 1, 4-  $\beta$  xilanasa. (f),-L- arabinofuranosidasa. (g) acetil - xilan esterasa. (h) ácido ferúlico esterasa. (i) - glucuronidasa. (j) 1,4-  $\beta$  xilosidasa.

Glu: glucosa ; Xil: xilosa ; Ara: arabinofuranosa ; Ac: grupo acetilo; Fer: ácido ferúlico ; me Glc: ácido 4-O- metil glucurónico.

Fuente: Flint, 1994.

Según Fondevila (1998), este proceso se inicia con el ataque de las endo. 1,4 beta glucanasas (celobiohidrolasas) a las regiones más amorfas de la celulosa, rompiendo aleatoriamente las cadenas en celodextrinas y creando así extremos libres para la acción de las exo-1,4 beta glucanasas, que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo de la cadena. Estas celobiosas son finalmente hidrolizadas a glucosa por la beta-glucosidasa.

Las xilanasas están más ampliamente distribuidas entre las bacterias ruminales que las celulasas, aunque hay que tener en cuenta la mayor diversidad de las enzimas implicadas en la hidrólisis de las hemicelulosas, debida a la propia variabilidad en la composición de este polisacárido<sup>46</sup>.

## **2.3 INTERACCIÓN MICROBIANA RUMINAL**

El estudio de las interacciones ruminales es necesario para el entendimiento de la contribución de los diferentes microorganismos en las actividades metabólicas en el rumen y el aprovechamiento en la utilización y degradación del forraje, especialmente aquellos ricos en componentes fibrosos.

Muchas de ellas se conocen y han mostrado ser importantes para la supervivencia de algunos de los microbios, así como para el mejor aprovechamiento del alimento

---

<sup>46</sup> Amos, 1978; Akin, 1988; Fondevila, 1998.

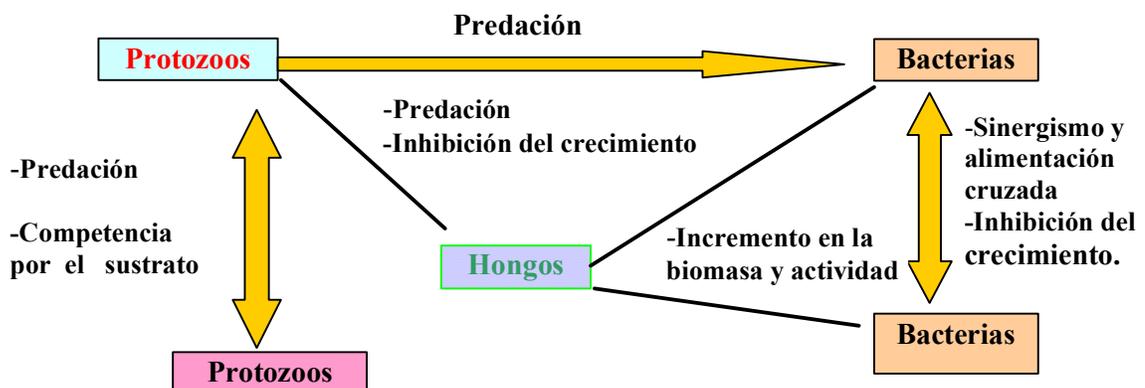
por parte del animal. Sin embargo existe dificultad para estimar las interacciones entre esas poblaciones mixtas<sup>47</sup>.

La mayoría de las interacciones observadas en la microbiota ruminal están basadas en experimentos “*in vitro*” utilizando cultivos axénicos o mezclas. El análisis de los substratos utilizados, las pautas bioquímicas que intervienen, y los productos finales obtenidos en los cultivos puros han aportado mucho sobre las interacciones metabólicas que tienen lugar.

Los compuestos como succinato, lactato, etanol, metanoato y H<sub>2</sub> que se encuentran o se producen en los cultivos microbianos puros no suelen acumularse en el rumen, debido a su posterior transformación en ácido grasos volátiles u otros compuestos.

En la microbiota ruminal se encuentra efectos que pueden clasificarse como positivos o negativos, de inducción o de inhibición.

Figura 14. Interacciones Microbianas



Fuente: Dehority, 1998.

<sup>47</sup> Copen, 1970; Osborne, 1989; Dehority, 1991; Fondevila, 1996; Fondevila, 1998.

**2.3.1 Interacción entre protozoos.** Las interacciones entre protozoos o de éstos con otras especies ruminales son de tipo predación principalmente, aunque también existe competencia por el sustrato. Se ha observado que la predación de protozoos es mayor con bacterias que con hongos, ocasionando de esta forma disminución en los procesos de fermentación<sup>48</sup>.

**2.3.2 Sinergismo entre bacterias y hongos.** Los efectos entre hongos y bacterias pueden ser positivos o negativos:

-Efectos Negativos: Las investigaciones realizadas por Bernalier *et al*, (1992 y 1993), sobre interacciones en co-cultivos muestran que algunas bacterias ruminales pueden inhibir el crecimiento y actividad tanto de hongos como de otras especies bacterianas, debido a competencia por el sustrato o a producción de inhibidores del crecimiento de otras especies.

-Efectos Positivos: La única interacción positiva encontrada es la cooperación entre hongos y bacterias y entre los diferentes géneros bacterianos.

A manera de ejemplo se pueden citar los siguientes casos:

Según Scott (1992), los hongos ruminales producen apreciables cantidades de Hidrógeno que son utilizadas por bacterias principalmente las metanogénicas proporcionando un efecto regulador importante en la fermentación debido a que el hidrógeno no se acumula en el rumen porque se utiliza para reducir el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>.

La eliminación eficaz de H<sub>2</sub> por estas especies metanogénicas estimula a importantes especies productoras de H<sub>2</sub> tales como *Ruminococcus albus*, y otras muchas para producir mas H<sub>2</sub> y así alterar su metabolismo hacia vías con

---

<sup>48</sup> Dehority, 1998

mayores rendimientos de energía. Los mayores rendimientos de ATP determinan la formación de más células microbianas con lo que se aumenta la proteína disponible para el rumiante.

La actividad sinérgica de los hongos anaeróbicos del rumen sobre degradación de la celulosa ha sido considerada. Resultados sobre interacción entre *Neocallimastix frontalis*, productor de grandes cantidades de celulosas y, bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes* en la degradación de celulosa, han demostrado un efecto positivo en la actividad sobre este sustrato<sup>49</sup>.

Se ha sugerido que los hongos ruminales juegan un papel importante en la degradación del material fibroso debilitando los enlaces comprometidos en estas estructuras y facilitando la actividad bacteriana sobre el sustrato a través de un incremento de los sitios disponibles para la colonización. Sin embargo, el conocimiento de la acción enzimática, o mecánica, o combinadas por las cuales los hongos anaeróbicos penetran las paredes celulares vegetales todavía son motivo de estudio.

A pesar de la gran capacidad que poseen los hongos ruminales para degradar los componentes estructurales de las paredes de las plantas, el mayor porcentaje de esta degradación es aún asignada al grupo bacteriano.

En investigaciones recientes realizadas por Beharka (1998), que se fundamentaron en los estudios de Wiedmeier (1987) y Bauchop *et al*, (1981), se ha observado que *Aspergillus oryzae*, un hongo no ruminal, interactúa positivamente estimulando la velocidad de crecimiento de bacterias degradadoras de fibra como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*; y también de las bacterias que utilizan lactato: *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas lactilytica* y *Selenomonas ruminantium*.

---

<sup>49</sup> Akin, 1983; Whindham, 1984, Richardson *et al*, 1986; Akin, 1988.

Se cree que el efecto de la estimulación del hongo a las bacterias ruminales se deba a factores como: a) incremento en la actividad sobre los sustratos, (para el caso de las celulolíticas), puesto que algunas especies de *Aspergillus oryzae* son productoras de una variedad de enzimas comprometidas en el proceso de degradación de componentes de la pared celular vegetal facilitando el proceso; b) estabilización del pH ruminal, debido a que el incremento en la actividad de las bacterias que fermentan lactato, reduce el acumulamiento del ácido láctico que es a menudo asociado con la baja del pH; c) producción de factores de crecimiento desconocidos y necesarios para las bacterias.

**2.3.3 Interacción entre bacterias.** Las interacciones positivas entre bacterias pueden ser de alimentación cruzada o de sinergismo inductor<sup>50</sup>.

El efecto de sinergismo publicado por Cotta (1995) y Dehority (1998), es el correspondiente a la alimentación cruzada mostrado por especies que son productoras de compuestos que a su vez son utilizados por otros microorganismos como nutrientes para su desarrollo y actividad, o para producir otra sustancia de interés; tal es el caso de *Fibrobacter succinogenes*, microorganismo celulolítico que produce succinato, compuesto que es utilizado por *Selenomonas spp* para producir propionato.

La mayoría de las interacciones observadas entre las diferentes especies de bacterias ruminales es un marcado sinergismo en la digestión de carbohidratos estructurales<sup>51</sup>.

Especies celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, y *Ruminococcus flavefaciens*, digieren grandes cantidades de celulosa y no se

---

<sup>50</sup> Cotta,1995; Holly, 1998; Fondevila,1998.

<sup>51</sup> Osborne, 1989; Fondevila,1994; Fondevila, 1996

encuentra aumento en la digestión por parte de algunas de estas especies en cocultivos. Sin embargo cuando se realizaron combinaciones con la especie no celulolítica, *Provetella ruminicola*, (hemicelulolítica), se observó que la degradación de la celulosa a partir de forrajes intactos, aumentó para todas las combinaciones<sup>52</sup> (Tabla 2).

Los investigadores proponen que durante el proceso de degradación de la hemicelulosa por la bacteria *Provetella ruminicola*, ésta deja disponible celulosa contenida en el complejo polisacárido (celulosa, hemicelulosa) que forma la pared celular vegetal, para que las bacterias celulolíticas pueden degradar y utilizar ese sustrato, dando lugar al efecto sinérgico encontrado cuando interactúan las bacterias celulolíticas con las no celulolíticas.

Tabla.2. Degradación de celulosa por bacterias ruminales solas y en combinación

Microorganismos	Porcentaje de degradación de la celulosa en forraje (%)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	61,9
<i>Ruminococcus albus</i>	44,7
<i>Ruminococcus flavefasciens</i>	44,1
<i>Provetella ruminicola</i>	1,6
<i>Fibrobacter succinogenes</i> + <i>Provetella ruminicola</i> .	66,2
<i>Ruminococcus albus</i> + <i>Provetella ruminicola</i>	48,8
<i>Ruminococcus flavefasciens</i> + <i>Provetella ruminicola</i> .	47,0

Fuente: Dehority, 1998.

La Tabla 3 permite observar que las especies hemicelulolíticas como *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Ruminococcus flavefasciens* que degradan hemicelulosa, combinadas con otras especies hemicelulolíticas que no degradan pero que si la

<sup>52</sup> Osborne, 1989; Dehority, 1991; Fondevila, 1998

utilizan como fuente de energía, hacen posible el aprovechamiento de este substrato en forrajes intactos. Para todas las combinaciones se notó un incremento en la degradación<sup>53</sup>.

Tabla 3. Degradación de Hemicelulosa por especies de microorganismos ruminales solos y en combinación.

Microorganismo	Porcentaje de degradación de Hemicelulosa en forrajes (%)
<i>Ruminococcus flavefasciens</i>	56,3
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	35,4
<i>Provetella ruminicola</i>	33,6
<i>Lachnospira multiparus</i>	49,5
<i>Ruminococcus flavefasciens</i> + <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	61,9
<i>Ruminococcus flavefasciens</i> + <i>Provetella ruminicola</i>	59,6
<i>Ruminococcus flavefasciens</i> + <i>Lachnospira multiparus</i>	61,8
TODAS LAS ESPECIES	61,8

Fuente: Dehority, 1998

Los resultados de las investigaciones indican que las especies hemicelulíticas utilizan hemicelulosa como fuente de energía; pero se encuentra que algunas de las bacterias que usan hemicelulosa son incapaces de degradar y utilizar el carbohidrato a partir de forrajes intactos. Sin embargo si la hemicelulosa es aislada, (por medios químicos), se observa que es degradada y utilizada casi completamente por estas especies hemicelulolíticas.

<sup>53</sup> Dehory, 1962; Coen, 1970; Osborne, 1989; Mackie, 1990; Dehority, 1998

A través de sus estudios los investigadores concluyen que las especies que no utilizan hemicelulosa pueden degradarla a partir de forrajes intactos y colocarla a disposición de las especies que si utilizan; es así como combinaciones de unas bacterias degradadoras con otras utilizadoras de hemicelulosa permiten un sinergismo en la degradación del sustrato a partir de forrajes intactos. Los hallazgos han permitido a los investigadores hacer una compilación de bacterias ruminales las cuales pueden degradar, utilizar y utilizar-degradar hemicelulosa.

Gracdel, (1972), Dehority (1998) y Osborne (1989), obtuvieron valores significativos para la degradación de pectina en experimentos realizados utilizando *Fibrobacter succinogenes*, *Provetella ruminicola* y *Lachnospira multiparus* empleando todas las combinaciones posibles, como se observa en la Tabla 4, en comparación con la degradación utilizando los microorganismos solos.

Tabla 4. Degradación de Pectina por diferentes especies de microorganismos ruminales solos y en combinación

<b>Microorganismos</b>	<b>Porcentaje de degradación de Pectina en el forraje (%)</b>
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	68,5
<i>Provetella ruminicola</i>	54,9
<i>Lachnospira multiparus</i>	18,9
<i>Fibrobacter succinogenes</i> + <i>Provetella ruminicola</i>	83,9
<i>Fibrobacter succinogenes</i> + <i>Lachnospira multiparus</i>	78,3
<i>Provetella ruminicola</i> + <i>Lachnospira multiparus</i>	56,6

Fuente: Osborne, 1989

En sus ensayos los investigadores encuentran que *Lachnospira multiparus* es un microorganismo pectinolítico que degrada y utiliza apreciables cantidades de pectina purificada, pero muestra limitaciones en su actividad a partir de forrajes intactos. Estos resultados les permiten sugerir, la posibilidad de que existan diferencias químicas o estructurales entre la pectina purificada y la pectina a partir de forrajes intactos, lo que hace suponer que los microorganismos celulolíticos (*Fibrobacter succinogenes*) y hemicelulolíticos (*Provetella ruminicola*) utilizados en el experimento, que también degradan cantidades relativamente grandes de pectina, remueven barreras inaccesibles para la especie pectinolítica que permiten una mayor eficiencia de ésta en su actividad sobre la pectina de forraje intactos incrementando la degradación y confirmando el efecto de sinergismo .

Los resultados de las interacciones realizadas, con microorganismos ruminales en co-cultivo, “*in vitro*”, mostrados en las Tablas 2 ,3 y 4 revelan que la degradación de los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina), se ven aumentadas, con el uso de las combinaciones microbianas, mejorando lo que se observa con el uso de los microorganismos solos.

Dentro del grupo de las bacterias existen especies predominantes dependiendo básicamente de la dieta del animal<sup>54</sup>. En animales alimentados con forrajes de baja calidad es decir ricos en fibras, propios de nuestras zonas tropicales Colombianas, los microorganismos celulolíticos: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, son las especies más abundantes.

De los anteriores las bacterias degradadoras de fibra del tipo *Butyrivibrio fibrisolvens* son las únicas productoras de ácidos acético y butírico, ambos productos finales de la fermentación microbiana y, esencial para el rumiante.

---

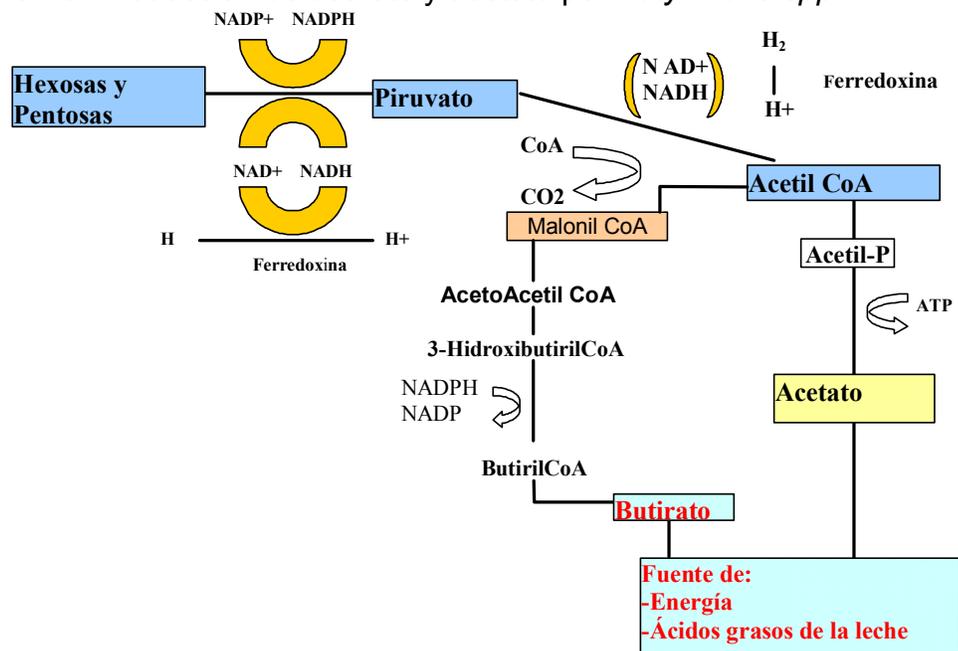
<sup>54</sup> Van Soest, 1.982

*Butyrivibrio fibrisolvens*: Es un microorganismo Gram-negativo, anoxigénico estricto que se encuentra en gran cantidad en los rumiantes. Puede ser aislado a partir de diluciones de contenido ruminal proporcionándole los requerimientos necesarios para su desarrollo<sup>55</sup>.

Este microorganismo es de gran importancia en el ecosistema ruminal porque degrada una amplia variedad de sustratos: Celulosa, Hemicelulosa, Xilano, y proteína; fermenta Glucosa, Fructosa, Celubiosa, Maltosa y otros, produciendo butirato y acetato, compuestos importantes para el rumiante como fuente de energía y para la síntesis de la grasa de la leche<sup>56</sup>.

La ruta seguida por *Butyrivibrio* spp. para la degradación de carbohidratos a Butirato y Acetato se muestra en la Figura 15.

Figura 15. Producción de butirato y acetato por *Butyrivibrio* spp



Fuente: Autor.

<sup>55</sup> Hespell, 1987; Hespell, 1990; Bergy's, 1994; Cotta, 1995.

<sup>56</sup> Hespell, 1987; Marouner, 1994; Cotta, 1995).

*Butyrivibrio fibrisolvens* es un microorganismo de una gran diversidad metabólica; el interés del presente trabajo de investigación relacionado con esta cepa, radica en el hecho de que existe escasa información acerca de resultados obtenidos de los efectos en co-cultivos con microorganismos ruminales y del estiércol en la conversión de forrajes intactos hacia la obtención de ácido acético y butírico. Esto se debe posiblemente a que este microorganismo es considerado un celulolítico secundario, y las investigaciones se centran en otros como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococos albus* y *Ruminococcus flavefasciens* que son considerados celulolíticos primarios, de los cuales si existe mucha información y se siguen investigando.

La fermentación ruminal vista desde el punto de vista de interacciones microbianas presenta una alternativa viable hacia el establecimiento de estrategias que permitan el mejoramiento en la conversión y utilización del forraje de bajo valor nutricional.

Aunque los procesos fermentativos llevados a cabo en el ecosistema ruminal son variados y muy complejos, el desarrollo de investigaciones encaminadas hacia la manipulación de la actividad microbiana para lograr un mejoramiento de la fermentación ruminal, (manipulación de la fermentación ruminal), es tema de continuas investigaciones con el ánimo de lograr un mayor aprovechamiento de la dieta consumida por el animal.

Los estudios realizados sobre interacciones microbianas han permitido un mejor entendimiento sobre los procesos fermentativos ruminales conducentes a mejorar la degradación de material fibroso especialmente.

El efecto sinérgico postulado por los investigadores, en razón a los resultados observados en sus experimentos y mostrados en las Tablas 2, 3 y 4, hace referencia a la combinación de las capacidades metabólicas de las diferentes

especies microbianas ruminales para degradar un determinado sustrato que permitan una mayor disponibilidad o faciliten la accesibilidad a otras especies, para obtener una mayor actividad en conjunto.

La velocidad en la cual los carbohidratos estructurales son fermentados en el rumen depende de la facilidad para penetrar la compleja naturaleza química existente en el material fibroso formado por celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Algunas especies tienen las enzimas necesarias para la degradación de un determinado sustrato pero carecen de las enzimas para utilizar los productos finales de la degradación como fuente de energía que si poseen otras especies que a su vez no tiene las enzimas para degradarlo; otros microorganismos también expresan varias actividades simultáneamente, (ej, pueden ser celulolíticos y pectinolíticos) y su actividad puede variar dependiendo de la fuente de alimento; estas combinaciones en las actividades metabólicas de unas especies con otras ofrecen un efecto aditivo en la misma fermentación debido a que permiten la remoción de componentes que limitan a las otras especies para un mayor aprovechamiento de los componentes de la pared celular vegetal.

El efecto positivo también es visto en combinaciones de especies microbianas ruminales con otras no ruminales en las cuales se ha favorecido la fermentación del sustrato, particularmente de los polisacáridos complejos que forman la pared vegetal; la razón posible parece ser que las especies no ruminales producen factores de crecimiento necesarios para las bacterias celulolíticas que permiten un aumento en el número de éstas y por ende en la actividad; o a la producción de cantidades importantes de enzimas involucradas en estos procesos fermentativos que facilitan la disponibilidad del sustrato a las especies celulolíticas.

El sinergismo entre las actividades de las poblaciones microbianas parece ser una acción evidente en el ecosistema ruminal. El mejoramiento en la degradación del material fibroso a partir de forrajes intactos ha sido demostrado y resulta de la

habilidad de algunos microorganismos ruminales y no ruminales para facilitar la disponibilidad de los sustratos a otras especies del ecosistema ruminal. En este sentido es objetivo primario de la presente investigación el poder establecer que poblaciones existentes en el rumen, en el estiércol y no ruminales, pueden posiblemente potenciar la actividad de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* en la conversión de forrajes intactos.

El estudio de los efectos en co-cultivo de microorganismos celulolíticos del género *Butyrivibrio* con otros microorganismos sobre la producción de los ácidos acético y butírico a partir de forrajes intactos resulta interesante para contribuir al conocimiento de interdependencias importantes que permitan estimular la actividad de la bacteria sobre el sustrato hacia productos útiles para el rumiante que resulten en un mayor aprovechamiento de la dieta a base de forrajes de baja calidad existentes en nuestros trópicos.

Los trabajos de investigación revisados en la literatura consultada han mostrado resultados de efectos sinérgicos hallados en estudios sobre degradabilidad y utilización de sustratos fibrosos efectuados por bacterias ruminales celulolíticas, hemicelulolíticas y pectinolíticas con otras especies ruminales y no ruminales, en co-cultivo; pero no se reportan investigaciones sobre la interacción de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* con cepas ruminales, del estiércol y no ruminales, en la conversión de forrajes intactos para producir los ácidos acético y butírico que son utilizados eficientemente en la síntesis de energía para los rumiantes y de la grasa corporal y de la leche.

Dentro de las bacterias degradadoras de fibra las del tipo *Butyrivibrio fibrisolvens*, son las únicas productoras de éstos ácidos, pudiendose evaluar dos productos finales de la fermentación microbiana muy importantes para el animal y producidos por un mismo microorganismo.

Las investigaciones sobre posibles efectos sinérgicos entre los microorganismos productores de los ácidos grasos volátiles (AGV) con otras especies actuando sobre forrajes intactos y que incrementen la producción de éstos, especialmente del ácido acético que es predominante cuando los animales son alimentados con forrajes ricos en fibra, representa un gran potencial que se traduce en un incremento de la energía disponible para el rumiante y en precursores para la síntesis de la grasa corporal y de la leche.

### 3. LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

#### 3.1 GENERALIDADES

**3.1.1 Definición.** Con el nombre de Probiótico se designan a los microorganismos y/o a sus productos que al ser ingeridos en determinadas cantidades ejercen beneficio en la salud tanto en el hombre como en animales, que van más allá de la nutrición básica inherente<sup>57</sup>.

El conocimiento de los efectos benéficos de la microbiota intestinal se inició en 1908 con los trabajos de Ellie Metchnikoff quien sugirió por primera vez que los *Lactobacillus* podían contrarrestar los efectos putrefactivos propios del metabolismo intestinal. Posteriormente en 1960 el microbiólogo Oregon usó por primera vez el término "Probiótico" con significado de "Para la vida".

Más tarde, en 1988 Fuller y Cole definieron Probióticos como "Suplemento microbiano vivo de alimentos que afecta positivamente el animal hospedante mejorando su equilibrio intestinal"<sup>58</sup>.

Los probióticos son microorganismos no parásitos que viven en verdadera simbiosis tanto en el hombre como en los animales. Estos microorganismos realizan diferentes funciones, unos ayudan a mantener la buena salud denominándose por esta razón protectores y otros intervienen en la recuperación de algunos trastornos, conocidos entonces como terapéuticos<sup>59</sup>.

---

<sup>57</sup> León, 1996; Cathy, 1997

<sup>58</sup> Fuller, 1989; European Commission Directives, 1996.

<sup>59</sup> Fuller, 1989; Cichoke, 1944; Leon, 1996; Tannock, 1999.

**3.1.2 Efectos de los probióticos.** Según los trabajos de Fuller (1989), León (1996) y Tannock (1999), el uso de probióticos se ha ido incrementando día a día tanto en humanos como en animales.

En forma general se puede decir que dentro de los efectos benéficos que los Probióticos producen, se tiene:

- Mejoramiento de la digestibilidad intestinal y de la asimilación ayudando a digerir proteínas, grasas y lactosa contenidas en productos lácteos, reduciendo la intolerancia a éstas para obtener así, una mayor absorción de los nutrientes.
- Asimilación del Calcio y del Hierro, importantes en los diferentes procesos metabólicos.
- Inhibición del metabolismo y del crecimiento de los microorganismos que producen enfermedades, mediante la producción de antibióticos naturales.
- Síntesis de vitaminas como las del complejo B, (ácido fólico y biotina), y K.

**3.1.3 Criterios de selección de los microorganismos como probióticos.** Los microorganismos candidatos a ser Probióticos son aislados de organismos sanos, generalmente del tracto intestinal y urogenital de personas y animales. Estos microbios generalmente se desarrollan mejor a un pH ácido y son resistentes a la bilis; unos son anoxigénicos estrictos y otros anoxigénicos facultativos<sup>60</sup>.

Un probiótico ideal es aquel posee las siguientes características<sup>61</sup>:

- Ausencia de toxicidad que les impide ser nocivos y/o causar enfermedades.
- Capacidad de colonizar el tracto digestivo.
- Desdoblamiento de los alimentos para que sean mejor absorbidos.
- Capacidad de resistir la acción de los ácidos y de la bilis implicada en los procesos digestivos del estómago tanto en los humanos como en los animales.

---

<sup>60</sup> Fuller, 1989

<sup>61</sup> Fuller, 1989; León, 1996; Cathy, 1997; Babra 1997

- Buenos fermentadores.
- Capacidad de inhibición de los microorganismos potencialmente patógenos mediante la producción de sustancias antagónicas.
- Reproducción sencilla y rápida.
- Tolerancia a las condiciones ambientales de trabajo.

Los microorganismos seleccionados como Probióticos generalmente comprenden a bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.

### **3.2 PROBIÓTICOS EN RUMIANTES**

El uso de Probióticos en rumiantes surge como una alternativa para mejorar la nutrición y el estado de salud animal.

Durante muchos años los expertos en nutrición animal y los microbiólogos han estado interesados en la manipulación del ecosistema ruminal para mejorar la eficiencia en la utilización del alimento y la disminución de las enfermedades gastrointestinales y es así como se empezó a evaluar el efecto de la administración directa de microorganismos. (DFM = direct-feed-microbials), sobre la fermentación y la salud del rumiante.

Fuller en 1989, define el término Probiótico refiriéndose a bacterias lácticas debido a que ellas proporcionaban beneficios al organismo hospedante. Miles *et al*, (1991) y Yoon (1995), extienden el término, a otras bacterias, a hongos no filamentosos tipo Levaduras y a Mohos.

A partir de ese momento el interés en Probióticos o microorganismos para suministro directo en la alimentación de rumiantes, especialmente vacuno ha ido en aumento.

De manera general, el uso de probióticos en animales rumiantes, ha mostrado los siguientes efectos positivos, aunque los modos de acción no son claros aún<sup>62</sup>:

- Producción y liberación de enzimas las cuales pueden ayudar a la digestión.
- Mayor efectividad en la conversión de alimentos y prevención contra infecciones gastrointestinales.
- Aumento en la ingestión del alimento tanto en ganado lechero como de carne.
- Mejoramiento en la fermentación ruminal y la degradación de la fibra.
- Aumento en la producción de leche y ganancia en peso.
- Efectos positivos sobre el pH ruminal.
- Favorecimiento de la producción de ácidos grasos volátiles.
- Disminución de la producción de metano.

Dentro de las diferentes clases de microorganismos algunas especies de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y el hongo *Aspergillus oryzae* han mostrado un alto potencial probiótico<sup>63</sup>.

En la actualidad existen varias clases de Probióticos en uso:

**-Probióticos a base de Lactobacilli:** Estos microorganismos han sido empleados para restablecer el equilibrio de las bacterias lácticas naturales en animales, después de tratamiento con antibióticos. También son útiles durante el destete, época en que los animales son más susceptibles a las enfermedades gastrointestinales como la diarrea.

Investigaciones realizadas por Fumiaki (1995), sobre la ingestión vía oral de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Enterococcus faecium*) y

---

<sup>62</sup> Fumiaki *et al*, 1995; Babra, 1997; Alm, 2000.

<sup>63</sup> Wiedmeier, 1987; Wohlt *et al*, 1991; Fumiaki, 1995; Cruywagen, 1996

bifidobacterium, (*Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium pseudolongum*), como probióticos, en terneros de pocos días de nacidos, mostraron condiciones favorables de salud previniendo infecciones gastrointestinales y disminución de las diarreas en comparación con los terneros de control. Se sugiere que usados a temprana edad, los probióticos pueden tener un efecto colonizador en el intestino multiplicándose rápidamente e inhibiendo la colonización de los patógenos. También observaron otros efectos como mejoramiento en la conversión del alimento y ganancia en peso.

Cruywagen y colaboradores (1996), evaluaron el efecto de *Lactobacillus acidophilus* como suplemento en la leche para terneros de dos días de nacidos; no hubo mejoramiento en la ganancia en peso, pero si mayor resistencia a diarreas. Como consecuencia, los autores recomendaron el uso de este probiótico durante las dos primeras semanas de vida del animal. Otros investigadores han reportado similares resultados acerca de los efectos benéficos que proporciona el uso de este probiótico a temprana edad del ternero<sup>64</sup>.

Ozawa *et al*, (1983), reportaron que la administración oral de *Streptococcus faecalis* a terneros promueve la colonización de bacterias benéficas y disminuye la presencia y colonización de bacterias perjudiciales como *Salmonella* spp, en el intestino. Otro microbio usado como probiótico para el mismo fin ha sido *Bacillus subtilis*<sup>65</sup>.

**-Probióticos a base de Levaduras:** Las Levaduras son importantes por su poder fermentador, producción de ácido láctico y por su riqueza en vitaminas del grupo B.

---

<sup>64</sup> Bechman, 1977; Gilliland, 1980; Higginbotham, 1993.

<sup>65</sup> Jenny, 1991)

La levadura *Sacharomyces cerevisiae* usada como probióticos sola ó en combinación con otros microorganismos produce un impacto significativo en el funcionamiento ruminal.

Los estudios realizados por Ruf (1953) y Phillips (1985), muestran que los efectos benéficos producidos por *Saccharomyces cerevisiae* incluyen incremento en la toma del alimento. Hoyos (1987), Piva (1993) y Erasmus *et al*, (1992) reportaron un mejoramiento en la producción y el contenido de grasa en la leche. Fallon (1987) y Wallace (1993), obtuvieron ganancias de peso de los animales suplementados con esta levadura en comparación con los lotes de control.

Wiedmeier (1987), Harrison (1988), Dawson (1990) y Callaway (1997), observaron un aumento en el número total de microorganismos y especialmente en la presencia de las bacterias celulolíticas. Incremento en la producción de ácidos grasos volátiles y mejoramiento de la digestión, son otros de los efectos positivos encontrados en los trabajos de Arambel (1987), Wiedmeier (1987) y Doreau (1998).

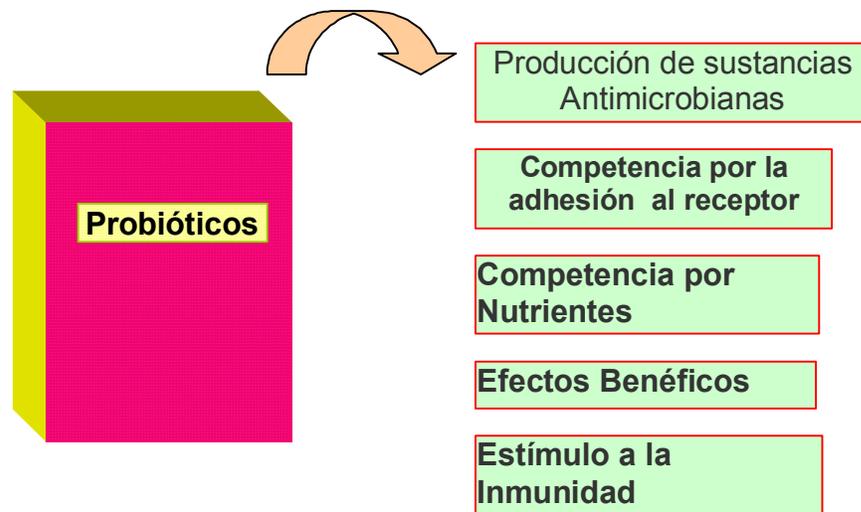
**-Probióticos a base de *Aspergillus oryzae*:** La adición de este hongo en la dietas de rumiantes ha producido varios efectos positivos:

En las investigaciones realizadas por Wiedmeier (1987), Fondevila *et al* (1990) y Gómez (1990), se observó un mejoramiento en la digestibilidad de la fibra y aumento en la producción de ácidos grasos volátiles. Aumento en el número de bacterias celulolíticas y bacterias utilizadoras de lactato, son también efectos publicados por Beharka (1998) y Varel *et al*, (1993).

También se usan mezclas de *Aspergillus oryzae*, y *Saccharomyces cerevisiae*, para aumentar aún más los beneficios descritos anteriormente.

**3.2.1 ¿Cómo actúan los probióticos?** Según León (1996), Babra (1997) y Pérez (1998), los microorganismos benéficos viven en verdadera simbiosis con el organismo hospedante. Aunque su modo de acción es incierto y particular en cada caso debido a las características de cada animal, (efectos endógenos) y a su entorno, (efectos exógenos), se cree que pueden actuar de las siguientes maneras:

Figura 16. Actividad de los Probióticos



Fuente: Autor.

➤ **Producción de Sustancias Antimicrobianas.** Dentro de este grupo se tienen los ácidos orgánicos que disminuyen el pH proporcionando un ambiente poco propicio para el crecimiento y desarrollo de patógenos. Como ejemplo se puede citar el caso de las Bifidobacterias que producen ácido Acético, Láctico y pocas cantidades de ácido Fórmico a partir del catabolismo de los carbohidratos. El acetato y el lactato destruyen microorganismos como *Salmonella* spp, *Candida* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringes*, productores de toxinas y variados problemas entéricos.

Las bacterias ácido lácticas han mostrado que confieren protección contra la colitis e inhibición de toxinas<sup>66</sup>.

➤ **Competencia por la adhesión al receptor.** Algunos patógenos procedentes del alimento o del agua son capaces de adherirse a las paredes del intestino y colonizarlas produciendo enfermedades. El uso de antibióticos provoca la muerte de buena parte de la microbiota intestinal ruminal dejando vía libre para que los patógenos resistentes se instalen y proliferen en los espacios antes ocupados por los microbios habitantes naturales del intestino.

En período de estrés se produce un aumento de adrenalina y corticosteroides, lo que daña el equilibrio intestinal ejerciendo un efecto debilitante sobre la salud del animal, haciéndolo vulnerable a cualquier infección y permitiendo el ingreso de microorganismos invasores, problema que se puede solucionar mediante el suministro de probióticos.

Los probióticos tienen la habilidad de adherirse a la pared epitelial, ocupando "nichos ecológicos" y actuando como una barrera defensiva ante la colonización de patógenos. Es de anotar que los probióticos tienen la particularidad de multiplicarse rápidamente igual que ocurre con los patógenos y esto es muy importante pues después del uso de antibióticos o de cualquier otro elemento extraño o tratamiento, el intestino queda prácticamente libre de microorganismos y es necesaria la colonización probiótica antes de que lo hagan los microbios patógenos<sup>67</sup>.

➤ **Competencia por Nutrientes.** El intestino es un rico reservorio de nutrientes, sin embargo los microorganismos compiten por determinadas sustancias que favorecen su crecimiento y desarrollo.

---

<sup>66</sup> Cruywagen, 1996

<sup>67</sup> Babra, 1997; Pérez, 1998; Zeynep, 1998.

Debido a la gran cantidad de alimento que pasa a través del aparato digestivo ruminal, muchos microbios se adhieren al alimento y no se pueden unir a las paredes del intestino perdiéndose por consiguiente en las heces. Los probióticos que se multiplican rápidamente, aportan las condiciones necesarias para la recuperación de los microorganismos salientes y permiten su recolonización mediante adherencia produciendo compuestos que faciliten su encapsulamiento.

➤ **Efectos Benéficos.** Los Probióticos producen un amplio rango de beneficios que mejoran la producción animal, armonizando y aumentando la digestibilidad del alimento, permitiendo ganancia en peso y resistencia a patógenos.

Los probióticos que no son residentes, es decir, que no colonizan el tracto digestivo, pasan a través de él para producir una serie de efectos benéficos que sobresalen especialmente en épocas de enfermedad, diarrea o cuando hay cambio de dieta, permitiendo una reconstitución rápida.

Como ejemplos se pueden mencionar a *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que promueven el crecimiento de bacterias residentes como *Lactobacillus acidophilus*. Este microbio desdobla lactosa para producir ácido láctico; es considerado como probiótico porque produce peróxido de hidrógeno inhibidor de microbios indeseables, igualmente ayuda a evitar desórdenes intestinales tipo constipación y flatulencia<sup>68</sup>.

Otro ejemplo de efectos benéficos lo proporcionan las denominadas Bifidobacterias que sintetizan vitaminas implicadas en importantes funciones metabólicas y que se absorben lentamente tales como las vitaminas B6 y K, Tiamina, Riboflavina; También puede sintetizar aminoácidos.

---

<sup>68</sup> Willians, 1996; Babra, 1997.

El uso de cultivos de levaduras del género *Saccharomyces* spp, en la dieta de rumiantes mejora la digestibilidad de la fibra aumentando el consumo y aprovechamiento de grandes cantidades de residuos de cosechas de pobre calidad nutricional y ricos en Lignocelulosa. Estos datos permiten un ahorro en pesos y en alimentación animal<sup>69</sup>.

Por su parte *Aspergillus oryzae* es un hongo filamentoso, que ha mostrado como efectos positivos en rumiantes el mejoramiento de la degradabilidad de la fibra, incremento en la producción de leche, estimulación del crecimiento de algunas bacterias degradadoras de fibra y utilizadoras de lactato y aumento en la producción de ácidos grasos volátiles<sup>70</sup>.

➤ **Estímulo a la inmunidad.** Los probióticos aumentan las defensas naturales ayudando a combatir las agresiones provocadas por los patógenos<sup>71</sup>.

Estudios recientes han encontrado que *Lactobacillus* administrado por vía oral estimula la actividad macrófaga, contra diferentes especies de bacterias, tal es el caso de *Lactobacillus casei* que estimula los mecanismos de producción de Gamaglobulinas del tipo A.

### **3.3 ESTADO ACTUAL SOBRE LA INVESTIGACIÓN DE PROBIÓTICOS EN RUMIANTES**

Aunque el conocimiento de los probióticos es de tiempos remotos sólo hasta finales del Siglo XX se han venido desarrollando tecnologías apropiadas para

---

<sup>69</sup> Wiedmeier, 1987; Wohlt *et al*, 1991; Doreau, 1998.

<sup>70</sup> Wiedmeier, 1987; Beharka, 1991; Beharka, 1998

<sup>71</sup>(Fumiaki, 1995; Cruywagen, 1996.

determinar su importancia dentro de los componentes de la microbiota intestinal del hombre y de los animales<sup>72</sup>.

Los resultados de las investigaciones han demostrado que la suplementación con Probióticos mejora considerablemente la salud animal proporcionando un rápido crecimiento y aumento en la producción. Actualmente existen probióticos para diferentes clases de animales, tales como aves, peces, pollos, rumiantes, etc<sup>73</sup>.

El uso de Probióticos constituye una alternativa viable a muy bajo costo para el mejoramiento de la fermentación ruminal y la productividad animal. Estos microorganismos controlan en forma natural a los microbios propios del organismo implicados en los procesos digestivos y como se trata de microorganismos habitantes normales del rumiante no poseen ninguna contraindicación ni efecto colateral.

El origen de implementar el uso de microorganismos a la alimentación ruminal (probióticos) se debe al gran potencial que ciertas cepas han mostrado al incrementar la ganancia en peso, la producción de leche, la degradabilidad de material fibroso, al mejorar en forma notable los desordenes gastrointestinales, mayor resistencias a las enfermedades, entre otros; sin embargo los modos de acción no son claros.

Es importante anotar que aunque existen en el mercado internacional "Probióticos" destinados a estimular la producción animal, especialmente en rumiantes, estos productos han sido elaborados para condiciones diferentes de alimentación, clima, regiones y razas, que no se ajustan a las condiciones propias de nuestros medios.

---

<sup>72</sup> Fuller, 1989; European Comission Directives, 1996; Tannock, 1999

<sup>73</sup> Fuller, 1989; Homer, 1993; Babra, 1997; Perez, 1998; Linn, 1993; Tannock, 1999; Trudy *et al*, 1999; Alm, 2000.

En la actualidad existen diversos grupos de investigación a nivel Nacional e Internacional dirigidos hacia las áreas de microbiología ruminal, Probióticos, función ruminal, nutrición de rumiantes, fermentación ruminal, etc, encaminados a lograr una mayor y mejor utilización de los alimentos para rumiantes.

Grupos Australianos, Ingleses, Americanos, entre otros, trabajan con el objetivo de obtener un probiótico para utilizarlo efectivamente sobre sustratos fibrosos. En Colombia se investiga al respecto en Corpoica (Bogotá) y en la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá y Medellín).

### **3.4 CONSIDERACIONES PARA EL PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

Para el planteamiento de la Hipótesis de trabajo se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

-Los microorganismos ruminales son el factor clave en el metabolismo del nitrógeno y de los carbohidratos en los rumiantes; es la capacidad y la actividad de la población microbiana existente la que da al animal la energía y los compuestos necesarios para su mantenimiento, crecimiento y producción.

-Las bacterias y los hongos celulolíticos son los microorganismos de mayor importancia en la utilización y degradación de pastos y forrajes de mala calidad proporcionando al rumiante la principal fuente de energía a través de la producción de los ácidos acético y butírico. A pesar de la gran capacidad que poseen los hongos ruminales para degradar los componentes estructurales de las paredes de las plantas, el mayor porcentaje de esta degradación es aún asignada al grupo bacteriano debido a que se encuentran en mayor cantidad y poseen una gran diversidad metabólica que les permiten estar más activamente implicada en el proceso fermentativo.

-La fermentación ruminal observada desde el punto de vista de interacciones microbianas se considera presenta una alternativa viable hacia el establecimiento de estrategias que permitan un mejoramiento en la conversión y utilización del forraje de bajo valor nutricional. El sinergismo encontrado entre las actividades de las poblaciones microbianas parece ser una acción evidente en el ecosistema ruminal. El mejoramiento en la degradación del material fibroso a partir de forrajes intactos ha sido demostrado y resulta de la habilidad de algunos microorganismos ruminales para facilitar la disponibilidad de los sustratos a otras especies del ecosistema ruminal.

-El efecto positivo también es visto en combinaciones de especies microbianas ruminales con otras no ruminales (básicamente hongos) en las cuales se ha favorecido la fermentación del sustrato, particularmente de los polisacáridos complejos que forman la pared vegetal; la razón posible parece ser que las especies no ruminales producen factores de crecimiento necesarios para las bacterias celulolíticas que permiten un aumento en el número de éstas y por ende en la actividad; o a la producción de cantidades importantes de enzimas involucradas en estos procesos fermentativos que facilitan la disponibilidad del sustrato a las especies celulolíticas.

-La fermentación ruminal observada desde el punto de vista de interacciones microbianas se considera representa una alternativa viable hacia el establecimiento de estrategias que permitan la optimización y utilización del forraje por parte del rumiante.

-Los trabajos de investigación revisados en la literatura consultada han mostrado resultados de efectos sinérgicos hallados en estudios sobre degradabilidad y utilización de sustratos fibrosos efectuados por bacterias ruminales celulolíticas, hemicelulolíticas y pectinolíticas con otras especies ruminales y no ruminales, en

co-cultivo; pero no se reportan investigaciones sobre la interacción de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* con cepas ruminales, del estiércol y no ruminales, en la conversión de forrajes intactos para producir los ácidos acético y butírico que son utilizados eficientemente en la síntesis de energía para los rumiantes y de la grasa corporal y de la leche. Dentro de las bacterias degradadoras de fibra las del tipo *Butyrivibrio fibrisolvens*, son las únicas productoras de éstos ácidos, pudiéndose evaluar dos productos finales de la fermentación microbiana muy importantes para el animal y producidos por un mismo microorganismo.

-Las investigaciones sobre posibles efectos sinérgicos entre los microorganismos productores de los ácidos grasos volátiles (AGV) con otras especies actuando sobre forrajes intactos y que incrementen la producción de éstos, especialmente del ácido acético que es predominante cuando los animales son alimentados con forrajes ricos en fibra, representa un gran potencial que se traduce en un incremento tanto de la energía disponible para el animal, como de compuestos orgánicos responsables de la síntesis lipídica corporal y de la leche.

-Aunque los resultados sinérgicos obtenidos sobre interacciones han sido observados en experimentos "*In vitro*" y es posible que las interacciones "*In vivo*" sean más complejas, probablemente se puede concluir que la degradación y conversión de los componentes de la dieta son el resultado neto de las interacciones entre las diferentes poblaciones microbianas ruminales. Los resultados sobre los sinergismos encontrados "*in vitro*" han permitido comprobar el papel esencial de los microorganismos en la nutrición animal proporcionando un potencial para mejorar la productividad via alterando el número o la actividad de una clase específica de microorganismos (Probióticos) y contribuyendo a un mejor entendimiento de la ecología microbiana ruminal. Con el conociendo de las transformaciones microbiológicas que ocurren en el rumen se ha explicado mucho acerca de la naturaleza de la fermentación ruminal de ahí la importancia de realizar estudios de investigación en este campo.

-Las investigaciones en el campo de los Probióticos para rumiantes (administración via oral de microorganismos) surge como una posible alternativa viable y a bajo costo para el mejoramiento en la conversión del alimento que permite un mayor aprovechamiento del mismo y un aumento en la producción bovina. Dentro de los efectos benéficos, los microorganismos usados como Probióticos en rumiantes han mostrado respuestas positivas en la producción de leche, aumento de peso, mejoramiento en el balance gastrointestinal, entre otros. Los Probióticos para rumiantes que se ofrecen en el mercado internacional no se ajustan a las razas ni a las condiciones de nuestros suelos tropicales, por lo que se hace necesaria la investigación sobre nuevas cepas autóctonas con potencial.

-La manipulación de la fermentación ruminal para la optimización de la productividad animal ha sido un tema de interés para los nutricionistas y microbiólogos ruminales con el ánimo de mejorar la eficiencia en la conversión de la dieta en productos consumibles para el rumiante. La utilización de los microorganismos para aumentar poblaciones existentes o incrementar actividades de las especies nativas ofrece un enorme potencial y ha demostrado ser positiva siempre y cuando sean establecidas las condiciones necesarias y en cantidad apropiada para que estas cepas provean el beneficio a la bacteria de interés dentro del ecosistema ruminal. Los factores que gobiernan la supervivencia de nuevas cepas "*In vivo*", especialmente no ruminales, son desconocidas y los intentos de selección de nuevos microorganismos han sido difíciles, sin embargo el uso de microorganismos no ruminales, puede ser provechoso, al menos en términos de cortos tiempos. En este sentido se han encontrado limitantes a los intentos de la manipulación en la fermentación ruminal para optimizar la productividad animal, por lo que se requiere más investigaciones para obtener un conocimiento profundo sobre la actividad de los microorganismos y su interacción con las demás especies y con el rumiante.

La investigación desarrollada trata de encontrar cepas nativas del rumen y del estiércol que no tengan el limitante encontrado con el uso de las cepas no ruminales y que por sus características y adaptación al ecosistema normal no sean afectadas drásticamente y si pueden servir para mejorar en el futuro la productividad ganadera en el trópico.

**3.4.1 Hipótesis.** Diferentes especies microbianas del ecosistema ruminal por su capacidad fermentativa, preferencia por determinados sustratos y productos finales de fermentación, están involucradas tanto directa como indirectamente en la utilización y conversión del forraje.

La interacción en co-cultivo sobre forrajes intactos de baja calidad, del microorganismo celulolítico *Butyrivibrio fibrisolvens*, productor de los ácidos acético y butírico, con otros microorganismos ruminales y del estiércol tales como: bacilos, cocos y levaduras y con el hongo no ruminal *Aspergillus oryzae*, permite encontrar la interdependencia (especie microbiana) que en conjunto con la bacteria celulolítica actúen sobre la degradación de forrajes intactos generando un incremento en la producción de los ácidos en comparación con la producción de los mismos cuando actúan los microorganismos solos, hallándose un efecto sinérgico.

La especie microbiana que contribuya al efecto será sugerida como un candidato a probiótico para rumiantes.

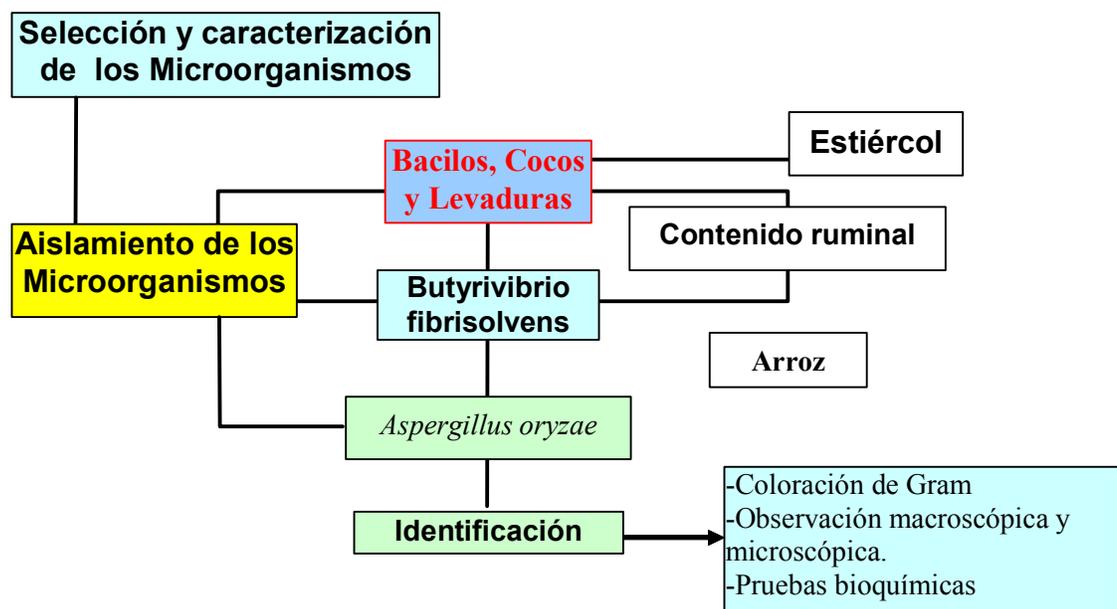
## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 METODOLOGÍA

La investigación realizada comprendió las siguientes etapas:

**4.1.1 Etapa I. Selección y caracterización de los microorganismos autóctonos.** Para llevar a cabo la presente investigación se seleccionaron bacilos, cocos y levaduras a partir del contenido ruminal y del estiércol de bovinos de raza Romosinuano propios de la región de Córdoba y alimentados con forrajes y ensilaje de maíz. *Butyrivibrio fibrisolvens* fue aislado del contenido ruminal y *Aspergillus oryzae* de fuentes no ruminales (arroz).

Figura 17. Selección y caracterización de los microbios.



Fuente: Autor.

➤ **Aislamiento de los Microorganismos.**

**-Bacilos, Cocos y Levaduras:** A partir de contenido ruminal y del estiércol se realizó el aislamiento.

**-Contenido Ruminal:** Se extrajo de tres vacunos de raza Romosinuano, con fístula en el rumen; estos animales fueron alimentados con forrajes y ensilajes de maíz propios del Departamento de Córdoba.

**-Sitio de Muestreo:** “Corpoica Turipaná”, Km. 13 sobre la vía Montería-Cereté en el Departamento de Córdoba.

**-Procedimiento del Muestreo:** La toma de las muestras se realizó a diferentes horas: 10 am y 4 pm. Se extrajo el contenido ruminal a través de la fístula y a la muestra colectada se le adicionó una capa de 2 cm de espesor de aceite mineral estéril y se conservó en refrigeración hasta su utilización.

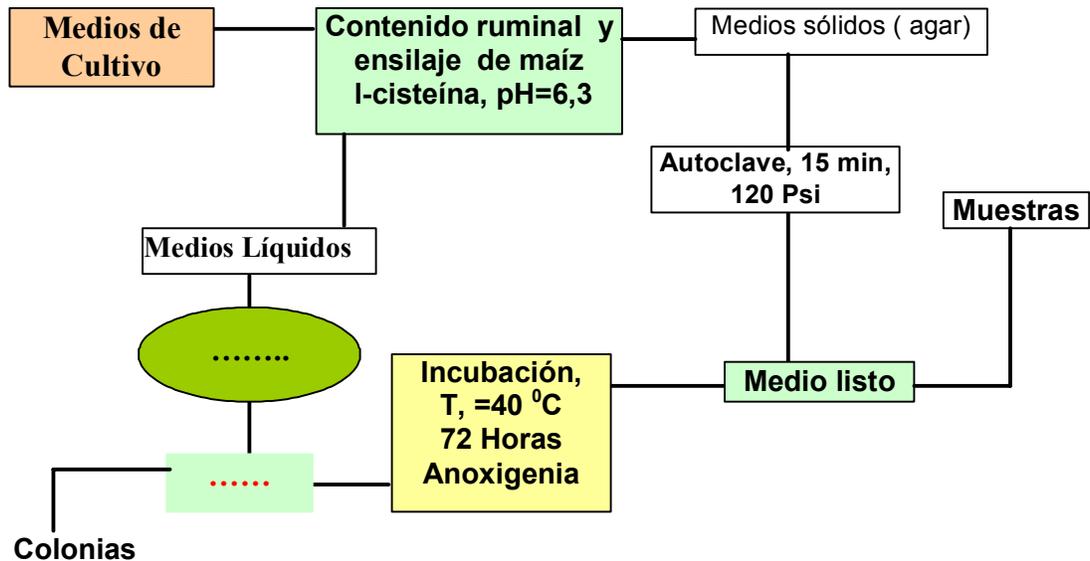
La muestra de estiércol se tomó directamente del animal y se guardó en refrigeración.

**-Medios de cultivo y su preparación.**

**Medio de Cultivo A:** Contenido Ruminal clarificado y ensilaje de maíz.

Se hicieron medios de cultivo sólidos, utilizando contenido ruminal clarificado al 10 %, ensilaje de maíz al 10% (licuado), L-Cisteína al 0,025% y agar para solidificar. El pH se ajustó a un valor de 6,3, con ácido Acético al 10 %. El medio se autoclavó durante 20 minutos a 15 libras de presión y temperatura 121 °C. Terminado éste tiempo se dejó enfriar hasta 45 °C, se sirvió en cajas de Petri y una vez solidificado, se colocó sobre éste una pequeña muestra de contenido ruminal y se incubó durante 72 horas en anoxigenia, a 40 ° C. Las muestras de estiércol también se sembraron en el medio anteriormente descrito y bajo las mismas condiciones.

Figura 18. Preparación de medios de cultivo.



Fuente: Autor

Se hicieron medios líquidos con los mismos componentes a excepción del agar y al inocular la muestra, se agregó aceite estéril para procurar las condiciones ambientales necesarias. Se trabajó a iguales condiciones de tiempo y temperatura. Los microbios aislados en el medio sólido fueron transferidos a los medios líquidos incubando a las condiciones establecidas.

El procedimiento descrito anteriormente se repitió a diferentes concentraciones de contenido ruminal como: 10%, 20%, 30% y 40% y de ensilaje al 5% y 10 %. Los ensayos se hicieron por duplicado.

Se realizó determinación de biomasa por duplicado.

- *Butyrivibrio fibrisolvens*: El Aislamiento del microorganismo se hizo a partir del contenido ruminal clarificado sobre el medio de cultivo sólido, A y luego transferido al medio de cultivo líquido, A descritos anteriormente.

- *Aspergillus oryzae*: Este hongo filamentoso fue extraído de fuentes no ruminales sobre medio de arroz.

**-Medio de cultivo de arroz:** En pequeños frascos de capacidad 70 ml se preparó un medio de cultivo de arroz a partir de 20 g del grano y 40 ml de agua destilada, se llevó al autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Terminado el proceso se dejó enfriar y sobre el medio se inoculó una pequeña cantidad de arroz proveniente de graneros comerciales y se llevó a incubación a temperatura ambiente, 25 °C, durante cinco días. Al finalizar el tiempo se logró el aislamiento del hongo.

➤ **Identificación de los Microorganismos.** Los microbios aislados fueron identificados mediante:

-Caracterización morfológica y observación microscópica con coloración de Gram y directo sin coloración<sup>74</sup>.

-Pruebas bioquímicas de asimilación y de fermentación de carbohidratos y utilización de otros sustratos (medios especiales para el caso de los hongos: Medio Agar Malta, Medio Agar Czapek, Medio OGY, Medio Saboureaud, Medio Glucosa 5 % modificado)<sup>75</sup>.

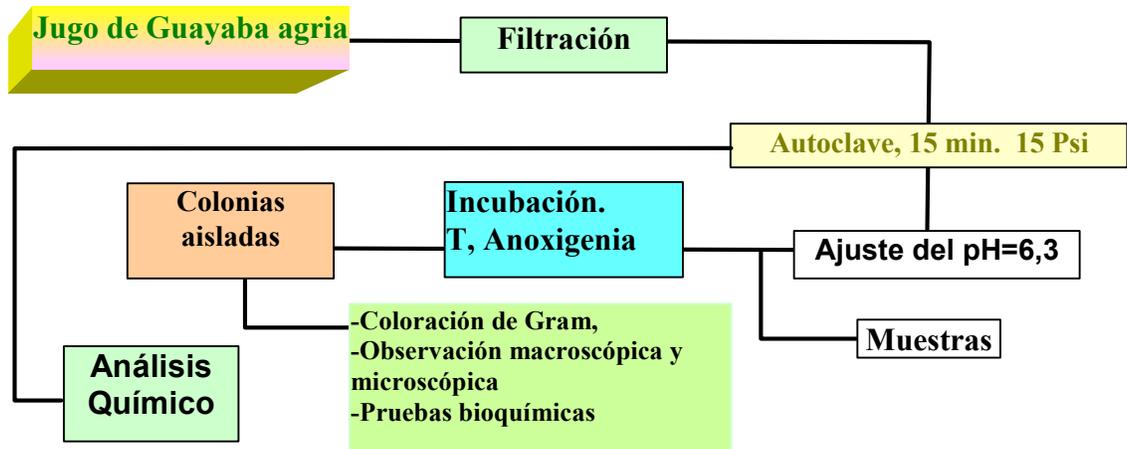
**4.1.2 Etapa II. Adaptación de los Microorganismos aislados a un nuevo medio de cultivo.** Se preparó un nuevo medio de cultivo formulado a partir de productos de cosecha de la región de Córdoba teniendo en cuenta las características nutricionales de la materia prima y las condiciones ambientales individuales para el crecimiento.

---

<sup>74</sup> (Chalela, 1994)

<sup>75</sup> Merck, 1994; Bergey's, 1994

Figura 19. Adaptación al nuevo medio de cultivo: Guayaba agria



Fuente: Autor.

➤ **Medio de cultivo B: Guayaba Agria (*Psidium araca*).** Para la preparación del medio de cultivo, inicialmente se licuó la fruta a una concentración del 5% p/v en agua destilada y luego se filtró para retirar las semillas y el material fibroso y se midió el pH (3,19). El jugo se sirvió en pequeños frascos de capacidad de 70 ml (30 ml de jugo en c/u) y seguidamente se llevó al autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, se dejó enfriar y se midió nuevamente el pH de uno de los frascos y se ajustó al valor de 6,3 con solución de Bicarbonato de Sodio al 10 % p/v.

Una vez adicionado el Bicarbonato de sodio, a cada frasco para alcanzar el pH= 6,3, se procedió a inocular en el nuevo medio, 1 ml de los microbios aislados en el medio líquido A. Además se inocularon muestras de contenido ruminal y del estiércol extraídos directamente del animal; seguidamente se adicionó una capa de 1 cm de espesor de aceite mineral estéril y se agitó fuertemente. Se observó abundante producción de CO<sub>2</sub>. Los frascos fueron incubados a 40 °C durante 72 horas. El anterior procedimiento se repitió a diferentes concentraciones de guayaba tales como: 10%, 15%, 20%,25% y 50% (el ensayo se hizo por triplicado para cada concentración de fruta). También se realizó el procedimiento

empleando la fruta con la fibra pero sin pepas. Se formularon medios sólidos a las diferentes concentraciones de fruta.

Se realizó determinación de biomasa por duplicado y además para la concentración de fruta que mostró mejor resultado también se le determinó conteo en placa de células viables.

A todas las muestras ruminales colectadas directamente del animal y a las muestras aisladas en los diferentes medios A y B se les hizo tinción de Gram, observación macroscópica y microscópica y pruebas bioquímicas (fermentación y asimilación de azúcares).

➤ **Análisis Químico efectuado a la fruta y al jugo:** Inicialmente se realizó un análisis bromatológico a la Guayaba Agria determinando porcentaje de: proteína, grasa, humedad, cenizas y ENN (sustancias no nitrogenadas). (Ensayos por triplicado)<sup>76</sup>.

Luego se determinaron los siguientes parámetros al medio líquido preparado con jugo de la fruta al 25% p/v, después de ser esterilizado:

% de proteína, por el método de Lowry (Bernal, 1994)

% de Azúcares Totales, % de Azúcares invertidos y % de Azúcares Reductores por el método de la Antrona (Bernal, 1994).

Grados Brix, índice de refracción y pH (Bernal, 1994)

Determinación de elementos presentes: Fe, K, Ca, Mg y Na, por Absorción Atómica, en un equipo Perkin Elmer (Perkin Elmer, 1984)

Determinación de los ácidos: acético y butírico, por Cromatografía de Gases, a partir de derivados butil-éster. Método desarrollado, modificado y adaptado. (Salanito, 1975).

---

<sup>76</sup> (Bernal, 1994; García 1995)

➤ **Conteo de Células Viables.** Se hizo conteo de las células viables en el medio del guayaba agria al 25% porque se observó que a esa concentración de fruta se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento y variedad microbiana.

(Ensayos por triplicado)

➤ **Determinación de Biomasa y Comparación de los Medios.** Mediante el uso del equipo Spectronic 20 D y a una longitud de 640 nm se determinó por turbidimetría la cantidad de biomasa presente de cada microorganismo en el medio de guayaba agria, (medio B), luego de las 72 horas de incubación y a las condiciones establecidas (temperatura de 40 °C, pH= 6,3 y anoxigenia). La determinación se llevó a cabo por triplicado.

Se realizó una comparación de la biomasa obtenida en el medio B, ( guayaba agria al 25 % p/v), con la obtenida a partir de un medio tradicional . Para llevar a cabo este paso se elaboró un medio de cultivo tradicional (Medio C) con contenido ruminal clarificado al 40 % enriquecido con fuentes de carbohidratos y otras sustancias químicas tal como lo describe Caldwell, (1966) y que corresponde al Medio I de la Tabla11. (Medio C= Medio I, Tabla11).

El pH se ajustó a 6,3. En éste medio se inoculó 1 ml de cada uno de los microbios aislados en el medio líquido B y se incubó a las condiciones ruminales establecidas durante 72 horas. Se determinó la biomasa como se dijo anteriormente.

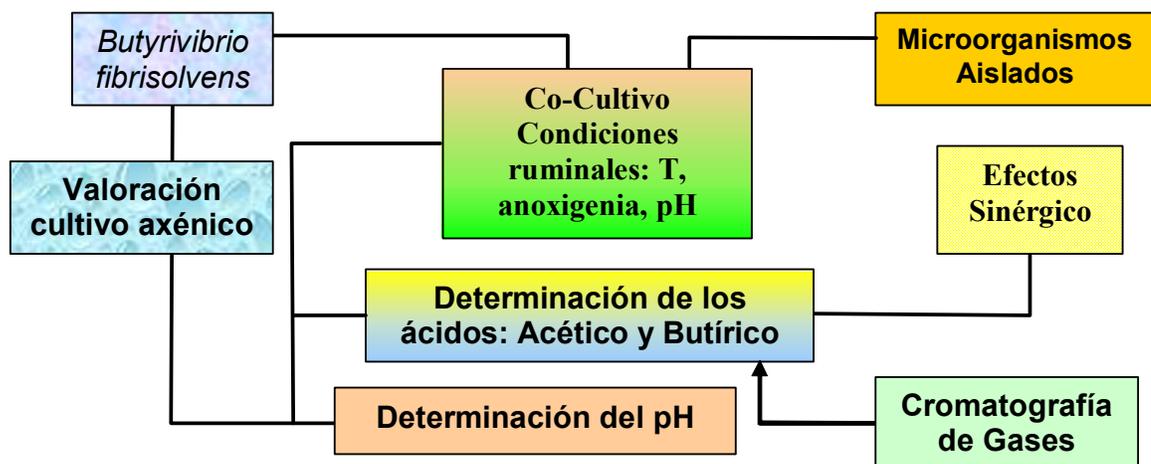
➤ **Análisis Estadístico.** Se llevó a cabo un análisis de Varianza y Regresión Múltiple según el modelo de Durbin-Watson, para comparar la incidencia del medio de guayaba agria y de un medio tradicional modificado, sobre el crecimiento microbiano<sup>77</sup>.

---

<sup>77</sup> Mason, 1989; Moreno,1993

**4.1.3 Etapa III: Interacciones en co-cultivo entre *Butyrivibrio fibrisolvens* y los microorganismos aislados.** En esta etapa se evaluó, “*in vitro*”, la interacción en co-cultivo entre *Butyrivibrio fibrisolvens* y los microorganismos aislados, para determinar que especie o especies son potenciadoras de la actividad de *Butyrivibrio fibrisolvens* sobre el forraje intacto en la producción de los ácidos acético y butírico.

Figura 20. Determinación del Efecto Sinérgico.



Fuente: Autor.

➤ **Bioproducción de *Butyrivibrio fibrisolvens*.** En un Biorreactor de capacidad 1 litro y el medio de cultivo C, a las condiciones establecidas, se obtuvo la biomasa de microorganismo para su posterior aplicación.

➤ **Medio de Cultivo D:** Para llevar a cabo la evaluación del efecto sinérgico se preparó un medio de cultivo líquido que consistió en contenido ruminal clarificado al 40 % v/v y 0,5 % p/v de forrajes propios de la zona de Córdoba (Angleton (*Dichantium aristatum*), Colosoana (*Bothriochloa pertusa*) y Guinea (*Panicum maximum*). En frascos de 70 ml de volumen, se colocaron 30 ml del medio. Se llevó al autoclave durante 20 minutos a 15 libras de presión y finalizado ese tiempo se dejó enfriar y se ajustó el pH a 6,3 con solución de ácido Acético al 10

%. En este medio se estudió la interacción en co-cultivo y para ello se determinó la cinética de crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* en el medio D.

➤ **Cinética de Crecimiento.** La curva de crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* en el medio líquido D, se obtuvo midiendo la biomasa producida a intervalos de seis horas durante 48 horas bajo las condiciones ruminales de temperatura, pH y anoxigenia, utilizando un equipo Spectronic 20 D y longitud de onda de 640 nm; lo anterior para establecer el tiempo de mayor crecimiento del microorganismo. El resultado se dio a las 24 horas. (Ensayo por triplicado).

También se realizó conteo de células viables en los mismos intervalos de tiempos para corroborar el tiempo de máximo crecimiento microbiano (Ensayo por triplicado).

➤ **Interacción en Co-cultivo:** En frascos de capacidad 70 ml se colocaron 30 ml del medio de cultivo D, a los que se adicionaron 0,2 ml ( $0,7 \times 10^8$  cel /ml) de mezcla 1:1 y 1:3 de *Butyrivibrio fibrisolvens* y de los microorganismos aislados. Se dejó incubar durante 24 horas a las condiciones establecidas. Terminado la incubación se extrajeron con una pipeta 10 ml del líquido para la determinación cromatográfica de los ácidos: Acético y Butírico; el resto del líquido se utilizó para determinar la variación en el pH, utilizando un potenciómetro

➤ **Determinación de Ácidos Grasos Volátiles.** En el estudio de la interacción en co-cultivo entre la cepa celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* y los microorganismos aislados se determinó la producción de los ácidos acético, butírico y propiónico. Es importante aclarar que aunque el microorganismo en estudio únicamente produce los ácidos acético y butírico (Tabla 1) a partir de forrajes, también se determinó la producción del ácido propiónico como dato adicional a la investigación, por que los tres ácidos constituyen cerca del 90-95 % del total de los ácidos producidos en el rumen (La concentración de ácidos en

el rumen como porcentaje en moles esta repartida así: ácido acético 65%, ácido butírico 15 % y ácido propiónico 20 %)

La determinación de los ácidos en mención se llevó a cabo mediante Cromatografía de Gases, empleando los derivados butil ésteres, (Salonitro, 1975; Moreno, 1999). Se utilizó este método de cuantificación teniendo en cuenta la disponibilidad del equipo en nuestro laboratorio.

En el proceso de preparación de los derivados butilésteres, las muestras que contienen los ácidos (acético, butírico y propiónico) son sometidas a la alcalinización (NaOH 0,5 N) para convertir a los ácidos orgánicos libres, en sus respectivas sales que corresponden a sólidos cristalinos, no volátiles y evitar la pérdida por volatilización. Las sales anteriormente obtenidas luego de ser secadas, son tratadas con solución HCL –butanol-hexano. El ácido inorgánico, permite la recuperación de los ácidos orgánicos y luego la reacción con el alcohol produce el butilester que son posteriormente inyectados al cromatógrafo.

Las curvas de calibración para los patrones de ácido acético, butírico y propiónico con sus respectivas gráficas se muestran en la sección de Anexos. (Anexo C, Tablas 1 y Tabla 2). Se construyeron en términos de la relación entre el área del pico correspondiente al ácido (ácido acético o ácido butírico) y el área del patron interno (tridecano) versus la concentración en milimolar de cada ácido.

Los tiempos de retención encontrados fueron de 3,19 para el ácido acético, 5,33 para el ácido butírico, 4,16 para el ácido propiónico y 9,9 para el patron interno (tridecano) como lo demuestran los cromatogramas. Los datos fueron reproducibles (ver Anexo F).

Como patron interno se evaluaron los hidrocarburos C13 y C16 a diferentes concentraciones y se escogió el C13 porque mostró mejor ubicación en el

cromatograma. La adición del estandar interno se consideró inicialmente que podía llevarse a cabo en el momento de formar los butilesteres o después de la formación de estos compuestos teniendo en cuenta que el C13 es un hidrocarburo inerte y no se afectaría el resultado, sin embargo se escogió realizar la adición en el momento de formación de los butilesteres por que se considera que el tratamiento químico para la formación de estos compuestos ya se ha realizado y es el instante propicio para comenzar la cuantificación.

Se evaluaron diferentes programaciones de temperaturas y demás parámetros (velocidad de flujo de gas, cantidad de inyección de la muestra, entre otros) en el cromatógrafo de gases de nuestro laboratorio lograndose de esta manera la optimización de las condiciones instrumentales.

La cromatografía de gases fue la herramienta fundamental en la presente investigación para la determinación de la interacción en co-cultivo de los diferentes microorganismos y tambien muy valiosa para corroborar con la identificación del *Butyrivibrio fibrisolvens* a través del analisis de los ácidos producidos por la bacteria.

Esta técnica fue modificada y adaptada de acuerdo a los equipos y condiciones del laboratorio y luego de multiples ensayos se logró la estandarización; se llevó a cabo como se describe a continuación:

Un mL de extracto (muestra), fue colocado en un tubo de ensayo de 5 ml de capacidad (8 mm x 60 mm), se adicionó 1 ml de acetona, se tapó y agitó el tubo y se centrífugo a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a un vial de 5 mL de capacidad elevando el pH a un valor comprendido entre 8 - 10 con solución de NaOH 0.5 N. La muestra fue secada a 80 °C en estufa. Al residuo seco se le agregaron las siguientes soluciones:

200  $\mu\text{L}$  de butanol anhidro saturado con ácido clorhídrico (HCl 0.5 N en butanol); 800  $\mu\text{L}$  de hexano; 20  $\mu\text{L}$  de una solución de tridecano en hexano (50  $\mu\text{L}$   $\text{C}_{13}\text{H}_{26}$  /mL) como P.I (patrón interno); 50 mg de sulfato de sodio anhidro. Se selló herméticamente el vial agitándose vigorosamente en vortex (aprox. 30 s) y calentando a baño maría a 60 °C durante 1 hora. Se dejó enfriar la mezcla y la capa orgánica fue lavada con 2 x 1 ml de agua destilada. La capa orgánica fue entonces secada con sulfato de sodio anhidro y aforada con hexano a 1.0 ml de volumen final.

Se inyectó 0.5  $\mu\text{L}$  de solución de ésteres directamente al cromatógrafo de gases.

La preparación de los patrones de butil ésteres se realizó de la siguiente forma:

A un vial de 5 mL se le adicionó lo siguiente:

Ácido acético (ver Anexo C, Tablas 1 y 2 )

Ácido butírico (ver Anexo C, Tablas 1 y 2)

Ácido propiónico (ver Anexo C, Tablas 1 y 2)

800  $\mu\text{L}$  de hexano

200  $\mu\text{L}$  de butanol saturado con HCl

50 mg de sulfato de sodio anhidro.

20  $\mu\text{L}$  de una solución de tridecano en hexano (50  $\mu\text{L}$   $\text{C}_{13}\text{H}_{26}$  /mL) como patrón interno.

Se selló herméticamente, se agitó (30 s) y procedió de forma idéntica a la metodología descrita anteriormente.

Para la preparación de los patrones de los butílesteres se consideraron dos tratamientos iniciales: a) tratamiento siguiendo la misma metodología llevado a cabo para las muestras; y b) tratamiento en medio no acuoso y sin adición de hidróxido de sodio (NaOH 0,5 N). Lo demás fue igual en comparación con las muestras.

El hidróxido de sodio se adiciona para transformar en sales a los ácidos presentes y poder concentrarlos evitando así las pérdidas por volatilización. Con base en esta consideración se realizaron determinaciones cromatográficas utilizando los patrones siguiendo los tratamientos a) y b) para la cuantificación de los ácidos y no se observó variaciones en la concentración de los mismos por lo que se decidió trabajar con los patrones preparados siguiendo el tratamiento b).

Las condiciones de elución cromatográfica fueron las siguientes

Cromatógrafo: Perkin Elmer modelo Autosistem xl

Columna: HP-5

Detector FID: 250 °C

Inyector Split/Splitless: 220 °C

Horno: 60°C (0.5 min), 60 – 220 °C (10 °C/min), 220 °C (5 min)

Presión Gas arrastre (Argón): 7.0 psi.

La identificación de los ácidos presentes en las muestras se hizo por comparación con los tiempos de retención de los patrones. La cuantificación se realizó por el método del estándar interno (tridecano:  $C_{13}H_{28}$ ), multiplicando la razón del área del pico del componente ( $A_m$ ) sobre el área del pico del patrón interno ( $A_{PI}$ ) por el factor de respuesta del ácido respectivo.

En todos los casos se empleó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, equipado con un detector de ionización en llama (FID) y una columna capilar de sílice fundida de 25 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno, recubierta por una película de 0.25  $\mu$ m de espesor de 5%- fenil-poli(metilsiloxano) y se usó argón (Aga Fano S.A) como gas de arrastre.

(Ensayo por triplicado luego de la estandarización para cada interacción en cultivo)

➤ **Análisis estadístico del efecto Sinérgico.** Se aplicó un análisis estadístico de Varianza y Regresión múltiple según el modelo de Durbin-Watson para establecer la incidencia de los microorganismos aislados frente a *Butyrivibrio fibrisolvens* en el efecto de interacción en co-cultivo.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los carbohidratos estructurales que conforman la pared vegetal (celulosa, hemicelulosa y pectina) son los mayores constituyentes de la dieta animal a base de forrajes de mala calidad (forrajes tropicales) y la principal fuente de energía para el rumiante. La fermentación y el metabolismo de estos componentes es llevada a cabo por la actividad microbiana desarrollada en el ecosistema ruminal, especialmente del grupo de los microorganismos llamados celulolíticos, convirtiéndose esta población en la de mayor importancia para el proceso digestivo del animal.

El principal problema en el aprovechamiento del material fibroso es la inaccesibilidad al sustrato debido a las propiedades químicas y estructurales que limitan su degradación y utilización. Las bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* y *Butyrivibrio fibrisolvens* son las principales especies encargadas de transformar el material fibroso en ácidos grasos volátiles, (AGV), principalmente el acético que es predominante en forrajes ricos en fibra. Los AGV son los productos más importantes de la fermentación ruminal obtenidos por la actividad microbiana a partir de los carbohidratos de la dieta.

Las investigaciones previas desarrolladas de experimentos “*In vitro*” sobre interacciones microbianas entre especies ruminales y, entre ruminales y no ruminales, han puesto de manifiesto la existencia de efectos positivos en el proceso de fermentación ruminal los cuales han sido clasificados como sinergismos y han demostrado un impacto significativo en los procesos degradativos y fermentativos de ciertos sustratos especialmente de la celulosa, hemicelulosa y pectina permitiendo mayor disponibilidad y aprovechamiento de la dieta consumida por el animal.

Los estudios realizados en este sentido han demostrado que el trabajo conjunto entre especies celulolíticas con otras no celulolíticas ya sea de origen ruminal o no ruminal han mejorado notablemente la fermentación de los carbohidratos estructurales ofreciendo un potencial para incrementar la productividad animal via alterando el número o la actividad de una clase específica de microorganismos (Probióticos). Los resultados de efectos sinérgicos hallados entre los microorganismos celulolíticos con otros no celulolíticos han permitido el entendimiento de la degradación, utilización, fermentación y conversión del material fibroso, contribuyendo a un mejor entendimiento de la ecología microbiana ruminal y su participación en el proceso digestivo.

Con el conocimiento de las transformaciones microbiológicas que se originan en el rumen y de las interacciones llevadas a cabo entre las diferentes especies se ha explicado mucho acerca de la naturaleza de la fermentación ruminal de ahí la importancia de realizar estudios de investigación en este campo.

Teniendo en cuenta que dentro del grupo de microorganismos celulolíticos las especies del género *Butyrivibrio spp* son las únicas productoras de los ácidos grasos volátiles como el acético y el butírico y que éstos compuestos constituyen los principales productos energéticos y de síntesis para la grasa corporal y de la leche en los rumiantes, es de suma importancia en el trópico la valoración y el estudio de interdependencias que contribuyan a un incremento en la producción de estas sustancias traduciéndose en un aumento de energía y precursores de la grasa disponible para el animal a partir de dietas de bajo valor nutricional.

Conscientes de la importancia de establecer cuáles de las poblaciones del rumen y del estiércol, (bacilos, cocos y levaduras), tienen mayor habilidad para lograr potenciar la conversión de forrajes de baja calidad por *Butyrivibrio fibrisolvens* hacia la producción de compuestos útiles al rumiante (ácidos acético y butírico),

se llevó a cabo esta investigación escogiendo a *Butyrivibrio fibrisolvens* como anfitrión y a los demás microorganismos aislados como posibles potenciadores del efecto.

Dados los criterios de selección de los microorganismos como Probióticos descritos en el capítulo 3, numeral 3.1.3, el conocimiento sobre los productos de fermentación (ácidos acético y butírico) aportados por bacilos y cocos (Tabla 1) y de la importancia de las levaduras en los procesos fermentativos y como factores de crecimiento microbiano, se asumió que dentro de las especies ruminales aisladas (autóctonas) que se encuentran en menor proporción, existan especies con potencial como Probiótico.

Por lo anteriormente dicho resultó de interés investigar cuáles de esas especies puedan contribuir a potenciar la actividad de *Butyrivibrio fibrisolvens* (autóctono) ofreciendo un efecto benéfico para el rumiante, como es el de mejorar la fermentación ruminal de los forrajes de baja calidad e incrementar la producción de los ácidos acético y butírico esenciales para el animal incrementando la disponibilidad de fuente de energía y de grasa ; esto condujo a realizar un estudio de la interacción en co-cultivo de *Butyrivibrio fibrisolvens* con los demás microorganismos.

A pesar de que el microorganismo anfitrión (*Butyrivibrio fibrisolvens*) no produce ácido propiónico, esta sustancia fue evaluada por que conforma el grupo de los llamados ácidos grasos volátiles,(AGV), Esta determinación se llevó a cabo, como un dato adicional , sin embargo no constituyó un objetivo primordial en el presente investigación porque nuestro interés estuvo centrado en la determinación de los ácidos acético y butírico, producidos por la bacteria e importantes en la producción de la energía y grasa para el animal cuando la dieta es rica en material fibroso propios de nuestros trópicos.

En la presente investigación también se decidió trabajar con el hongo *Aspergillus oryzae* (autóctono), que aunque no es un microorganismo ruminal, es muy importante, porque ha sido reconocido como Probiótico por sus efectos benéficos en el animal. Este reconocimiento se ha basado en los resultados obtenidos sobre estudios “*In vitro*” realizados con el hongo los cuales han mostrado incrementos tanto en la digestibilidad de la fibra como en la producción de ácidos grasos volátiles, (Wiedmeier, 1987 y Fondevila *et al*, 1990); y aumento en el número de bacterias celulolíticas cuando se realizó evaluación en co-cultivo con algunas de estas especies; trabajo publicado por Beharka, 1998 y Varel *et al*, 1993.

## **5.1 MICROORGANISMOS AISLADOS**

Los microorganismos presentes en el rumen no necesariamente corresponden a los habitantes normales establecidos allí, porque pueden provenir del agua, el suelo y el alimento. Las especies que prevalecen son aquellas que tienen la capacidad de soportar o adaptarse a las condiciones propias del ecosistema ruminal. Existen muchos factores que afectan el número y la variedad de los microorganismos en un determinado momento como son la calidad de la dieta, la periodicidad del consumo de alimento, la competencia con otros microorganismos (ej, bacterias-protozoos), la edad del animal y otros factores que son desconocidos.

El análisis microscópico y la coloración con el reactivo de Gram realizado a las muestras recolectadas directamente del rumiante fistulado y de las obtenidas del estiércol mostraron una gran diversidad de microorganismos principalmente de cocos, levaduras y bacilos de diferente morfología, en su mayoría G(+).

Las bacterias aisladas en el rumen de los animales alimentados con forrajes de baja calidad propios de las zonas Cordobesas correspondieron a bacilos y a cocos, de acuerdo a la clasificación presentada en la Tabla 1 y en su mayoría

productoras de los ácidos acético y/o butírico, como productos finales de fermentación. Algunos de las especies fueron identificadas como pertenecientes a los géneros: *Lactobacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp*, *Ruminococcus spp* y *Butyrivibrio spp*.

Las levaduras no se encuentran en abundancia en el rumen por que son especies transitorias; en la presente investigación fueron aisladas e identificadas algunas poblaciones correspondientes a los género *Saccharomyces spp* y *Debaryomyces spp*.

## **5.2 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

**-Medio A:** Contenido ruminal clarificado y ensilaje de maíz

Las concentraciones de contenido ruminal y de ensilaje más favorables para la preparación del medio de cultivo A, fueron del 40 % y del 5 % respectivamente, como se denota en la Tabla 5, debido a que se observó un mayor crecimiento de los microorganismos al realizar determinación de biomasa y además se observó mayor diversidad.

Este último aspecto hace referencia a que inicialmente el medio de cultivo utilizado para el aislamiento, contenía 10 % de contenido ruminal clarificado y 10 % de ensilaje de maíz y bacterias del tipo filamentosas, que aunque no se utilizaron en la presente investigación si se aislaron en éste medio, mostraron un crecimiento nulo en el medio de cultivo cuya concentración de contenido ruminal fue del 10 % y 5 % de ensilaje de maíz; similares resultados se obtuvieron para la cepa 3. Para ambos casos, a medida que se aumentó la concentración del contenido ruminal el crecimiento mejoró notablemente.

En este medio de cultivo y a las condiciones establecidas de pH, temperatura y anoxigenia, se observó microscópicamente y mediante coloración de Gram, un

buen crecimiento de los microorganismos aislados del rumen y del estiércol: bacilos, cocos y levaduras.

Como es natural, este medio de cultivo reúne las condiciones nutricionales necesarias para el crecimiento de estas poblaciones microbianas puesto que se preparó con base en la dieta que consume el rumiante; el contenido ruminal adicionado proporciona principalmente los ácidos grasos volátiles que son factores importantes de crecimiento y componentes proteicos. (Caldwell, 1966; Dehory, 1965).

Tabla 5. Biomasa microbiana determinada en el medio de cultivo A a diferentes concentraciones de Ensilaje y Contenido ruminal

Contenido ruminal	10%		20%		30%		40%	
Ensilaje	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%
Cel /ml	10 <sup>8</sup>							
<b>Levaduras</b>								
19 (r)	4,79	4,98	5,03	5,62	5,98	6,17	7,73	7,52
18 (e)	3,85	3,74	3,41	3,70	3,50	3,81	3,73	4,00
20 (e)	3,44	3,79	3,56	3,90	3,85	4,05	4,57	4,39
21 (r)	4,57	4,70	5,43	5,80	5,38	6,02	6,98	6,78
<b>Cocos</b>								
17 (r)	2,98	3,98	4,87	5,65	5,48	6,54	7,87	6,77
15 (r)	3,35	3,87	5,01	5,84	6,95	7,54	8,75	7,58
16 (r)	3,65	4,04	5,98	6,65	7,01	7,87	8,45	8,65
<b>Bacilos</b>								
3 (r)	---0--	0,51	1,83	2,30	2,70	2,75	2,78	2,87
1 (r)	2,25	2,98	3,55	3,83	4,97	5,80	6,50	6,20
6 (e)	2,65	2,95	3,45	3,65	3,97	4,34	5,83	5,65
8 (r)	2,67	3,00	3,25	3,40	3,81	3,93	4,80	4,45
13(r)	3,03	3,83	4,30	4,55	5,25	5,55	6,01	6,00
4 (r)	5,98	6,24	7,50	7,35	8,43	8,50	9,83	9,64
9 (e)	1,87	2,75	3,50	3,95	4,50	4,85	5,31	5,40
7 (r)	2,01	1,93	2,38	2,45	2,73	2,50	2,82	2,97
10(r)	3,11	3,67	4,95	4,50	5,01	4,83	5,40	5,04
5 (r)	1,98	2,65	3,88	3,96	4,20	4,35	4,70	4,87
11 (r)	21,04	21,97	23,89	24,21	25,47	26,35	28,20	28,35
14 (r)	4,89	5,23	5,01	5,41	6,03	6,80	7,15	7,30
2 (r)	3,00	3,65	4,20	3,92	5,76	5,50	6,60	6,03
12 (r)	2,98	3,25	4,00	3,81	4,76	4,55	5,70	5,56
<b>Bacterias filamentosas</b>	--0---	0,54	1,67	2,43	4,32	4,55	5,56	5,67

Fuente: Autor.

**-Medio B** : Guayaba agria.(*Psidium araca*). (Ver Anexo A)

Como contribución al aislamiento, multiplicación y mantenimiento de la microbiota ruminal para su estudio, la presente investigación desarrolló un nuevo medio de cultivo diferente a los convencionales, utilizando como sustrato Guayaba agria (*Psidium araca*), fruta originaria del departamento Colombiano de Córdoba.

El jugo de la fruta llevado a pH= 6,3 mediante la adición de bicarbonato de sodio al 10 %, sirvió como medio de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos del rumen y del estiércol. Este medio novedoso y totalmente diferente a los tradicionales mostró mayor crecimiento y diversidad microbiana a una concentración de fruta del 25 % p/v, como se observa en al Tabla 6. Las cepas 16, 1 y 13 mostraron un crecimiento nulo a una concentración de fruta del 10 % p/v pero a medida que se fue incrementando la concentración de la Guayaba también se aumento el crecimiento.

Cuando el medio de cultivo se preparó en forma solida la anaerobiosis se logró colocando las cajas de petri en una cámara de anaerobiosis. Para la preparación del medio en forma líquida, la adición de la solución de bicarbonato de sodio al medio de guayaba agria además de permitir el ajuste en el valor del pH, generó la producción de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo, debido a los ácidos orgánicos que se encuentran presentes en la fruta; el CO<sub>2</sub> así producido junto con la adición de aceite mineral permitieron un ambiente de anoxigenia apropiada para los microorganismos, asemejando al ambiente ruminal.

Tabla 6. Biomasa microbiana determinada a diferentes concentraciones de fruta.

<b>Microorganismos</b> (Tipo)	<b>10 %</b>	<b>15 %</b>	<b>20 %</b>	<b>25 %</b>	<b>50 %</b>
<b>Levaduras</b>	10 <sup>8</sup> Cel / ml				
19 (r)	3,20	5,30	7,07	9,11	8,80
18 (e)	5,30	10,15	12,33	15,53	15,00
20 (e)	2,15	3,80	5,15	6,64	6,60
21 (r)	3,03	5,4 0	7,01	8,12	8,53
<b>Cocos</b>					
17 (r)	2,15	4,90	6,72	8,48	8,02
15 (r)	1,03	1,83	3,06	3,81	4,06
16 (r)	-----	1,01	2,47	3,42	3,98
<b>Bacilos</b>					
3 ( r)	1,31	1,88	2,73	3,76	3,98
1 ( r)	----	1,43	2,05	2,73	1,96
6 (e)	1,15	2,83	3,15	3,09	2,87
8 (r)	----	1,31	2,95	3,79	3,40
13(r)	0,81	1,69	1,85	2,15	2,03
4 ( r)	1,33	3,01	4,28	5,52	4,74
9 (e)	0,83	1,33	2,83	3,31	3,90
7 ( r)	4,80	6,78	7,30	7,27	6,90
10(r)	1,98	3,91	4,54	5,29	5,82
5 ( r)	3,00	4,32	5,67	6,10	6,79
11 (r)	13,07	15,39	18,89	21,0	20,02
14 (r)	2,96	3,50	3,87	3,94	4,31
2 ( r)	4,01	6,53	8,87	10,0	9,81
12 (r)	1,09	3,02	4,03	5,29	5,50

Fuente: Autor.

Microscópicamente y empleando el reactivo de Gram, se encontró que el aislamiento y crecimiento de los microbios en estudio, se vio favorecido, mostrando a estos microorganismos en un buen estado morfológico y sin modificaciones pudiéndose repetir su aislamiento sin dificultad.

La Tabla 7 resume los datos promedios obtenidos del conteo en placa de células viables de los microorganismos aislados en el medio de Guayaba agria al 25 %p/v.

Según el conteo de células viables de los microorganismos aislados y descrito en la Tabla 7 se denota en forma general, un crecimiento favorable para las diferentes géneros en el medio líquido B, siendo el grupo de las levaduras el más beneficiado al mostrar por grupo, valores altos en crecimiento. La observación microscópica y las pruebas bioquímicas de fermentación y asimilación permitieron la identificación de algunos de los microorganismos aislados.

Las Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, (Anexo B) corresponden a las imágenes macroscópicas y microscópicas tomadas de algunos de los microorganismos aislados e identificados en el medio de Guayaba agria (*Psidium araca*), llamado medio B en el presente trabajo de investigación y los números entre paréntesis corresponden a las cepas de la Tabla 7.

Tabla 7. Conteo de los distintos tipos morfológicos de los microorganismos aislados en el medio líquido B (Guayaba agria).

Tipos microbianos	UFC/ml medio	Tipos microbianos	UFC/ml medio
<b>Bacilos no endosporados G(+)</b>		<b>Bacilos curvos</b>	
1	$5 \times 10^6$	14	$5 \times 10^4$
2	$6,78 \times 10^8$	<b>Cocos G(+)</b>	
3	$21 \times 10^6$	15	$5 \times 10^6$
4	$14 \times 10^6$	16	$6 \times 10^6$
5	$17 \times 10^6$	17	$2,87 \times 10^8$
6	$6 \times 10^2$	<b>Levaduras</b>	
7	$22 \times 10^6$	18	$27 \times 10^6$
8	$6 \times 10^6$	19	$16 \times 10^6$
9	$5 \times 10^6$	20	$21 \times 10^6$
10	$6 \times 10^6$	21	$18 \times 10^6$
11	$7 \times 10^6$		
<b>Bacilos endosporados G (+)</b>			
12	$13 \times 10^6$		
13	$5 \times 10^2$		

**Conteo:** Agar recuento para bacilos y cocos y agar Malta para levaduras.

**UFC/ ML de medio B:** Unidades formadoras de colonia en un mililitro

**Los números indican cepa 1, cepa 2, cepa 3....etc.**

Fuente: Autor.

Con respecto al hongo *Aspergillus oryzae*, (Figura 11, Anexo B), se observó un buen crecimiento en un tiempo de incubación de 72 horas en los medios de cultivo A y B con anoxigenia parcial y a las demás condiciones de temperatura y pH ruminales; cuando se sometió a condiciones de anoxigenia total su desarrollo fue muy lento observándose microscópicamente la presencia de hifas.

**-Análisis químico efectuado a la fruta y al jugo.** Los resultados de las determinaciones químicas efectuadas a la fruta y al jugo de guayaba agria en una concentración del 25 % p/v, después de llevar al autoclave durante 15 minutos y a 15 Psi, se resumen en la Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Análisis Bromatológico de la Guayaba agria, (Base seca)

<b>Determinación</b>	<b>% en promedio</b>
Humedad	82,52
Proteína	2,56
Fibra	30,0
Ceniza	0,54
Grasa	0,11
ENN	66,79

Fuente: Autor.

El resultado del análisis químico efectuado a la fruta, Tabla 8, (Bernal, 1994; García 1995), indicó: 82,2 % de humedad que incluye agua y sustancias volátiles; 2,56 % de proteína que agrupan un gran número de compuestos poliméricos cuyas unidades básicas son los aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

66,79% de ENN (100% - % de proteína, fibra, grasa y ceniza), constituye la parte más valiosa del alimento. En este grupo están presentes los mono y disacáridos, la parte soluble de la celulosa, lignina, las hemicelulosas, el almidón, toda clase de azúcares, toda clase de material pectídico, ácidos orgánicos y otros materiales libre de nitrógeno.

En el 0,11 % de grasa podrían haber sustancias como glicéridos, fosfolípidos, esteroide, ácidos grasos libres, pigmentos carotenoides y vitaminas liposolubles A, y E.

En el 30 % de fibra podrían estar presentes celulosa, lignina, pectinas y otras sustancias complejas; 0,54 % de cenizas que generalmente se compone de carbonatos<sup>78</sup>.

El análisis químico efectuado, al jugo de guayaba agria luego de ser esterilizado en el autoclave, Tabla 9, permite mostrar: 1 % de azúcares totales lo que incluye todos los azúcares ya sean reductores y no reductores y 0,59 de azúcares reductores. Esta designación se da a los carbohidratos que tienen la capacidad de poder reducir iones metálicos como Plata y cobre, al mismo tiempo que el azúcar se oxida para formar un ácido carboxílico<sup>79</sup>.

Tabla 9. Análisis Químico del jugo de Guayaba agria (*Psidium araca*) al 25 %.  
(valores promedios de ensayos por triplicado)

Determinación	Valor	Elementos presentes	ppm
Azúcares Totales	1,00%	Mg	22,12
Azúcares Reductores	0,59%	Ca	52,69
Azúcares No Reductores	0,41	Fe	9,8
Azúcares Invertidos	59,0%*	K	323,12
Proteínas	0,27%	Na	14,93
Grados Briz (° Brix)	4,8	Mg	22,12
pH	2,29 - 3,17		
Índice de refracción	1,340		
Ácido Acético	0,7 mM		
Ácido Butírico	0,3 mM		

\* % con respecto a los azúcares Reductores.  
Fuente: Autor.

<sup>78</sup> Badui, 1996; Bernal, 1994

<sup>79</sup> Fennema, 1993

Todos los monosacáridos sean aldosas o cetosas (glucosa, fructosa, maltosa, etc) son azúcares reductores como lo son también la mayoría de los disacáridos siendo la excepción importante la sacarosa (azúcar común de mesa) que no es reductora<sup>80</sup>. En el jugo de guayaba agria se encontró un contenido de 0,41 azúcares no reductores que corresponde a la diferencia entre los azúcares totales menos los azúcares reductores; 59 % de azúcares Invertidos. Se conoce con este nombre a la mezcla de azúcares producidos cuando la sacarosa se hidroliza química o enzimáticamente.

El concepto de inversión se refiere al cambio del poder rotatorio que se observa durante dicha hidrólisis: la sacarosa es desrotatoria (+66) pero al transformarse en glucosa (+52) y fructosa (-92) la mezcla resultante desarrollo un poder levorrotatorio (-20) por influencia de la fructosa. A ese giro de +66 a -20 se le llama inversión. La mezcla glucosa y fructosa se conoce como azúcar de Inversión. (Badui, 1996); 0,27 % de proteína presente como proteína soluble en el medio acuoso; 4,8 °Brix, que representa los sólidos disueltos en el jugo.

El Índice de Refracción encontrado (1,340) en el jugo corresponde a la desviación en grados que sufre el plano de luz polarizada por la presencia de azúcares que tienen la esa propiedad<sup>81</sup>.

Con respecto a los elementos presentes, el hierro se encuentra en menor cantidad siguiendo en su orden el sodio, el magnesio, el calcio y el potasio. Fue determinada la presencia de los ácidos acético y butírico únicamente.

---

<sup>80</sup> Morrison, 1994

<sup>81</sup> Bernal, 1994

**-Evaluación de la biomasa en el medio de cultivo B y un medio tradicional utilizando contenido ruminal.**

En la tabla 10 se resumen los valores de biomasa medidos a una longitud de onda de 640 nm para los diferentes microorganismos aislados en el medio de guayaba agria (B) y en el medio tradicional con fluido ruminal descrito por Caldwell, 1966. (Medio I, Tabla 11; éste medio será analizado en la sección siguiente)

La Tabla 10, muestra ligeros incrementos de la biomasa para algunos microorganismos en el medio de cultivo de Guayaba agria (columna 2); por grupo microbianos, las cepas correspondientes a las levaduras, sobresalieron destacándose dentro del grupo la cepa 18 que fue identificada como *Debaryomyces hansenii* (*ZopF*), (Figura22. Anexo D). Para el caso de los bacilos la cepa 2 que corresponde a bacterias del tipo *Lactobacillus* spp (Figura 28. Anexo B y la cepa 7 que corresponde a bacterias del tipo *Clostridium* spp (Figura 26. Anexo B), sobresalieron. Para otras especies, como las correspondientes a las cepas 11, 14, 4, 13, entre otras, el crecimiento no se dio en forma adecuada en el medio de guayaba sino que fue favorable en el medio tradicional como puede notarse.

Tabla10. Biomasa microbiana determinada en el medio de guayaba agria y en un medio tradicional

<b>Microorganismo (Tipo)</b>	<b>Medio de Guayaba agria 10<sup>8</sup> Celulas / mL</b>	<b>Medio tradicional 10<sup>8</sup> Celulas / mL</b>
<b>Levaduras</b>		
19 (r)	9,11	7,94
18 (e)	15,53*	4,08
20 (e)	6,64	4,98
21 (r)	8,12	7,09
<b>Cocos</b>		
17 (r)	8,48	7,90
15 (r)	3,81	8,75
16 (r)	3,42	9,92
<b>Bacilos</b>		

3 (r)	3,76	1,97
1 (r)	2,73	6,86
6 (e)	3,09	5,56
8 (r)	3,79	4,89
13 (r)	2,15	6,90
4 (r)	5,5 2	10,77
9 (e)	3,31	5,34
7 (r)	7,27*	2,69
10 (r)	5,29*	5,16
5 (r)	6,10*	4,48
11 (r)	21.0	30,6*
14 (r)	3,94	7,27
2 (r)	10,0 *	6,91
12 (r)	5,29	5,47

---

Longitud de onda= 640 nm

\* Cepas que crecieron en mayor cantidad en el medio de Guayaba agria.

(r) = Rumen, (e) = Origen ruminal o Estiércol

Fuente: Autor.

Una comparación de los valores de la biomasa basados unicamente en los resultados mostrados en la Tabla10, sin tener en cuenta el modelo estadístico que sera estudiado más adelante, permite establecer que tanto en un medio como en el otro existen pequeñas diferencias, casi insignificantes, basados en que se conserva el mismo orden de magnitud, sin embargo a pesar de que no se encuentran diferencias apreciables se pueden hacer algunas observaciones:

En el medio tradicional utilizado, preparado a partir de contenido ruminal clarificado y enriquecido con sales minerales y carbohidratos dentro de los que se encuentra la celobiosa, (Tabla 11 Medio I), la producción de biomasa de algunos microorganismos fue mayor a la observada en el medio de guayaba agria, posiblemente por la presencia de celubiosa ausente en el medio de guayaba, que actua como una fuente adicional de energía y también por que en el contenido ruminal existen requerimientos, algunos conocidos (ácidos grasos ramificados, algunas vitaminas y minerales) y otros desconocidos aún, que son necesarios para ciertos tipos microbianos.

La mayoría de microbios ruminales que fermentan carbohidratos son capaces de usar monosacáridos y disacáridos disueltos en el medio como sustrato de crecimiento incluyendo derivados de la fermentación de los polisacáridos estructurales<sup>82</sup>; sin embargo hay otras especies que están restringidos al uso de celobiosa y sus productos de fermentación como sustrato de crecimiento, tal es el caso de las bacterias celulolíticas.

Las bacterias celulolíticas requieren amoníaco, ácidos grasos ramificados, vitaminas y minerales para su óptimo crecimiento y óptima actividad (Scott, 1965; Stack, 1984). El fluido ruminal proporciona esos nutrientes en cantidad suficiente que garantizan la satisfacción de las necesidades, (Durand, 1989; Weimer, 1996; Fondevila, 1998). Las celulolíticas son muy especializadas en su nutrición por tanto en el medio de guayaba no crecerían a no ser que se adicionara celobiosa al medio.

Otros microorganismos, como el caso de la bacteria celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* pueden desarrollarse en ausencia de este carbohidrato lo que por su gran diversidad metabólica, pueden utilizar glucosa como fuente de energía pero su desarrollo es pobre en comparación con el medio en el cual hay celulosa. (Russell, 1988; Forster, 1997; Diez *et al*, 1999). Además en ausencia de celulosa no produce ácido Acético, su producción se limita solamente al ácido Butírico. (Bergey, 1994; Diez *et al*, 1999).

En el medio de guayaba, *Butyrivibrio fibrisolvens* creció y correspondió a la cepa 14. Al comparar la biomasa con la obtenida en el medio tradicional, se observó que este crecimiento fue menor, sin embargo cuando se adicionó 0,05 % de celubiosa (teniendo en cuenta la Tabla 11) al medio de guayaba, su crecimiento aumentó en un 15 % con respecto al crecimiento sin ese sustrato. *Butyrivibrio*

---

<sup>82</sup> Fondevila, 1998; Leedle *et al*, 1982

*fibrisolvens* además requiere ciertas cantidades de ácido Acético que aunque están presentes en el medio B, pueden ser insuficientes para el microorganismo.

**-Evaluación química del medio de cultivo B y los medios tradicionales.** Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de los microorganismos ruminales se resumen en la Tabla 11 y se han dividido en dos tipos: a) Medios con contenido ruminal clarificado, (Medio I), enriquecidos con glucosa, celobiosa, almidón, sales minerales, l-cisteína y en algunos casos extracto de levadura. b) Medios sin contenido ruminal clarificado, (Medio II), a los cuales se ha tenido que adicionar además de los componentes mencionados, ácidos grasos volátiles en pequeñas cantidades, hemina, y una serie de sustancias que están presentes en el contenido ruminal. (Caldwell, 1966; Dehority, 1963; Rodriguez, 1996).

Tabla 11. Composición de los medios tradicionales modificados para aislamiento de microbios ruminales

<b>Componente</b>	<b>% de nutrientes Medio I</b>	<b>en el medio Medio II</b>
Contenido ruminal clarificado	40	0,0
Glucosa	0,05	0,05
Celobiosa	0,05	0,05
Almidón soluble	0,05	0,05
Minerales	3,75	3,75
Sulfuro de Sodio nonahidratado	0,025	0,025
Cisteína. HCl. H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Resarzurina	0,0001	0,0001
Carbonato de Sodio	0,4	0,4
Tripticase	0,0	0,2
Extracto de Levadura	0,0	0,05
Ácidos grasos volátiles ( a, p, b, isob, isov.)	0,0	0,31
Hemina	0,0	0,001
Dióxido de Carbono	100%	100%

**Minerales** : Sulfato de Potasio, Cloruro de Potasio, Fosfato de Potasio, cloruro de Calcio, cloruro de Sodio, sulfato de Magnesio,

**Ácidos grasos volátiles**: a: acético; b: butírico; p: propiónico; isob: isobutírico; isov: isovalérico.

Fuente: Autor

Con la adición de contenido ruminal clarificado se ven favorecidos en su desarrollo y crecimiento una gran diversidad de microorganismos de los cuales el mayor

grupo lo constituyen las bacterias. Tal como se muestra en la Tabla 11, (Medio I ), el contenido ruminal proporciona principalmente proteína y hemina, haciéndose innecesario la adición de hemina, (0,0%), tripticasa (0,0%), y extracto de levadura, (0,0%), al igual que factores de crecimiento importantes como son los ácidos grasos volátiles, (0,0%); aunque se hace necesaria la adición de fuentes de energía como los carbohidratos, (celobiosa 0,05%, glucosa, 0,05% y almidón 0,05%) y algunas sales minerales (3,75%).

Los medios de cultivos modificados, (Medio II, Tabla 11), a diferencia del medio anterior precisan de la adición de la totalidad de los compuestos químicos requeridos por los microbios ruminales para su buen desarrollo y actividad. A estos medios hay que agregarles, hemina, (0,001%), tripticasa, (0,2%), y extracto de levadura, (0,05 %), como fuente de vitaminas del complejo B, aminoácidos o péptidos y factores de crecimiento de tipo orgánico (ácidos grasos volátiles), (0,31%), e inorgánicos, (3,75%), (sales minerales) (Cadlew, 1966). Estos medios por lo tanto se hacen más costosos y dispendiosos en su preparación.

La elaboración de medios de cultivo modificados a partir de sustratos que contengan un gran valor nutricional para la población microbiana del rumen en cuanto a fuentes de nitrógeno y carbohidratos constituye una alternativa para el aislamiento de estos microorganismos porque minimizan la utilización de sustancias químicas adicionales. Por tal razón se diseñó un medio de cultivo totalmente modificado, (medio B), aprovechando los recursos propios de la región Cordobesa muchas veces subutilizados y contaminantes del ambiente porque se dejan fermentar y pudrir generando problemas higiénicos para el entorno.

Aunque los nutrientes requeridos y utilizados por algunas especies microbianas se han identificado, los tipos, cantidades y combinaciones requeridas para optimizar el crecimiento total microbiano constituyen motivo constante de investigación.

Las investigaciones realizadas sobre las necesidades nutricionales para los microorganismos ruminales según los trabajos de Scott, (1965), Durand, (1989), Mackie, (1990), Hoover, (1991), Krause, (1996) y Russell, (1998), denotan que los mayores nutrientes para la población microbiana ruminal incluyen:

a) Carbohidratos, como fuente principal de energía encausada hacia la producción de ATP necesaria para el mantenimiento y crecimiento. Los polisacáridos complejos existentes en las plantas: celulosa, hemicelulosa, pectinas y almidón, son hidrolizados por las enzimas extracelulares que poseen los microorganismos del rumen dando como resultado un pool de pequeños oligosacáridos solubles en el medio de fermentación que proveen una fuente de energía para las especies que son capaces de hidrolizar los polisacáridos presentes en los forrajes y para los otros no poseen esta capacidad. La fuente de carbohidratos incluye también la porción fermentable de la fibra, los azúcares y los almidones (glucosa, celulosa, xilosa maltosa, etc.)<sup>83</sup>.

En el medio elaborado en la presente investigación, (Guayaba agria ó medio B), la fuente de carbohidratos disponible como fuente de energía para la microbiota aislada, está representada por los azúcares totales y reductores existentes, que básicamente corresponden a todos los monosacáridos, glucosa, fructosa, maltosa, etc y, que son utilizados por los microorganismos para su crecimiento y actividad. El tipo de carbohidratos aportado por el medio condiciona la proliferación y actividad fermentativa de ciertas poblaciones microbianas, (Krause, 1996); para el caso, (medio B), en el cual la fuente de carbohidratos es de rápida degradación, es de esperarse que los microorganismos que mayor proliferación presenten son aquellas que poseen capacidad amilolítica.

---

<sup>83</sup> Durand, 1989; Hoover, 1991; Krause, 1996).

b) Nitrógeno, importante en la producción de biomasa microbiana; cuando el aporte no es el adecuado se disminuye el crecimiento y la actividad fermentativa. Las mayores comunidades microbianas ruminales (bacterias, protozoos y hongos) todas han mostrado capacidad para hidrolizar proteína y utilizar los productos como fuente de nitrógeno para el crecimiento. Las bacterias, especialmente, han mostrado un gran actividad proteolítica<sup>84</sup>.

La fuente de nitrógeno preferida por la mayoría de las bacterias es el amonio. Sin embargo se ha encontrado en los estudios de Russell, (1998), que la presencia de aminoácidos permite un crecimiento más eficiente. En el medio de cultivo B, la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana, está representada como porcentaje de proteína que comprende aminoácidos y proteína soluble convirtiéndose en la fuente nitrogenada disponible. Los aminoácidos y los péptidos existentes en el medio pueden ser utilizados por los microorganismos directamente o pueden ser convertidos en amoniaco, para la síntesis de proteína microbiana y cadenas carbonadas que luego son utilizadas para la síntesis de acidos grasos ramificado.

c) Los factores de crecimiento tanto orgánicos como inorgánicos son necesarios, porque aseguran un buen funcionamiento y metabolismo normal celular. Obviamente si alguno falta o está en cantidad insuficiente el ritmo de crecimiento y la producción microbiana se verán afectadas. Las dietas a base de forrajes aportan la mayoría de los minerales o elementos traza, como factores de crecimiento, ya que las plantas precisan esos mismos minerales como factores de crecimiento. (Hoover 1990).

La presencia de los elementos: Potasio, (K), Magnesio, (Mg), Hierro, (Fe) Calcio, (Ca) y Sodio (Na), ya sea en solución o formando sales es de importancia para el normal crecimiento de los microorganismos. Brock, 1997.

---

<sup>84</sup> Mackie, 1990; Hoover, 1991

El Potasio es necesario para una diversidad de enzimas incluyendo las que actúan en la biosíntesis de proteínas. El Calcio ayuda a estabilizar la pared celular y es importante en la termorresistencia de las endosporas. El Magnesio se requiere para la activación de muchas enzimas, la estabilización de la membrana celular y de los ácidos nucleicos. El Hierro es importante para la respiración celular, siendo un componente clave de los citocromos y las proteínas implicadas en el transporte electrónico.

El Sodio, es necesitado por algunos microorganismos y se ha encontrado en el trabajo de Harrison *et al*, (1975), que la producción de proteína microbiana aumentó en un 24 % mediante el uso de Cloruro de Sodio (NaCl).

En el medio de cultivo B, están presentes los elementos anteriormente descritos asegurando un buen metabolismo y actividad microbianas. El K, el elemento que se encontró en mayor cantidad en dicho medio y que se requiere para una diversidad de enzimas que participan en la biosíntesis de las proteínas (Brock, 1997) junto con la proteína presente, permiten suponer que la biosíntesis de proteína microbiana se verá favorecida cuando los microorganismos se desarrollen sobre el medio de cultivo de Guayaba agria.

Algunas especies microbianas requieren o son altamente estimuladas por uno o más de los ácidos: acético, isobutírico, isovalérico, valérico 2 metil butirato; según la literatura consultada no se tiene conocimiento de la necesidad de los ácidos propiónico y butírico para el crecimiento de los microorganismos ruminales pero se suelen adicionar a los medios de cultivo porque están presentes en el contenido ruminal normalmente (Cadwell, 1966). Para evaluar la viabilidad del crecimiento microbiano y conocer si realmente estas poblaciones necesitan de los ácidos, butírico y propiónico como factores de crecimiento, sería recomendable colocar a los microorganismos aislados en un medio que los contenga.

El ácido acético es el de mayor producción en el rumen y la mayoría de las bacterias fermentadoras de carbohidratos lo producen. Algunas requieren de éste ácido aun cuando lo producen (Cadwell, 1966; Russell, 1990). En el medio de guayaba agria también está presente el ácido acético quedando disponible para las especies ruminales que lo requieran como factores de crecimiento.

Los resultados del análisis químico efectuado al jugo de guayaba agria al 25 % p/v, Tabla 9, utilizado como medio de cultivo y el análisis de la importancia de los nutrientes que se hizo en los párrafo anteriores, revelan que este medio nuevo totalmente diferente a los utilizados para aislamiento de cepas ruminales posee en forma natural, sustancias nutricionales esenciales como son: fuentes de nitrógeno (proteínas), fuente de energía, (carbohidratos) y factores de crecimiento (ácidos grasos volátiles: acético y butírico y elementos presentes), cuya importancia fué explicada anteriormente y que permiten un buen desarrollo y crecimiento de la microbiota aislada del rumen y del estiércol representada en bacilos, cocos y levaduras.

La comparación de los nutrientes existentes en el medio de guayaba y los encontrados o adicionados en los medios tradicionales, Tablas 9 y 11, no se puede hacer directamente para todos los componentes; se observa similitud en los valores de las fuentes de nitrógeno, importante en la producción de biomasa microbiana: 0,27 % de proteína para el medio de guayaba y 0,25 % para los medios tradicionales representados en tripticasa y extracto de levadura; en cuanto a carbohidratos, el medio de guayaba posee un valor más elevado 1% (azúcares totales) en comparación con un valor de 0,15 % para los medios tradicionales (glucosa, celubiosa y almidón soluble), esto permite que las poblaciones microbianas tengan una mayor fuente de energía disponible logrando así un incremento en el crecimiento y en el desarrollo de sus actividades.

Con respecto a las cantidades de ácidos grasos volátiles y a los elementos presentes en los medios tradicionales no se puede realizar una comparación con el medio de guayaba agria, debido a que sólo se determinó la presencia de dos ácidos, sin embargo, el ácido acético que es el más utilizado por algunos de los microorganismos ruminales está presente (Cadwell, 1966). La producción y disponibilidad de éste ácido en el rumen depende de la dieta consumida por el animal, luego las cantidades precisas para la microbiota son difíciles de determinar puesto que los medios tradicionales se preparan con los contenido ruminales y se asume que esta presente en cantidad apropiada para el desarrollo de las diferentes especies.

Teniendo en cuenta la determinación de los elementos presentes se observa que el Potasio, importante por sus implicaciones en diversos procesos enzimáticos, se encuentra en gran cantidad concordando este resultado con lo mostrado en la preparación de los medios tradicionales en los cuales los minerales están representados principalmente como sales y las sales de potasio están presentes en mayor cantidad.

Aunque en la actualidad los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de los microorganismos ruminales se basan en medios de formulación tradicional descritos por Caldwell, (1966) y Dehority, (1963), ya sea usando contenido ruminal clarificado, (Medio I), o adicionando todos los componentes, (Medio II), (Tabla 11), algunos géneros bacterianos como los celulolíticos son más exigentes que otros y requieren mayores cantidades de fuentes de energía así como ácidos grasos ramificados, vitaminas y minerales para su óptima actividad<sup>85</sup>.

El conocimiento de las cantidades exactas de nutrientes que permitan una actividad y crecimiento microbianos óptimos se conocen de manera muy particular

---

<sup>85</sup> Fondevilla, 1998.

y dependen de los tipos de microorganismos y de su habitat por lo que son motivo de continuas investigaciones.

El análisis químico efectuado al nuevo medio de cultivo y su comparación con los mayores nutrientes utilizados por la microbiota ruminal y descritos en párrafos anteriores, permite asumir que realmente el medio elaborado utilizando como sustrato, Guayaba agria, aporta a los microorganismos aislados las necesidades nutricionales requeridas. Los resultados del análisis microscópico y el conteo de las células viables realizado a las cepas aisladas y conservados en el medio en estudio, dan cuenta del buen desarrollo y estado morfológico de la población permitiendo el crecimiento favorable de microorganismos presentes en el rumen y en el estiércol, correspondientes a bacilos, cocos y levaduras.

Para el caso de microorganismos celulolíticos del tipo *Butyrivibrio fibrisolvens* su crecimiento es posible gracias a la diversidad metabólica que posee y que le permite disponer de la capacidad para utilizar varios sustratos, sin embargo como es celulolítico requiere también de celobiosa, no presente en el nuevo medio en forma natural, para lograr un mejor crecimiento; es así como se supone, que bacterias estrictamente celulolíticas que necesiten de este sustrato únicamente como fuente de energía, no se verían favorecidas en su crecimiento y multiplicación y posiblemente el medio no sería adecuado para ellas.

#### **-Análisis Estadístico.**

El modelo estadístico de Análisis de Varianza, ANOVA y Regresión Múltiple, aplicado, según Durbin-Watson, dice que para un valor de  $P \geq 0,10$ , no hay diferencia estadísticamente significativa entre las variables evaluadas, con un nivel de confiabilidad del 90% o mucho mayor.

Teniendo en cuenta el modelo estadístico aplicado a la población microbiana en general (sin hacer distinción de cocos, bacilos y levaduras) y el medio, se

encuentra que el valor de  $P \geq 0,3174$ , (Ver Anexo E. a) Análisis de todos los datos (Cepas y medios), es mayor que 0,10 lo que significa que el crecimiento de la población microbiana no se ve afectada estadísticamente por ninguno de los medios, ni por el tipo de microorganismo involucrado.

Esto significa que la biomasa de la población microbiana aislada no varía con los medios de cultivo: Guayaba agria y medio tradicional (con contenido ruminal, según Tabla11); en consecuencia, los resultados indican que la composición de los medios es semejante y por lo tanto las diferentes poblaciones crecen y se multiplican sin dificultad.

El análisis estadístico realizado por grupos de poblaciones microbianas muestra los siguientes valores de P:  $P \geq 0,2234$  para bacilos;  $P \geq 0,1042$  para cocos; y  $P \geq 0,1262$  para levaduras (Ver Anexo E b) Análisis por grupo de poblaciones: bacilos, cocos y levaduras). Los valores de P encontrados son mayores de 0,10 indicando que no hay diferencias significativas entre las diferentes poblaciones microbianas en el medio de guayaba y en el medio tradicional. Es decir ninguno de los medios influyen marcadamente en el crecimiento de los grupos de microorganismos.

Un análisis general efectuado a los resultados obtenidos en la determinación de la biomasa (Tabla10), en conjunto con el análisis estadístico, indican que aunque existen leves diferencias en los valores de la producción de biomasa para algunos microorganismos, finalmente no existen diferencias estadísticamente significativas que permiten que un medio supere al otro en el crecimiento y multiplicación de las especies aisladas.

Lo relevante del presente análisis es que el medio tradicional, (Tabla11, Medio I), preparado con contenido ruminal, fluido que posee los nutrientes encontrados en el ecosistema ruminal, no fué superior al medio de cultivo preparado con jugo de

guayaba al 25 % p/v, (Tabla 9), para los microorganismos aislados, siendo éste un medio totalmente diferente a los medios de cultivo publicados en literatura y utilizados en la actualidad para el aislamiento de microorganismos ruminales. (Lara, 2002)

En consecuencia, basados en el análisis químico y el análisis estadístico se asume que los componentes del medio de guayaba se asemejan a los encontrados en el medio tradicional, (ecosistema ruminal), tanto en cantidad como en calidad, permitiendo a los microorganismos un crecimiento y un desarrollo adecuado; por lo tanto se propone como una alternativa de cultivo para bacilos, cocos y levadura ruminales y de origen ruminal (estiércol).

Un estudio mas profundo por grupos de cepas individuales, que involucren determinación de biomasa a diferentes tiempos, (curvas de crecimiento), en los dos medios de cultivo, es requerido para tener un conocimiento mas preciso acerca del comportamiento de cada especie y para confirmar finalmente las bondades y ventajas del nuevo medio de cultivo.

El nuevo medio de cultivo, al cual fue necesario adicionarle, unicamente, bicarbonato de sodio para ajustar el valor del pH, puede representar una alternativa a muy bajo costo, al compararlo con los medios tradicionales utilizados en la actualidad y descritos en la Tabla11, debido a que no se hace necesaria la adición de otras sustancias químicas, que aunque deban ser agregadas en pequeñas cantidades suelen ser costosas.

Otra ventaja significativa que presenta el medio elaborado a partir de guayaba agria, es su carencia de olores desagradables a diferencia del medio utilizando contenido ruminal clarificado.

El nuevo medio se elaboró para contribuir a la utilización de un recurso propio de la región de Córdoba a veces subutilizado, puesto que el valor económico de la fruta es bajo y solo es empleada para la fabricación de jugos por los habitantes de la zona.

### **5.3 INTERACCIONES EN CO-CULTIVO ENTRE *BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS* Y LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.**

Los carbohidratos estructurales (material fibroso) y no estructurales (almidón, azúcares fácilmente degradables) presentes en la dieta, condicionan la proliferación y la actividad fermentativa de un conjunto de especies determinadas; cuando la dieta es rica en carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) las especies celulolíticas son las que proliferan predominantemente y su crecimiento es propiciado por las condiciones ambientales como el pH cerca a la neutralidad. La actividad microbiana inicialmente transforma el material fibroso en compuestos como hexosas y pentosas que luego son convertidos o fermentados en ácidos grasos volátiles principalmente acético, propiónico y butírico y su proporción son consecuencias de la composición del sustrato y de la población microbiana que los degrada, fermenta o los convierte.

Las condiciones ambientales en las que se desarrolla el proceso de degradación de la pared celular, las características físicas y químicas de los forrajes así como las interacciones entre los microorganismos determinan el grado y la tasa de digestión de los forrajes<sup>86</sup>.

Dentro de las estrategias que han sido identificadas en el ecosistema ruminal para degradar o fermentar los componentes de la pared celular se encuentran las interacciones microbianas. Las investigaciones al respecto han sido de gran valor para establecer la participación de cada una de las especies en la utilización de

---

<sup>86</sup> Fondeville, 1998.

los forrajes que permitan la optimización de los procesos de fermentación logrando así una mayor producción animal a bajo costo.

En su mayoría, las interacciones observadas en el rumen han sido efectos sinérgicos en la digestión de carbohidratos estructurales. Se han evaluado las interacciones de las bacterias celulolíticas *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, con microorganismos no celulolíticos como *Provetella ruminicola* en la utilización y fermentación de celulosa a partir de forrajes intactos.

Los resultados de esas investigaciones muestran un efecto positivo al incrementar la digestión de la celulosa como se observa en los trabajos de Coen y Dehority, 1970; las combinaciones de especies hemicelulolíticas degradadoras con otras poblaciones no degradadoras pero si utilizadoras de hemicelulosa ha mostrado un mejoramiento en la digestión del sustrato a partir de forrajes intactos, esos resultados fueron confirmados en los trabajos de Fondevila, 1994 y Osborne, 1989.

Es claro que el trabajo conjunto de ciertas especies microbianas permite una mayor utilización de los forrajes y una mayor eficiencia en los procesos fermentativo ruminales.

En la presente investigación la evaluación de las interacciones en co-cultivo “*in vitro*” entre la especie celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* y las poblaciones microbianas aisladas: bacilos, cocos y levaduras, del rumen y del estiércol y el hongo no ruminal *Aspergillus oryzae*, resultó de gran interés puesto que finalmente los efectos sinérgicos encontrados entre *Butyrivibrio fibrisolvens* y la levadura aislada del estiércol: *Debaryomyces hansenii* (ZopF), mostraron resultados positivos en la conversión o fermentación de forrajes intactos que

permitieron un incremento en la producción de los ácidos acético (13,2 mM) y butírico (0,3 mM) que benefician directamente al rumiante.

El efecto sinérgico hacia una mayor conversión de forrajes intactos, se logró con una levadura aislada del estiércol; la literatura consultada no reporta datos al respecto.

**-Evaluación de la interacción en co-cultivo “In vitro” de *Butyrivibrio fibrisolvens* con los microorganismos aislados.**

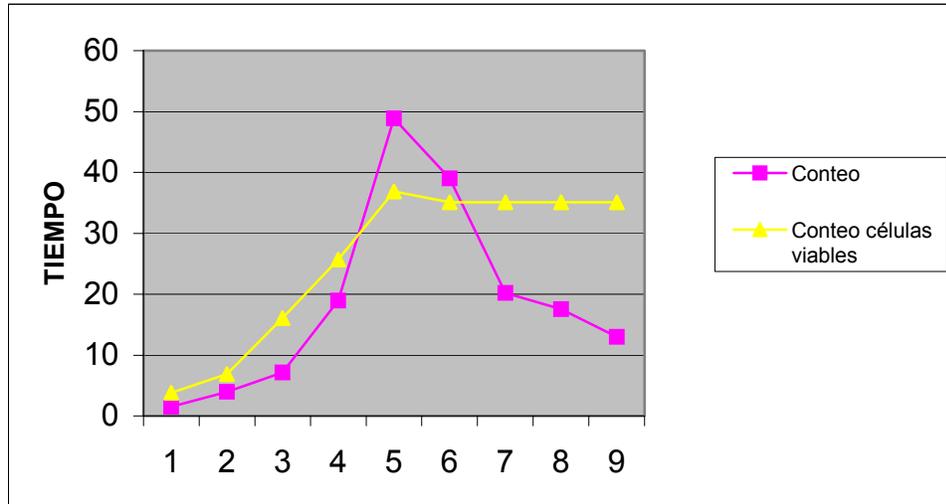
Los resultados de la cinética de crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens*, en el medio D, (forraje al 0.5% y contenido ruminal al 40%), permitieron establecer la fase logarítmica a las 24 horas, como se demuestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Curva de crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* en el medio D (valores promedios ensayos por triplicado)

<b>Tiempo</b> (Horas)	<b>Conteo de células viables</b> UFC/ml ( $10^6$ )	<b>Biomasa</b> ( $10^8$ Celulas/mL)
0	1,50	3,8
6	3,96	6,87
12	7,13	16,09
18	18,97	25,67
24*	48,87*	36,87
30	39,01	35,09
36	20,23	35,09
42	17,56	35,09
48	13,00	35,09

Fuente: Autor.

Gráfico 1. Gráfico de la curva de crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* en el medio D



Tiempo de generación de la bacteria (*Butyrivibrio fibrisolvens*):  $g = 5$  horas.  
 $(g = t/n; N = No2^n)$ . Calculada según Brock, 1997).

Para evaluar las interacciones en co-cultivo “*In vitro*”, se utilizaron microorganismos que fueron primero conservados en medio de guayaba y luego pasados al medio tradicional C, (medio tradicional preparado para comparar la biomasa), esto se realizó porque así los microorganismos estaban más adaptados al medio en donde se evaluó el efecto de co-cultivo (medio D), pues los medios C y D son semejantes (ambos tienen contenido ruminal); si se hubiera utilizado los microbios conservados en el medio de guayaba directamente sobre el medio D, se estaría adicionando guayaba al ecosistema ruminal y aunque fueran en pequeñas cantidades podrían variar los resultados, debido a que el rumiante no consume guayaba agria en forma natural.

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos en la producción de los ácidos acético, butírico y propiónico y, la variación del pH, en el medio de cultivo D (forraje al 0,5 % y contenido ruminal al 40 % v/v) sin y con *Butyrivibrio fibrisolvens* a una concentración de  $0,7 \times 10^8$  cel (0,2 ml) y luego de un tiempo de incubación

de 24 horas a las condiciones de temperatura, pH y anoxigenia. Los ensayos se realizaron por triplicado y aunque en los sistemas biológicos existen diferentes factores que influyen como son la temperatura, el pH, etc, los resultados son reproducibles pero no serán siempre iguales; los resultados que se consignan en la Tabla 13 corresponden a los valores promedios.

La bacteria celulolítica, *Butyrivibrio fibrisolvens*, no produce ácido propiónico, (Tabla 1), sin embargo se realizó la determinación de éste ácido, como dato adicional, teniendo en cuenta que los tres ácidos (acético, butírico y propiónico) conforman el grupo de los llamados Ácidos Grasos Volátiles y se encuentran en mayor concentración en el rumen; aproximadamente el 90-95 % del total de los ácidos producidos.

Tabla 13. Producción de ácidos acético, butírico y propiónico sin y con *Butyrivibrio fibrisolvens* (valores promedio).

Muestra	(A)mM	Var.(mM)	(B)mM	Var. (mM)	( P) mM	Var. (mM)	pH
Medio (D) solo sin microorganismo	30,1		1,0		1,5		6,40
Medio con <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	39,9	+9,8	1,4	+0,4	1,5	---0---	6,48

**(A)mM** = Concentración de ácido acético en miliMolar

**(B)mM** = Concentración de ácido butírico en miliMolar.

**(P) mM** = Concentración de ácido propiónico

**Var.** = Variación: + = variación en aumento, - = variación en disminución

**pH** = potencial de Hidrógeno

En la Tabla 13 se observa que el medio de cultivo D, tiene una concentración de ácido acético de 30,1 mM, de ácido butírico de 1,0 mM, de ácido propiónico de 1,5 mM y su pH = 6,40. La adición de *Butyrivibrio fibrisolvens* al medio D produjo un incremento en la producción de los ácidos, acético (39,9 mM) y butírico (1,4 mM), mientras que la concentración del ácido propiónico se mantuvo constante como era de esperarse, debido a que la bacteria en estudio no lo produce (Anexo F. Cromatograma 2); no se observó variación significativa con respecto al valor

del pH. Estos resultados demuestran la habilidad que posee la bacteria celulolítica para la conversión del forraje existente en el medio de cultivo D hacia la producción de los ácidos: acético, Var= + 9,8mM (39,9-30,1) y butírico, Var =+ 0,4mM (1,4-1,0), es decir el microorganismo produjo un aumento de 9,8 mM de ácido acético y 0,4 mM de ácido butírico. La respuesta obtenida se debe a que *Butyrivibrio fibrisolvens* es un importante microorganismo que degrada una amplia variedad de sustratos presentes en los forrajes como celulosa, hemicelulosa, xilano y otros, produciendo acetato y butirato como lo confirman los trabajos de Hespell (1987), Marouner (1994) y Cotta (1995). A partir del material fibroso y demás componentes existentes en el forraje utilizado en el medio, es que la bacteria celulolítica produce los ácido acético y butírico, (Dehority, 1962; Dehority, 1967; Dehority, 1991). Los microorganismos ruminales son exclusivos en la degradación y utilización del sustrato y sus enzimas actúan de manera selectiva.

La Tabla 14 expresa los resultados obtenidos a cerca de la variación del pH y la producción de los ácidos acético, butírico y propiónico, cuando 0,2 ml ( $0,7 \times 10^8$  cel) de *Butyrivibrio fibrisolvens* (concentración de  $3,8 \times 10^8$  cel / ml), interactuó en co-cultivo con los diferentes microorganismos aislados en una relación de concentración 1:3 y 1:1 de células viables, en el medio de cultivo D.

Las columnas (A)mM, (B)mM y P(mM), corresponden a la cantidad de ácido acético, butírico y propiónico, respectivamente, producidos en miliMolar ( mM) en cada una de las combinaciones microbianas. La palabra, **Var**, que aparece al lado de la columnas (A)mM, (B)mM y P(mM), corresponde a la diferencia en miliMolar, entre la cantidad de ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico, existentes en el medio D, cuando esta presente *Butyrivibrio fibrisolvens* (Tabla 13, columna 2) y la cantidad producida de los mismos ácidos en co-cultivo con los microorganismos aislados, (Tabla 14). La variación, (**Var**), en algunos casos fue positiva indicando un aumento en la producción de los ácidos, en otras se mantuvo constantes (--0--) y en otros casos fue negativa indicando disminución.

A manera de ejemplo se observa que la cantidad de ácido acético, (A)mM, producido por la combinación entre la levadura cepa 18 y *Butyrivibrio fibrisolvens* en el medio D, es de 30,8 mM, ( Tabla 14 : relación microbiana 1:3 ) y la cantidad de ácido acético producido por la bacteria celulolítica sola en el medio es de 39,9 mM (Tabla 13); entonces la variación es:  $39,9 - 30,8 = -9,1$  mM ( **Var** = -9,1), lo que indica una disminución en la producción del ácido.

Tabla 14. Determinación del pH y de los ácidos Acético y Butírico en Co-cultivo.

Microbios Bf +Mos aislados	Relación microbiana 1:3							Relación microbiana 1:1						
	(A)mM	Var.	(B)mM	Var.	(P)mM	Var.	pH	(A)mM	Var.	(B)mM	Var.	(P)mM	Var.	pH
<b>Levaduras</b>														
18	30,8	-9,1	1,2	-0,2	1,3	-0,2	6,48	53,1*	13,2	1,7 *	0,3	1,4	-0,1	6,45
19	28,4	-11,5	1,3	-0,1	1,6	0,1	7,6 *	24,5	-15,4	1	-0,4	1,9	0,4	7,04
20	28,7	-11,2	1	-0,4	1,4	-0,1	6,58	31,1	-8,8	1,2	-0,2	1,7	0,2	6,72
21	2,8	-17,1	0,9	-0,5	1,9	0,4	7	35,9	-4	0,9	-0,4	1,6	0,1	6,69
<b>Cocos</b>														
15	28,2	-11,7	1	-0,4	1,5	0-	6,36	31,8	-8,1	1,2	-0,4	1,5	-0,1	6,7
16	13	-26,9	1	-0,4	1,8	0,3	6,73	10,3	-29,5	0,9	-0,5	1,3	-0,2	6,73
17	11	-28,9	1,3	-0,1	1,8	0,3	6,74	11,4	-28,5	0,9	-0,5	1,2	-0,3	6,73
<b>Bacilos</b>														
1	28,7	-13,9	1,7	0,3	1,5	0	7,4*	26	-13,9	1,2	-0,2	1,5	0	6,5
2	9	-29,3	1,2	-0,2	1,7	0,2	6,67	10,6	-29,3	1,2	-0,2	1,5	0	6,67
3	32,3	-7	1,2	-0,2	1,4	-0,1	6,72	35,6	-4,3	1,2	-0,2	1,9	0,4	6,99
4	34,5	-5,4	1,2	-0,2	1,5	0	6,66	12,9	-27	1	-0,4	1,7	0,2	6,66
5	12,2	-26	1	-0,4	1,9	0,4	6,62	10,3	-29,9	0,9	-0,5	1,9	0,4	6,64
6	13,3	-26,6	1	-0,4	1,5	0	6,68	16,4	-23,5	1,8 *	0,4	1,5	0	6,68
7	39,9	0	1,4	-0-	1,5	0	6,5	23	-19,9	1,7 *	0,3	1,5	0	6,46
8	12,1	-27,8	1	-0,4	1,7	0,2	7,16	14,9	-25	1	-0,4	1,8	0,3	6,91
9	28,1	-11,8	1,1	0,3	1,3	-0,2	7,07	24,4	-15,5	1	-0,4	1,6	0,1	7,16
10	31,9	-8	1,2	-0,4	1,5	0	7,02	27,3	-12,6	1,1	-0,3	1,6	0,1	7,16
11	3,5	-7,4	1,3	-0,4	1,2	-0,3	7,03	26,5	-13,4	1,4	-0-	1,5	0	6,75
12	23	-16,8	1,4	-0-	0,9	-0,6	7,16	18,4	-21,5	1,4	-0-	1,6	0,1	7
13	15,7	-24,2	1	10,4	1	-0,5	6,7	10,5	-29,4	1,3	-0,1	1,2	-0,3	6,5
<b>AO</b>														
14	25,3	-14,6	1	-0,4	1,4	-0,1	6,77	23,9	-16	1,1	-0,3	1,5	0	6,8

**Ao** = *Aspergillus oryzae* (Cepa 14)

**Bf + microorganismos aislados** = *Butyrivibrio fibrisolvens* en interacción con cada uno de los microorganismos aislados.

**Los números representan las diferentes cepas aisladas: cepa 18,19, etc**

**Var** = variación en miliMolar

## **Efecto de *Butyrivibrio fibrisolvens* con los microbios ruminales y del estiércol**

Los resultados de la interacción en co-cultivo “*In vitro*” de *Butyrivibrio fibrisolvens* con los microorganismos aislados del rumen y del estiércol: bacilos, cocos y levaduras, y resumidos en la Tabla 14, muestran tanto efectos positivos como efectos negativos.

Como efectos positivos se observó que la interacción de la bacteria celulolítica con la levadura cepa 18, (Figura 32, Anexo D), aislada del estiércol e identificada como *Debaryomyces hansenii* (ZopF), (Anexos D), mostró un incremento en la producción de los ácidos: acético en un valor de 13,2 mM (Var = + 13,2) y del butírico en un valor de 0,3 mM, (Var = + 0,3), para una relación de concentración de células viable de 1:1 y el valor del pH no experimentó cambios. (Cromatograma No 3, Anexo F).

Efectos semejantes se detectaron en la producción del ácido butírico cuando *Butyrivibrio fibrisolvens* interactuó con los bacilos: cepa 1 (Var = + 0,3 mM) en una relación 1:3; cepa 6 (Var = + 0,4 mM) (*Clostridium pasteurianum*), en una relación microbiana 1:1 y cepa 7 (Var = + 0,3 mM) (bacterias tipo *Clostridium spp*) en una relación microbiana 1: 1. Es importante adicionar, que para esta última combinación, no se encontró variación en la producción del ácido acético para una relación microbiana de 1:3, (Var = 0,0 mM), sin embargo es posible que muestre un efecto positivo en la producción de dicho ácido a una relación microbiana mayor.

Con respecto a la producción del ácido propiónico se observó la mayor cantidad de efectos positivos con ligeros aumentos, destacándose las cepas 19 (var=0,4), 5 (var=0,4) y 3(var= 0,4) a una relación microbiana de 1:1 y las cepas 21(var=0,4) y 5 ( var=0,4) a una relación microbiana de 1:3.

La mayoría de efectos positivos observados entre los microorganismos ruminales han sido clasificados como Sinergismos. El término Sinergismo entre microorganismos se ha definido como incremento en la actividad conjunta, (como efecto aditivo), de dos o mas cepas, actuando en una misma fermentación, que supera la actividad individual, es decir el trabajo de los microorganismos solos<sup>87</sup>.

Aunque algunas especies microbianas ruminales tienen la capacidad de producir enzimas con múltiples actividades que les permite hidrolizar ciertos componentes de la pared celular vegetal, la degradación o fermentación completa de estos polímeros complejos requiere de una amplia gama de enzimas hidrolíticas que pueden actuar simultáneamente y que se obtienen a través de la interacción conjunta de las diferentes especies que habitan en el rumen.

Dentro de los microorganismos estudiados y que mostraron efectos positivos, es decir posibles sinergismos en combinación con *Butyrivibrio fibrisolvens*, la levadura cepa 18, *Debaryomyces hansenii* (ZopF), se destacó por que su interacción con la bacteria celulolítica incrementó tanto la producción del ácido acético como la del ácido butírico; objetivo principal del presente trabajo de investigación.

La existencia del tal efecto sinérgico fué comprobado al determinar la producción de los ácidos acético, butírico y propiónico utilizando la levadura solamente; los resultados fueron: ácido acético= 28,5 mM (var = -1,6); ácido butírico =0,9, mM (var = -.0,1) y ácido propiónico = 1,0 mM(var = -0,5) en comparación con el medio D solo, es decir en ausencia de *Butyrivibrio fibrisolvens*. (Cromatograma No 1, Anexo F). Este ensayo fue realizado por triplicado.

El efecto sinérgico hallado en la presente investigación entre *Butyrivibrio fibrisolvens* y la levadura de origen ruminal: *Debaryomyces hansenii* (ZopF), logró

---

<sup>87</sup> Dehority, 1998

un mejoramiento en el aprovechamiento y conversión de los forrajes tropicales caracterizado por su baja calidad, permitiendo un incremento en la producción de los ácidos acético (13,2 Mm) y butírico (0,3 mM) como reflejo de una mayor fermentación de los carbohidratos estructurales (material fibroso).

Los mecanismos de acción por medio de los cuales las levaduras pueden actuar con las bacterias celulolíticas y propiciar efectos sinérgicos son desconocidos. Sin embargo la existencia del efecto puede tener fundamentación en las siguientes consideraciones:

-Es posible un aumento en la síntesis de grandes cantidades de enzimas por parte de la bacteria celulolítica estimulados por la presencia de la levadura. También las levaduras pueden contribuir enzimáticamente al rompimiento de enlaces para remover componentes que limitan el acceso a la bacteria al sustrato facilitando su utilización.

-La levadura puede lograr, que la bacteria tenga una mayor afinidad por el sustrato al servir de puente entre el forraje y *Butyrivibrio fibrisolvens*, permitiendo una mayor colonización y una mayor utilización por parte del microorganismo celulolítico.

-Algunas interacciones entre microbios puede ser como una cadena donde los productos de unos son sustratos de otros es decir un tipo de interacción sinérgica de alimentación cruzada.

-Es posible que el efecto estimulador de la levadura se deba a que proporcione factores de crecimiento como ácidos orgánicos, vitaminas, pequeños péptidos que sean requeridos por la bacteria permitiendo que haya un mayor número o mayor actividad de *Butyrivibrio fibrisolvens* sobre el sustrato. La posible proliferación de la bacteria celulolítica ocasionada por la levadura permite un aumento en la degradabilidad de la fibra.

La importancia de las levaduras en el rumen ha sido comprobada debido a que ha demostrado tener un impacto significativo en el mejoramiento de los procesos fermentativos, (Wiedmeier, 1987; Harrison *et al*, 1988; Dawson, 1990); sus modos de acción incluyen la estimulación a las bacterias que degradan celulosa proporcionando factores de crecimiento como cadenas cortas de péptidos, vitaminas, compuestos lipídicos, necesarios para su desarrollo y actividad, (Wiedmeier, 1987; Arambel, 1987; Doreau, 1998).

Las investigaciones llevadas a cabo por Wiedmeier, (1987), Wohlt *et al*, (1991) y Piva, (1993), sobre efectos de co-cultivo entre levaduras del tipo *Saccharomyces spp* y bacterias celulolíticas, actuando sobre la degradación de material fibroso muestran un incremento en el número de algunas bacterias celulolíticas, como *Fibrobacter succinogenes*, lo que permite un aumento en la actividad degradativa sobre el sustrato. Sin embargo, los mecanismos de acción sobre los cuales las levaduras son capaces de estimular algunos microorganismos del ecosistema ruminal son motivo de investigación en la actualidad.

La literatura consultada no reporta resultados sobre interacciones en co-cultivo de *Butyrivibrio fibrisolvens* con los microorganismos ruminales y del estiércol hacia la producción de los ácidos acético y butírico. No hay reporte tampoco de estudios sobre interacciones de este microbio con levaduras.

Aunque debe comprobarse, es probable que el efecto positivo de la levadura sobre la bacteria celulolítica se deba al aporte de factores estimulantes del crecimiento que permiten un incremento en el número de células; esto a nivel de rumen traerá como consecuencia una mayor actividad en la fermentación y degradación de los forrajes. También es posible que el efecto estimulador sea extendible a otras poblaciones celulolíticas incrementando aun más la acción degradativa sobre el sustrato dentro del ecosistema ruminal. Se supone que debe

existir un efecto potencializador de la levadura hacia la bacteria celulolítica y aunque no se comprobó ningún mecanismo posible de acción si se observó que la combinación de las capacidades metabólicas de los dos microorganismos logró una mayor conversión del forraje demostrando el efecto sinérgico.

La producción de los ácidos grasos volátiles, (AGV), en el rumen dependen de la fermentación de los carbohidratos estructurales, (pared celular vegetal) y, de los carbohidratos no estructurales, (presentes en el contenido celular), existentes en el alimento. Si hay mayor producción de AGV hay mayor fermentación o degradación de los carbohidratos.(Dehority, 1997; Dehority, 1998). Para dietas ricas en fibra, (forraje utilizado en la presente investigación), el ácido acético es el de mayor producción y para dietas ricas en cereales el ácido propiónico tiene un valor importante. El incremento mostrado en la Tabla 14, en la producción de los ácidos acético y butírico y realizado sobre forrajes intactos ricos en fibra, señala un aumento en la fermentación del material fibroso. En el trópico, estos resultados indican un acontecimiento favorable desde el punto de vista de mayor energía disponible para el animal a partir de forrajes de baja calidad porque estos compuestos están implicados en la generación de energía y, de precursores de grasa corporal y de la leche. Aunque en la presente investigación no se determinó la degradación química de los forrajes una mayor producción de estos ácidos implica mayor fermentación microbiana de carbohidratos estructurales (fibra) es decir mayor fermentación hacia productos útiles para el animal.

El aumento en la cantidad de los ácidos acético y butírico producidos permite una disminución de la producción del ácido propiónico en el rumen; este hecho fue observado “*In vitro*” para la interacción microbiana que presentó los mejores resultados de sinergismo en la producción de los ácidos acético y butírico (Tabla 14, levadura cepa 18: *Debaryomyces hansenii* (ZopF), y *Butyrivibrio fibrisolvens*); se observó que la producción del ácido propiónico para la anterior combinación disminuyó levemente (1,5 →1,4 mM).

El ácido propiónico es generado en gran cantidad en dietas a base de cereales y no de forrajes de mala calidad como el utilizado en la investigación. Un incremento en la producción de este ácido trae como consecuencia una reducción en la producción de ácido acético incrementado la relación acetato/propionato; cuando este incremento es muy elevado se favorece la producción del ácido láctico en el rumen y éste ácido producido en exceso conduce a una condición indeseable para el animal conocida como acidosis láctica.

En la Tabla 14 se muestra también que la mayoría de las combinaciones bacterianas redujeron la habilidad de *Butyrivibrio fibrisolvens* sobre el forraje en la producción de los ácidos acético y butírico.

Las mayores variaciones negativas se presentaron con el ácido acético y no con el ácido butírico o propiónico. Como posibles razones para tal efecto pueden considerarse: a) Muchos microorganismos ruminales necesitan de ácido acético como factor de crecimiento y se desconoce el uso de ácido butírico y propiónico por las especies ruminales (Russell,1990; Cadlwell,1966; Diez *et al*,1999); b) Inhibición del crecimiento y de la actividad de las especies microbianas por competencia por el sustrato. Las competencias entre microorganismos que actúan sobre el mismo sustrato puede permitir mayor velocidad de colonización, capacidad de adherencia y afinidad por el sustrato.(Dehority, 1998); c) Producción de bactericinas o inhibidores de crecimiento por alguna de las dos poblaciones microbianas, (Bernalier *et al*,1993). Existe evidencia de la producción de estas sustancias o antibióticos por algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*<sup>88</sup>.

#### **-Efecto de *Butyrivibrio fibrisolvens* con *Aspergillus oryzae*.**

En la presente investigación el hongo no ruminal autóctono, *Aspergillus oryzae*, (cepa 14. Figura 29-30. Anexo B), no presentó efectos positivos en co-cultivo con

---

<sup>88</sup> Odenyo, 1994; Kalmokoff, 1997; Kalmokoff *et al*, 1999; Kalmokoff, 2000.

*Butyrivibrio fibrisolvens* hacia la producción de los ácidos acético y butírico como se observa en la Tabla 14.

En nutrición animal se han utilizado el hongo *Aspergillus oryzae* como suplemento alimenticio y debido a sus respuestas benéficas (ej, aumento en la producción lechera), se le ha reconocido como Probiótico. Dentro de los efectos mostrados de estudios “*In vitro*” se ha encontrado mejoramiento de la degradación de la fibra aumentando la producción de los ácidos grasos volátiles según los trabajos de Van Soest, (1987) y Fondevila *et al*, (1990). También se ha encontrado que la interacción en co-cultivo, del hongo con cepas celulolíticas: *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*, produjo un aumento en el número de estas, según las observaciones de Varel *et al*, 1993 y Beharka *et al*, 1998.

En los anteriores trabajos no se reporta haberse evaluado la producción de los ácidos acético y butírico cuando interactúa el hongo *Aspergillus oryzae* (cepa adquirida de colección) con *Butyrivibrio fibrisolvens*, solo se dice que no hubo efecto positivo en el aumento del número de microorganismos y más bien disminuyó. Estos resultados permiten suponer una reducción en la producción de los ácidos acético y butírico; dato que concuerda con los hallados en la presente investigación sobre la interacción en co-cultivo entre la bacteria y el hongo.

La disminución en la producción de los ácidos posiblemente se debe a que esta cepa de *Aspergillus oryzae*, (autóctona) aislada del arroz, inhiba el crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens*, ya sea porque compite por el sustrato o produce sustancias que limitan la actividad de la bacteria; es conocido que algunas especies del hongo no ruminal produce sustancias con un amplio rango de actividad antibacteriana e inhibe el crecimiento y desarrollo de ciertas bacterias (Beharka, 1998). La anterior observación sugiere que no todas las cepas actúan de igual forma y es posible que algunas variedades y no todas realmente demuestren respuestas favorables, lo que explica el por qué existe disparidad en

los resultados de investigación con este hongo, por que aunque es reconocido Probiótico y es utilizado actualmente, existe información sobre estudios en los cuales no se observa efecto alguno con la adición de *Aspergillus oryzae* a la alimentación de rumiantes<sup>89</sup>.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación se afirma que el hongo nativo, (no adquirido de colección), no produjo efectos sinérgicos con la bacteria celulolítica, *Butyrivibrio fibrisolvens*, en la producción de los ácidos acético y butírico.

#### **-Efecto de las combinaciones microbianas sobre el pH en el medio.**

La viabilidad de los microorganismos del rumen depende en buen grado de la acidez presente en el medio; algunas especies como las celulolíticas pueden verse afectada severamente en su actividad en condiciones de pH inferior a 6.

El valor del pH ruminal depende de la dieta que consume el animal y corresponde al balance que se establece entre la cantidad de los ácidos grasos volátiles producidos y la cantidad de carbonatos, bicarbonatos y fosfatos presentes en la saliva. Para animales alimentados con forrajes este parámetro oscila entre 6,2-7,2 (Leedle, 1982; Maynard, 1982). El pH encontrado en el contenido ruminal utilizado en la presente investigación tuvo un valor de 7,14 el cual se bajó a un valor de 6,3.

En la Tabla 14 se observa que para casi la totalidad de las interacciones microbianas evaluados, el valor del pH se mantuvo sin variaciones significativas a excepción del incremento producido por las cepas 19 (pH = 7,6) y cepa 1 (pH = 7,4) que se salen del rango encontrado en el rumen, (pH = 7,14). Es posible que estas combinaciones de microorganismos generen gran cantidad de otras

---

<sup>89</sup> Bertrand, 1997

sustancias no evaluados en la presente investigación y/o que la relación microbiana sea muy alta de tal forma que permitan un incremento en el valor.

#### **-Análisis estadístico del efecto en Co-cultivo**

Aplicando el modelo de Análisis de varianza, ANOVA y regresión múltiple, ( según Durbin-Watson), el cual dice que para un valor de  $P \geq 0,10$ , no hay diferencia estadísticamente significativa entre las variables, (con un nivel de confiabilidad del 90% o mucho mayor), se encuentra que no hubo incidencia significativa en la producción de los ácidos acético y butírico con respecto a la relación de microorganismos: 1:1 y 1:3 (ver Anexo E , c); Se tuvo en cuenta la columna, **var**, (variación), de la Tabla 14 que indica la diferencia en mM entre la producción de los ácidos del co-cultivo y la producción de los ácidos por *Butyrivibrio fibrisolvens* solo sin co-cultivo. Tampoco se observó diferencias con respecto a la variación en la producción del ácido butírico ( $P=0,8091$ ). (Ver Anexo F, c) Análisis del efecto sinérgico)

Si hubo incidencia con respecto la producción del ácidos acético ( $P=0,0905$ ) (ver Anexo F, c) Análisis del efecto sinérgico)

Los datos concuerdan con el hecho de que algunas especies microbianas ruminales utilizan ácido acético como factor de crecimiento y por esa razón las mayores variaciones se presentaron con respecto a ese ácido. No se conoce el uso de ácido butírico como factor de crecimiento.

Los resultados de la presente investigación, “*In vitro*”, en la cual se evaluaron microorganismos ruminales, de origen ruminal (estiércol) y el hongo no ruminal *Aspergillus oryzae* para encontrar cepas capaces de potenciar la actividad de *Butyrivibrio fibrisolvens* actuando sobre forrajes intactos, hacia la producción de los ácidos acético y butírico, revelaron que la interacción en co-cultivo con la levadura aislada del estiércol: *Debaryomyces hansenii* (*ZopF*) produjo un efecto

sinérgico que incrementó la producción de estos ácidos en un valor de 13,2 mM para el ácido acético y 0,3 mM para el ácido butírico en comparación con la producción de los mismos ácidos utilizando los microorganismos solos, (resultado no reportado por la literatura, constituyéndose en un importante aporte nuevo). Estos resultados permiten comprobar la hipótesis propuesta.

En las zonas tropicales el estudio y profundización sobre la biodiversidad microbiana ruminal y sus interacciones, es un hecho importante para generar, a través de los resultados, productos, (Probióticos), que puedan lograr un mayor aprovechamiento de los recursos fibrosos presentes en las dietas. Estas estrategias de manipulación ruminal basadas en la capacidad de los microorganismos ofrecen un potencial para la alimentación y producción animal.

El hallazgo del efecto sinérgico permite proponer a la levadura: *Debaryomyces hansenii* (ZopF) como un microorganismo con potencial Probiótico, para mejorar la fermentación ruminal en ganado vacuno alimentado con forrajes de bajas calidad, debido a su efecto estimulador sobre la habilidad de *Butyrivibrio fibrisolvens*, importante bacteria celulolítica en el ecosistema ruminal, en la producción de los ácidos útiles para el rumiante por ser la principal fuente de energía y precursores de síntesis de la grasa.

Se sugiere que el uso de la levadura, *Debaryomyces hansenii* (ZopF), como aditivo para alimentación de rumiantes, (Probiótico), puede constituir una alternativa viable, segura y a bajo costo, para un mayor aprovechamiento y degradación de los pastos ricos en fibras, propios de las zonas tropicales, permitiendo ganancia en peso para el animal y mejores rendimientos productivos, contribuyendo de esta forma a dar solución a un problema del sector ganadero de Colombia.

Las investigaciones en el campo de los Probióticos ha demostrado que la adición de una o varias especies microbianas a la dieta animal, provocan efectos beneficiosos en los mismos mediante modificaciones en la población microbiana de su tracto digestivo. Numerosos estudios han demostrado que la adición de levaduras en la alimentación de rumiantes ha mejorado la producción de leche y la ganancia diaria de peso.

## 6. CONCLUSIONES

-El jugo de guayaba agria al 25% p/v, (medio B) utilizado como medio de cultivo para el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos aislados del rumen y del estiércol vacuno, demostró que puede ser un medio modificado apropiado para el desarrollo de esta clase de microbiota excluyéndose a las especies estrictamente celulolíticas que requieren de celobiosa como fuente apropiada de energía y algunos factores de crecimiento especiales.

-Las levaduras, cocos y bacilos de diferentes morfologías aisladas en la presente investigación mostraron un buen desarrollo en cuanto a crecimiento y cantidad, lo que permitió suponer que el nuevo medio de cultivo si aporta, los valores nutricionales requeridos por esas poblaciones microbianas, como se pudo demostrar según los resultados del análisis químico efectuado al medio de cultivo B y su comparación con los nutrientes existentes en los medios tradicionales utilizando contenido ruminal clarificado.

-El crecimiento de los microorganismos en el medio B, fue el adecuado para los estudios de aislamiento, identificación y mantenimiento.

-El análisis estadístico realizado, Análisis de varianza ANOVA y regresión múltiple, (según Durbin-Watson), para comparar la incidencia del medio de Guayaba agria y de un medio tradicional modificado utilizando contenido ruminal clarificado, sobre el crecimiento de la población microbiana aislada, revela que no hay diferencia significativa entre el crecimiento y los medios de cultivo con una confiabilidad del 90% o mayor; en consecuencia, la composición de los medios es semejante y las poblaciones crecen y se multilican sin dificultad.

-Se propone el medio de guayaba agria como un nuevo medio alterno y adecuado para aislar y mantener microorganismos ruminales y de origen ruminal, sin necesidad de adicionar otros ingredientes químicos, salvo la adición de bicarbonato de sodio para ajustar el pH=6,3, lo cual constituye una alternativa a bajo costo.

-Es el primer medio de cultivo que se publica, totalmente diferente a los medios de cultivo tradicionales utilizados para el aislamiento, desarrollo y mantenimiento de microorganismo ruminales y del estiércol.

-El estudio de las interacciones en co-cultivo, "In vitro", de *Butyrivibrio fibrisolvens* frente a bacilos, cocos, levaduras ruminales y del estiércol y al hongo no ruminal *Aspergillus oryzae*, permitieron establecer que combinaciones contribuyen a mejorar la degradación de los forrajes intactos hacia la producción de los ácidos acético y butírico, permitiendo un mayor aprovechamiento del material fibroso presente en la dieta animal.

-Los resultados de la investigación confirmaron la hipótesis planteada: dentro de los microorganismos encontrados en el rumen y en el estiércol, existen especies como la levadura aislada del estiércol: *Debaryomyces hansenii* (ZopF) capaz de potenciar la actividad de la bacteria celulolítica sobre los pastos de baja calidad (ricos en fibra), mediante un efecto sinérgico que se reflejó con el aumento en la producción de los ácidos: acético (13,2 mM) y butírico (1,7 mM).

-Se propone a la levadura *Debaryomyces hansenii* (ZopF), como un microorganismo con características Probióticas para mejorar la fermentación ruminal en ganado vacuno, porque logró un efecto estimulador sobre la actividad de *Butyrivibrio fibrisolvens* reflejada en el aumento en la producción de los compuestos útiles para el rumiante como fuente principal de energía.

-La cepa *Aspergillus oryzae*, (autóctona), no demostró tener efectos importantes en interacción en co-cultivo con la bacteria celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens*. El hongo nativo puede limitar la actividad de la bacteria sobre la degradación del forraje intacto, mediante la producción de sustancias antibacterianas.

-Los resultados obtenidos aplicando el modelo estadístico, Análisis de varianza ANOVA y regresión múltiple, (según Durbin-Watson), al efecto co-cultivo entre *Butyrivibrio fibrisolvens* y los microorganismos aislados, demostraron que no existe incidencia significativa en la producción de los ácidos acético y butírico con respecto a las relaciones microbianas. 1:1 y 1:3.

-El análisis estadístico demuestra una incidencia significativa con respecto a la variación en la producción del ácido acético y no del butírico. Resultado que se debe posiblemente a que muchos microorganismos ruminales requieren del ácido acético como factor de crecimiento; no se encuentra información acerca del uso de ácido butírico en la literatura consultada.

-Durante la evaluación del efecto en co-cultivo, no se observó en forma significativa aumento en el valor del pH. Se mantuvo estable.

-Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación contribuyen al conocimiento de nuevas cepas nativas que pueden constituir un potencial en el mejoramiento de la fermentación ruminal postulándose como candidato a Prebiótico y contribuir a dar solución a un problema del sector ganadero de Colombia, mejorando la nutrición y producción de animales alimentados con forrajes de baja calidad propios de los trópicos de nuestro país.

## 7. RECOMENDACIONES

-Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación se sugiere un ensayo “*in vivo*” utilizando la levadura *Debaryomyces hansenii* (ZopF), como aditivo en la alimentación para rumiantes y probar el posible efecto benéfico como **Probiótico**. Para la experimentación pueden emplearse lotes de control y de animales de 2 y 8 meses de edad, administrando la levadura durante 4 meses.

-Se recomienda evaluar las posibles estrategias de acción de las levaduras sobre el microorganismo celulolítico a fin de establecer el origen del efecto estimulador.

-Se requiere determinar las curvas de crecimiento de los microorganismos aislados en el medio de cultivo modificado obtenido a partir del jugo de guayaba agria (*Psidium araca*) al 25 % p/v y hacer comparaciones con las curvas de crecimiento determinadas en el medio tradicional empleando contenido ruminal clarificado, para confirmar las bondades y ventajas del nuevo medio de cultivo.

-Es importante evaluar la viabilidad del crecimiento microbiano en medios de cultivo que contengan ácidos, butírico y propiónico, para conocer si realmente estos ácidos son requeridos como factores de crecimiento por las diferentes poblaciones ruminales.

## BIBLIOGRAFÍA

AKIN, D. E; GORDON, G. L. R. and HOGAN, J. P., "Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. Appl. Environ. Microbiol, 1983. p. 46-738.

AKIN D. E. "Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi ", Appl. Environ. Microbiol, 1988. p. 54-1117.

AKIN D. E.. "Role of Rumen Fungi in fiber Degradation", J Dairy Sci, 1990. p. 73-3023.

-ALM. L. "Lactic acid bacteria as Probiotic for prevention and cure of gastrointestinal Diseases in man and animals", Dr Med. Sci, Institute Stockholm, Sweden, 94 / paper-49 hm. 2000.

AMOS, H. E. "Rumen protozoal degradation of structurally intact forage tissues", Appl. Environ. Microbiol, 1978. p. 36-513.

ARAMBEL, M. J.; D. Wiedmeier, and J. I. Walters. "Influence of donor adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extract on in vitro rumen fermentation", Nutr. Rep. Int, 1987. p. 35-433.

BABRA A. "Probióticos", Miembro de las comisiones de Investigaciones Ornitológicas de la C.O.M., Revista Ornitológica, Pájaros, España. 1997

BAUCHOP T, and D.O. Mountford. "Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep"; Appl. Environ. Microbiol, 1979. p. 38-457.

BADUI, S. "Química de los alimentos", Alhambra Mexicana, México, 1996. p. 65.

BAUCHOP, T, et al. "Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogenic", Appl. Enviroment. Microbiol, 1981. p. 42-1103.

BECHMAN, T. J, J V, Chamber, and M .D Cunningham. "Influence of *Lactobacillus acidophilus* on the performance of young calves, J, Dairy Sci, 61 (Suppl 1):14 (Abstr). 1977.

BEHARKA, A.A. "Performance and Ruminal Function Development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract", J Dairy Sci, 1991. p. 74-4326.

\_\_\_\_\_. "Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria", J Dairy Sci, 1998. p. 81-1591.

BERNAL, I. "Análisis de Alimentos" Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Colombia. Santa Fé de Bogotá, Colombia, 1994.

BERNALIER *et al.* "Degradation and fermentation of cellulosa by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria". Curr. Microbiol, 1992. p. 25-143.

\_\_\_\_\_. "Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*". J. Gen. Microbiol, 1993. p. 139-873.

BERTRAND, J. A., and L. W. Grimes. "Influence of tallow and *Aspergillus oryzae* fermentation extract in dairy cattle rations". J. Dairy Sci. 1997. p. 80-1179-1184.

BHAT S. "Adhesion of cellulolytic Ruminant Bacteria to Barley Straw", Appl. Environ. Microbiol, 1990. p. 56-2698.

BROCA. "Biología de los Microorganismos" Editorial: PRENTICE HALL, Madrid, Paris, 1997.

BROOKER, J. D. and D. K. Lum. "Rumen Microorganisms as providers of high quality protein", Livestock Res. for Rural Develop, 1995. p. 6(3):10

BRYANT, M. P. and I. M. Robison. "Some nutritional characteristics of predominant ruminal bacteria", J. Bacteriology, 1962. p. 4-605.

\_\_\_\_\_. "Bacterial species of the rumen"; Bacteriol Rev., 1972. p. 23-125.

BERGEY'S. "Manual of Determinative Bacteriology". 9th Edition. Edited by John G. Holt Copyright Williams & Wilkins, Baltimore ISBN 0-683-00603-7. New York; EE. UU., 1994.

CALDWELL D. and M.P. Bryant. "Medium without Rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria", Applied Microbiology, 1966. p. 14-794.

CALLAWAY, E.S. "Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose", J. Dairy Sci, 1997. p. 80-2035.

CARULLA J. "De la Proteína a la Proteína en la leche. Metabolismo del Nitrógeno del Forraje en la vaca lechera", Nov 4-5, Universidad Nacional de Colombia. Santa Fé de Bogotá-Colombia, 1999.

CATHY J., Salf-Coste. "Microflora Gastrointestinal y las Leches fermentadas", 1997. En: [http://www.danonevitapole.com/nutri\\_views/newsletter/eng/news\\_14/sum.html](http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news_14/sum.html) (1 sur 2)

CHALELA, G. " Manual de Laboratorio de Microbiología", Facultad de Estudios a Distancia FEDI, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 1994.

CICHOKE, A. "Probiotics Balance Digestion and improve overall Health", Lifelone, Good Health .Keats publishing. Nutrition Science news, 1994. p. 2-380.

CLARK, J. "Current Knowledge of Protein and Carbohydrates Metabolism in the rumen", Feeding and Nutrition. 1993.

COEN, J. A. and B. A., Dehority. "Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria", Appl. Microbiol, 1970. p. 20-362.

COTTA, M. A. "Degradation and utilization of Xylan by the Ruminant Bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium* ", Appl. Environ. Microbiol, 1995. p. 61-4396.

CRUYWAGEN, C.W., A. Jordaan, and L. Venter. "Effect of *Lactobacillus acidophilus* Supplementation of Milk Replacer on Preweaning Performance of Calves", J Dairy Sci, 1996. p. 79-483.

DAWSON, K..A. "Effect of Microbial Supplement containing yeast and lactobacilli on Roughage-fed ruminal microbial activities", J. Anim, Sci, 1990. p. 68-3392.

DEHORY B.A., R.R., Johnson and H.R. Cound. "Digestibility of forage hemicellulosa and pectin by rumen bacteria in vitro and the effect of lignification tree", J: Dairy Sci, 1962. p. 45-508.

DEHORY, B. A. "Degradation and utilization of isolated hemicellulose by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria", J. Bacteriology, 1965. p. 89-1515.

DEHORITY, B. A. "Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from in vitro rumen fermentations", J. Dairy Sci, 1963. p. 46-217.

DEHORITY, B. A. and SCOTT, H. W. "Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria", J. Dairy Sci, 1967. p. 50-1136.

DEHORITY, B. A. and J. A. Grubb. "Characterization of the predominant Bacteria occurring in the Rumen of Goats (*Capra hircos*)", Appl. Environm. Microbiol, 1977. p. 33-1030.

DEHORITY, B. A. "Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen", Proc. Nutr.Soc, 1991. p. 50-149.

DEHORITY, A. Burk. "Microbial interations in the rumen", Rev. Fac. Agron, 1998. p. 15-69.

DIEZ, F. *et al.* "Alternative schemes of butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* and their relationship to acetate utilization, lactate production, and phylogeny, Arch microbial, 1999. p. 171:324.

DOREAU, M. "Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture on Nutrient Digestion in lacting Dairy Cows", J Dairy Sci, 1998. p. 81:3214.

DURAND, M. and KAWASHIMA, R. "In digestive physiology and metabolism in ruminants" (Y Ruckesbusch and Thirent), MTP press Ltd, Lancaster England, 1980.

DURAND, M. "Conditions for optimizing cellulolytic activity in the rumen, p. 3-18 En: M. Chenost y P Reiniger (Eds). Evaluation of straws in ruminant feeding. Elsevier Applied Science, Barking. 1989.

European Commission Directives, "Probiotics Additives", Edition 2/96.

ERASMUS, L. J., BOTHA, P. M. & KISTNER, A. "Effect of yeast culture supplementation on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. J. Dairy Sci., 1992. p. 75-3056

FALLON, R. J. and F. J. Harte. The effect of yeast culture inclusion in the concentrate diet on calf performance. J. Dairy Sci. 70 (Suppl. 1): 143, 1987.

FENNEMA, O. R. "Química de los Alimentos, Editorial Acribia. Saragoza España, 1993.

FINDLAY, A. L. R. "Microbiology of the rumen and small and large intestines", Physiological Laboratory, University of Cambridge, En: alrf@cam.ac.uk EE.UU, 1998.

FLINT, H. J. "Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria." pp. 49-67. En: R. A. Prins y C. S. Stewart (Eds.). Microorganisms in ruminant nutrition. Nottingham University Press, Nottingham, 1994.

FONDEVILA, M. C. J., NEWBALD P. H. Hotten and E. R., Orskov. "A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw"; Anim. Prod., 1990. p. 51:422-425.

FONDEVILA, M. and B. A. Dehority. "Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria singly, in co-culture or added sequentially", J: Appl. Bacteriol, 1994. p. 77:541.

\_\_\_\_\_. "Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Provetella ruminicola* and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forrages", J. Anim. Sci, 1996. p. 74:678-684.

FONDEVILA, M. "Procesos Implicados en la Digestión Microbiana de los Forrajes de Baja Calidad", Rev.Fac. (LUZ), 1998. p. 1:87:106.

FORSTER, R. J., "Group-Specific 16S rRNA Hybridization Probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the Rumen", Appl. Envirom .Microbiol, vol 63, No 4, 1997. p. 1256.

Fuente SIPSA, Diciembre 4/02.

FUMIAKI, A. N. Ishibashi and S. Shimamura. "Effect of administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets", J. Dairy Sci, 1995. p. 78:3838-2846.

FULLER, R. "Probiotics in man and animal ", J. Appl Bact. 1989. p. 66:365.

GARCIA, R. "Laboratorio de Bromatología", Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga Colombia, 1995.

GILLILAND, S.E., B. B. Bruce, and T.E Staley. "Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves", J. Dairy Sci, 1980. p. 63:964.

GOMEZ ALARCON, R. A. DUDAS and J. T., Huber. "Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components" J.Dairy Sci, 1990. p. 73:703-710.

GRACDEL, C. M. and B. A. Dehority. "Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria",. Appl. Microbiol, 1972. p. 23:332-340.

HANS, Joachim Oslage. "Modern Animal Nutrition and the future of Animal production ", Animal research and Development, Institute for Science Cooperation. 1975.

HARRISON, G. A., R. W. Hemken, K. A. Dawson, R. J. Harmon, and K. B. Barker. "Influence of addition of yeast culture to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. J. Dairy Sci. 1988. p. 71:2967-2975

HARRISON, D. G. Beever, D.E, Thomson D. J. and OSBOURN D. F., J . Agric Sci, Comb, 1975. p. 85, 93-103

HESPELL R. B, "Fermentation of Xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other Ruminant Bacteria", Appl. Environ. Microbiol, vol 53, No 12, 1987. p. 2849.

\_\_\_\_\_. "Physiology and Genetics of Xylan Degradation by Gastrointestinal Tract Bacteria", J Dairy Sci, 1990. p. 73:3013.

HIGGINBOTHAM, G. E. and J. Bath. "Evaluation of Lactobacillus fermentation cultures in calf feeding system ", J. Dairy Sci. 1993. p. 76:615.

HOLLY, Taylor Ballantine. "Interaction of Rumen Available Protein and Carbohydrates", Animal Health, The DairyBiz Archive, hollyb@inetnow.net. 1998

HOLT, J. N. R., KRIEG, P. H. A, SNEALTH, J. T., STALEY, and S. T., Williams (ed). "Bergey'S manual of determination bacteriology, 9 ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 1994.

HOMER B., Sewel, 1993, "Feed Additives for Beef Cattle", Agricultural publication G02075-Reviewed,.

HOOVER, W. H. and K.M Tammy. "Rumen Digestive Physiology and Microbial Ecology", veterinary Clinic of North America: Food Animal practice, 1991. p. 7: 311-323.

HOYOS, G. L., GARCIA and F. MEDINA. Effect of feeding viable microbial feed additives on performance of lactating cows in a large dairy herd. J. Dairy Sci. 70(Suppl. 1):217 (Abstr.). 1987.

HUNGATE, R. E. "The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria", Bacteriol, Rev, 1950. p. 14:1-49.

\_\_\_\_\_. "The Rumen and its microbes", Academic Press, New York and London. 1966

KALMOKOFF M. L. and R. M., Teather. " Isolation and characterization of a bacteriocin (Butyrivibriocin AR 10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: Evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-

like activity among rumen isolates of *Butyrivibrio fibrisolvens*", Appl. Environ Microbiol, 1997. p. 63:394-402.

KALMOKOFF, M. L., D. Lu, Mf Whitford and R M, Teather, 1999,"Evidence for production of a new antibiotic ( Butyrivibriocin OR79A) by the ruminal anerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* OR79: Characterization of the structure gene encoding Butyrivibriocin OR79A", Appl. Envirom.Microbiol. 65:2128-2135.

KALMOKOFF, M.L., "Biochemical and Genectic characterization of the flagellar filaments from the rumen anaerobe *Buryrivibrio fibrisolvens* OPR 77", Anaerobe, Molecular Bology/genetics, 2000. p. 6, 93-109,

KRAUSE, D.O and J.B, Russel. "SYMPOSIUM: Ruminant Microbiology: How many Bacteria are here? J. Dairy Sci, 1996. p. 79:1467-1475.

JENNY, B. F. H. "Performance and fecal flora of calves feed a *Bacillus subtilis* concentrate ", Journal Dairy Science, 1991. p. 74:1968.

LARA, C., y CHALELA G, "Nuevo medio de Cultivo para el aislamiento de microorganismos Ruminales", Mayo 2.002, Memorias III Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Bogotá. Junio 2.002, Memorias I Congreso Nacional de Biotecnología, Bogotá, Colombia, 2.002.

\_\_\_\_\_. "Nuevo medio de Cultivo para el aislamiento de microorganismos Ruminales", Archivos de Zootecnia, vol 51, No 196.

LATHAM, M. J. "*Ruminicoccus flavefaciens* cell coat and adhesion to cotton cellulose and to cell wall in leaves of perennial egrass;" Appl. Environm. Microbiol, 1978. p. 35:156.

LEEDLE, J. Z., MARVIN P., BRYANT M. and HESPELL, R. "Diurnal variation in bacterial Numbers and fluid parameters, in ruminal contents of animal fed low or high-forage diets", Applied Enviromental Microbiology, Aug, 1982, vol 44 No. 2, 1982. p. 402.

LEON CHAITOW, N.D. D.O, MRO. "Probiotic. The Friendly Bacteria". Senior Lecturer, University of Westminster, 1996.

LICER, M. "Liofilización del jugo de curuba", Tesis de grado, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 1976.

LINN, J. G. "Feed additive in dairy ration", Collection: Feeding and Nutrition, University of Minnesota, 1993.

MACKIE R. "Symposium: Rumen Microbial Ecology and Nutrition", J Dairy Sci, 1990. p. 73:2971.

MAYNARD L. "Nutrición Animal", Séptima Edición, Mc Graw Hill, 1981.

MC GAVIN, M. and C. W. Forsberg. "Catalytic and substrate-binding domains of endoglucanase 2 from Bacteroides succinogenes", J. Bacteriol, 1989. p. 171:3310-3315.

MC NEILL, J. "Some nutritional requeriments of bovine rumen bacteria", J. Dairy Sci, 1954.

MC SWEENEY, C. S. I. "Rumen microbial ecology and physiology in sheep and Goats fed a Tannin-containing diet", CSIRO Tropical Agriculture, 2.000.

MAROUNER M. "Utilization of Glucose and Xylose by Ruminal Strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*", Appl. Environ. Microbiol, vol 60, No 2, 1994. p. 738.

MASON, R. L., GUNST, R. "Response-surface designs. In Statistical and Analysis of experiments", Wiley and Son, New York, 1989.

METCHNIKOFF, E.. Prolongation of life. G. P. Putnam's Sons, New York, 1908.

Merck Laboratorio, 1994, "Manual de cultivos"

MILES, R. D., and S. M. Bootwalla. "Direct-fed microbials in avian. In Direct-Fed Microbials in Animal Production: A Review of Literature. Nat. Feed Ingrid. Assoc. Page 117, West Des Moines, IA, 1997.

MIURA, H. Horiguchi et al. "Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii*, and *Ruminococcus albus*" Appl. Environ. Microbiol, 1980. p. 40:294-300.

MONTALBETTI, Andrea. "Microbiología del Rumen", 2001. En: [www.Monografias.com](http://www.Monografias.com)

MORENO, W. "Aplicación al Diseño y Análisis de Experimentos", Ediciones UIS, Bucaramanga, 1993.

MORRINSON and BOY. "Química Orgánica", Fondo Educativo Interamericano, 1994.

ODENYO AA., R. I. Mackie, D. A. Stahl and B. A. White. "The use of 16S.rDNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic

bacteria:development of probes for Ruminococcus species and evidence for bacteriacin production “, Appl . Environm. Microbiol. 1994. p. 60:3688-3696.

OSBORNE, J. M. and B. A. Dehority. "Sinergy in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure culture of ruminal bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 1989. p. 55:2247-2250,.

OZAWA, K. et al. "Effect of Streptococcus faecalis BIO-4R on intestinal flora of weaning piglets and calves ", Appl. Environ Microbiol, 1983. p. 45:1513.

PEREZ, Juan Ramon. "Uso de probióticos en aves de jaulas" Revista Ornitológica Pájaros. España, 1998.

PERKIN, Elmer. Manual del equipo. 1984

PIVA,G." Effect of Yeast on Dairy Cow performance, Ruminal fermentation, Blood Components, and Milk Manufacturing Properties", Journal of Dairy Science vol 76, No 9, 1993.

PHILLIPS, W. A., and D. L.. VonTungeln. “The effect of yeast culture on poststress performance of feeder calves”. Nutr. Rep. Int. 1985. p. 32:287.

QUIGLEY, J. D. "Development of rumen function in calves: nature of protein reaching the abomasum", J. Dairy Sci, 1985. p. 68:694,

QUIGLEY, Jim. "Microbial protein synthesis in the rumen. August 13, 1998.

RICHARDSON, A. J.; *et al.* “Influence of coculture with rumen bacteria on the lignocellulolytic activity of Phycomcetous fungi from the rumen.In Microbial Ecology Section. XIV International Congress of Microbiology, 7-13 September

(Manchester, England), 1986.

ROGERE V, et al. "Effects of physical cellulose factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminant bacteria *Ruminococcus flavefacines* and *Fibrobacter succiongenes* subsp *succinogenes*", Appl. Envirom. Microbiol, 1990, p. 56:3081.

ROGERE V, et al. "Adhesion of rumen cellulolytic bacteria to cellulose: a different mechanic for *Bacteroides succinogenes* S85 and for *Ruminococcus flavefaciens* 007? ", J. Anim.Sci, 1988. p. 2:462.

RODRÍGUEZ F., y DÍAZ, T. E. "Aislamiento, Patrón de Fermentación de Carbohidratos y Caracterización Morfológica de bacterias Celulolíticas del rumen de Bovino Alimentados con heno de Raigras en Colombia ", Revista Corpoica Vol. 1, No. 1 Octubre, 1996.

RUF, E. W., W. H. Hale, and W. Burroughs. "Observations upon an unidentified factor in feedstuffs stimulatory to cellulose digestion in the rumen and improved liveweight gains in lambs". J. Anim. Sci, 1953. 12:731.

RUSSELL, J. B. and R. J., Wallace. "Energy yielding and consuming reactions. In the rumen microbial ecosystem": In P.N. Hobson (ed), p. 185-215. Elsevier Applied Sci, London. United Kingdom, 1988.

RUSSELL, J. B., H. J. Strobel and S. A., Martin. "Strategies of nutrient transport by ruminal bacteria", J. Dairy Sci, 1990. p. 73:2996-3012.

RUSSELL, J. et al. "A net carbohydrates and protein system for evaluating cattle diets": I. Ruminal fermentaion. J.Anm.Sci, 1992. p. 70:3557-3561.

RUSSELL, J. B. and D.B. Wilson. "Why are Ruminant Cellulolytic Bacteria unable to Digest Cellulose at Low pH? ", *J. Dairy Sci*, 1996. p. 79:1503.

RUSSELL, J. B. "Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrates" *J. Anim. Sci*, 1998. p. 76:1955-1963.

SALANITRO, J. P. "Quantitative Method for the Gas-Chromatography Analysis of Short-Chain Monocarboxylic and Dicarboxylic Acids in Fermentation Media", *Applied Microbiology*, vol 29 No 3, 1975. p. 374.

SCOTT, R. and B.A. Dehority. "Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria", *J. Bacteriology*, 1965. p. 89:1169.

SCOTT, A. "Symposium: Direct-Fed microbials and rumen fermentation", *J Dairy Sci*, 1992. p. 75:1736.

STACK, R, and R.E. Hungate, 1984, "Effect of 3-phenylpropanoic acid on capsule and celluloses of *Ruminococcus albus* 8", *Appl. Environ. Microbiol*, 48:281.

STALLINGS, C. C. L. "Development in protein Nutrition", Feeding and Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, 1992.

STEWART, C, S et al. "The Rumen bacteria, En : The rumen microbiology ecosystem", Elsevier *Appl. Sci*, London, 1988.

TANNOCK, G. W., U. K, Norfolk. " A fresh look at the intestinal microflora. In *Probiotics: A critical review*". Scientific Press, 1999. p. 5-14

TEATHER, R. M. "Maintenance of laboratory strains of obligately anaerobic bacteria", *Appl. Environ. Microbiol*, 1982. p. 44:499.

TENKONEN, M, J., SCHUSEIL J., Puls and K. Pautanin. " Production purification and characterization of an sterease liberating phenolic acids from lignocellulosics", J. Biotechol, 1991. p. 18:69-84.

THEODOROU, M. K.; Lowe, S. E. and Trincl, A. P. J. 1988', The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. Biosystem 21: 371-376..

TRUDY NETHERWOOD, et al. "Probiotics show to change Bacterial Community Structure in the Avian Gastrointestinal Tract", Applied and Environmental, microbiology, 1999. p. 5134-5138.

VAN HORN, et al. "Non-structural and structural carbohidrates in large dairy Herd management. American Dairy Science Association, Champaign III, 1992. p. 222.

VAN SOEST P. J., " Nutritional ecology of the ruminant ", Corvallis, Wash., O and B Books, 1982.

VAN SOEST, P. T. et al. "Symposium: Carbohidrate metodology, metabolism and natural implications in dairy cattle, J. Dairy Sci, 1991. p. 74-3583.

VAREL V. H., *et al.* "In vitro stimulation of forage o forage fiber degradation by ruminal microorganism with *Aspergillus oryzae* fermentation extract", Appl, Envirom Microbiol, 1993. p. 59:3171-3176.

WALLACE, R.J. & Newbold, C.J. (1993) Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast cultures as feed additives. In Biotechnology in the Feed Industry (Ed. T.P. Lyons). pp 173. Alltech Publications, Nicholasville, USA.

WEIMER, P. J. 1996, "Why Don't Ruminal Bacteria Digest Cellulose Faster?", J. Dairy Sci, 79:1496.

WHINDHAM, W. R. and Akin, D. E. "Rumen fungi and forage fiber degradation. Appl. Environ. Microbiol, 1984. p. 48:473-476.

WIEDMEIER R. D. "Effect of yeast culture and Aspergillus oryzae fermentation extract on ruminal characteristics an nutrient digestibility", J dairy Sci, 1987. p. 70:2063.

WILLIAMS, P.E.V. "Effects of the inclusion of yeast culture (Saccharomyces cerevisiae plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers", J.Anim. Sci, 1991. p. 69:3016.

WILLIAMS, Riley. "Probiotics", Ag-West Biotech Inc., 1996.

WINDHAM, W. R. "Rumen fungi and forage fiber degradation ", Appl. Environ. Microbiol, 1984. p. 48:473

WOHLT, J. E., et al. "Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation", J. Dairy Sci, 1991. p. 74:1395.

YOON, I. K., and M. D. Stern. "Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: A review". Asian-Australas. J. Anim. Sci, 1995. p. 8:533.

ZEYNEP ERDOGAN. "Using of Antibiotic and Probiotic in Broiler Diets", Faculty of Medicine Veterinary. University Ankara, Turquia, 1998.

# **ANEXOS**

## Anexo A. Caracterización Biológica de la Guayaba agria.

**Dominio:** Eukarya  
**Phylum:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Myrtales  
**Familia:** Myrtaceae  
**Genero:** Psidium  
**Especie.** guineense-araca  
**Nombre común:** Guayabero  
**Lugar de origen:** América tropical.

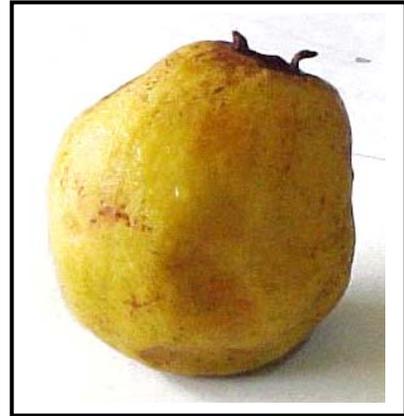


Figura 1. Guayaba Agria (*Psidium araca*)

**-Etimología:** *Psidium*, del griego psidio, nombre del granado, probablemente por la relativa semejanza de sus frutos con los del guayabero. *Guayaba*, proviene de su nombre vernáculo guayabo.

**-Descripción:** Arbolito de follaje persistente que puede alcanzar 2 a 4 m de altura, con el tronco corto y algo tortuoso, con la corteza que se desfolia en placas (Figura 18). Hojas opuestas, de 5-10 cm de longitud, enteras, elípticas u oval-lanceoladas, algo coriáceas, de corto pecíolo. Nerviación paralela destacada. Haz verde oscuro (en invierno con tonalidades rojizas) y envés recubierto de pelos finos amarillentos.



Figura 2. Árbol y frutos de Guayaba agria

Las flores son blancas, solitarias o en pequeños grupos, que aparecen en las axilas de las hojas (Figura 19). Tienen 4-5 pétalos y numerosos estambres. Florece en Mayo-Junio. Fruto en baya redondeada con el cáliz de la flor persistiendo. Piel de color amarillo, aromática. Pulpa amarilla, según la variedad.



Figura 3. Flor del árbol de Guayaba agria

**-Datos de cultivo:** Se multiplica normalmente por semillas, aunque también es posible el acodo. Las variedades se multiplican por injerto. Árbol resistente a la sequía y al calor intenso, no así a las heladas. Poco exigente en suelos, aunque con fines productivos le convienen los suelos profundos y ricos con abonados periódicos. Utilizado como árbol frutal secundario. De su fruta, rica en vitamina C, se hacen confituras y jugos.

Esta fruta conocida comúnmente como Guayaba agria (*Psidium araca*) y de gran producción en el departamento de Córdoba, es utilizada por los habitantes Cordobeses y de algunas regiones del país, (Armenia, Cartago, Ibagué, Manizales, Pereira. Fuente SIPSA. 2002), para la preparación de jugos; presenta las siguientes características: es redonda, de color amarilla cuando está madura), es una fruta carnososa y pesada; su pH oscila entre 2,17-3,19.

**Anexo B. Observación macroscópica y microscópica de los Microorganismos aislados del rumen y del estiércol en medio de guayaba agria (medio B).**



Figura 1. Observación macroscópica de *Butyrivibrio fibrisolvens* aislada en el medio de guayaba



Figura 2. Observación microscópica de *Butyrivibrio fibrisolvens* (D: en fraccionamiento)

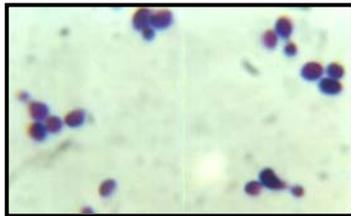


Figura 3. Levaduras cepa 18 en el medio B

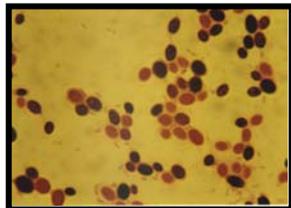


Figura 4. Levaduras tipo *Saccharomyces* (20) en el medio B

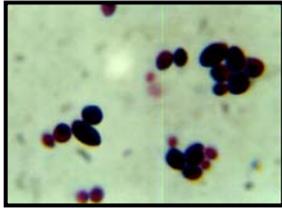


Figura 5. Levadura: cepa (19) aisladas en medio B.

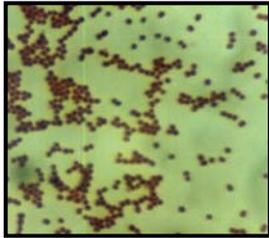


Figura 6. Bacterias tipo *Ruminococcus spp.*(15)



Figura 7. Bacterias tipo *Clostridium spp.*(7)



Figura 8. *Streptococcus bovis* (17) aislado en medio B.

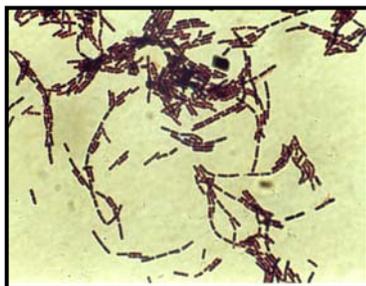


Figura 9. Bacterias tipo *Lactobacillus spp* (2)

- Hongo no ruminal : *Aspergillus oryzae* en medio: agar malta

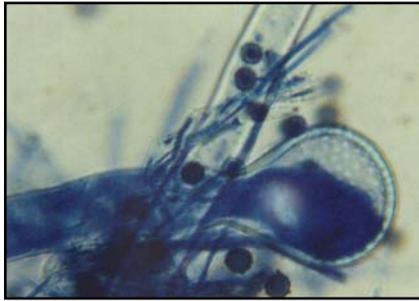


Figura 10 *Aspergillus oryzae* Observación microscópica



Figura 11. *Aspergillus oryzae*. Crecimiento en agar Malta

### Anexo C. Curvas de calibración para los patrones de ácido acético y butírico

En la Tabla 1 se muestran los volúmenes y las concentraciones de los ácidos acético (99%), butírico (96%) y propiónico (99%) para preparar los patrones; seguidamente se dan las curvas correspondientes.

Tabla 1. Concentración en ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico de los patrones

Patrón	Ácido acético glacial (99%) Tr (3.19 ± 0.02 min)		Ácido Butírico (96%) Tr (5.33 ± 0.02)		Ácido Propiónico (99%)	
	Volumen adicionado (µL)	Concentración (mM)	Volumen adicionado (µL)	Concentración (mM)	Volumen adicionado (µL)	Concentración (mM)
A	5.0	87.72	5.0	54.35	5.0	68,40
B	4.0	70.18	4.0	43.48	4.0	56,80
C	3.0	52.63	3.0	32.61	3.0	44,30
D	2.0	35.09	2.0	21.74	2.0	29,8
E	1.0	17.54	1.0	10.87	1.0	14,5
F	0.5	8.77	0.5	5.43	0.5	6,23
G	0.2	3.51	0.2	2.17	0.2	2,78
H	0.1	1.75	0.1	1.09	0.1	1,51
I	0.05	0.88	0.05	0.54	0.05	0,63

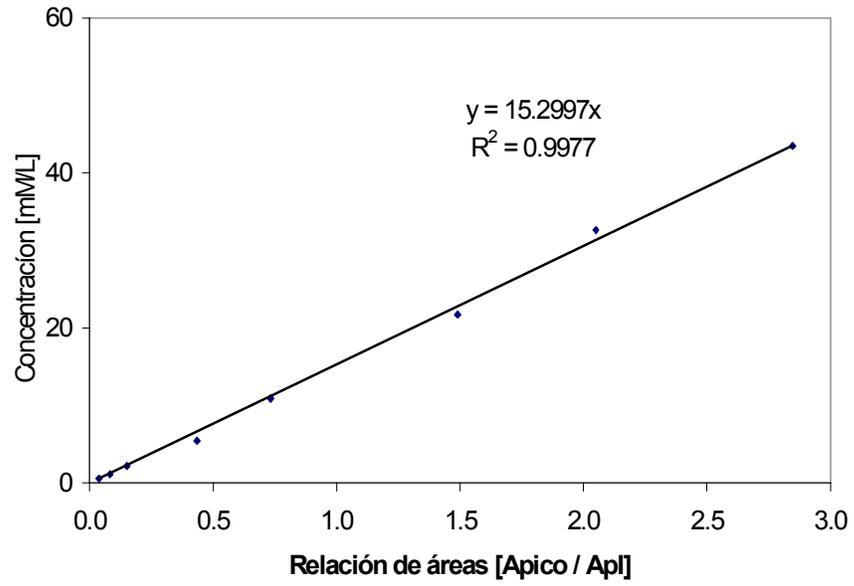
ácido Acético (Tr: 3.20 min):  
 $Y = 13.825 \cdot X$   
 $R^2 = 0.9983$

ácido Butírico (Tr: 5.35 min):  
 $Y = 15.2997 \cdot X$   
 $R^2 = 0.9977$

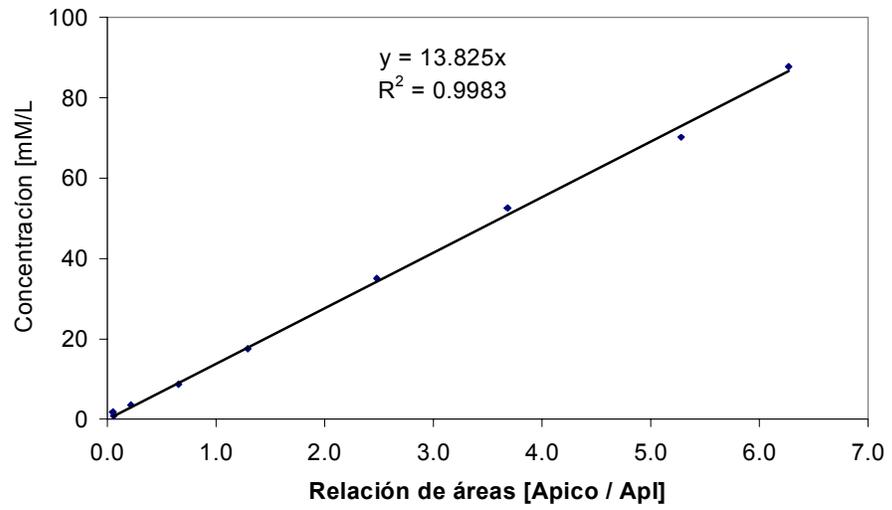
ácido propiónico (Tr: 4,16 min)  
 $Y = 14.618 \cdot X$   
 $R^2 = 0.9993$

Donde: Y: corresponde a la concentración del ácido en mmol/L  
X: Corresponde a la relación entre el área del pico correspondiente al ácido y el área del patrón interno (tridecano)  
Tr: Tiempo de retención

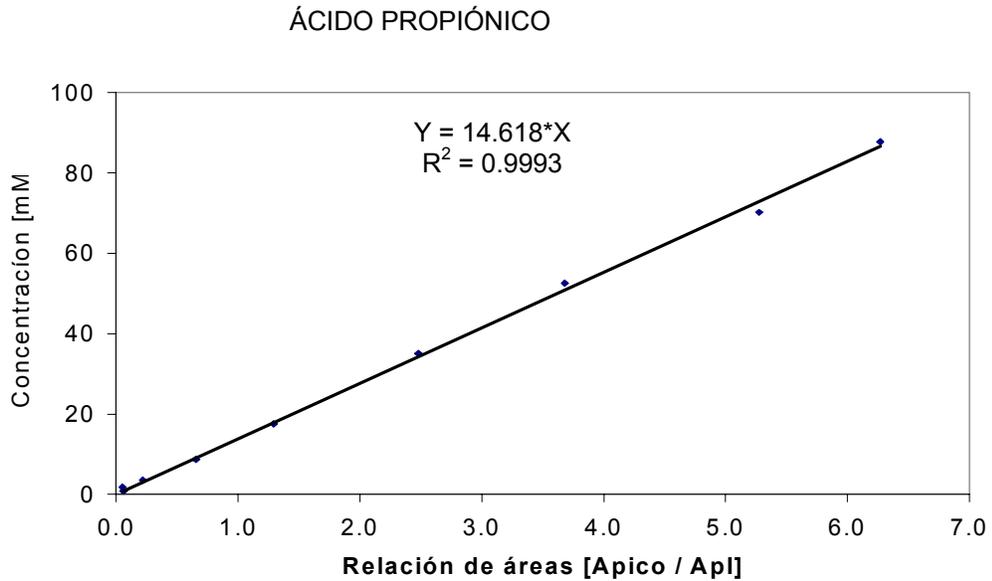
ACIDO BUTÍRICO



ACIDO ACÉTICO



**-Análisis de reproducibilidad.**



En la Tabla 2 se presenta el análisis estadístico de los datos de cuatro determinaciones por GC de las concentraciones de ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico presentes en una solución patrón

Tabla 2. Concentración de ácido acético, ácido butírico y propiónico calculada para la solución patrón E, cuya concentración real era 17.2, 11.0 mM y 14.0 mM para el ácido acético, el ácido butírico y el propiónico, respectivamente.

patrón	patrón	patrón	patrón	Promedio	Desvest
17.4	16.4	17.4	16.4	16.9	0.6
11.1	11.3	12.0	11.6	11.5	0.4
14,5	15,0	13,8	14,0	14,5	0,4

## **Anexo D. Clasificación e identificación de la levadura cepa No 18.**

Levadura **Debaryomyces hansenii** (ZopF):

Descripción:

Células globosas, pseudomicelias rudimentarias. Ascosporas formadas después de conjugación de la célula madre y de las blastosporas.

Las ascosporas son globosas, la 2 por Asco. Los Nitratos no son asimilados.

La fermentación de glucosa y sacarosa es débil. La asimilación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, l-sorbosa, celubiosa y rafinosa es positiva.

### **-Descripción de Morfología de la Levadura Debaryomyces hansenii (ZopF):**

En la Figura 1 se observa el crecimiento macroscópico de la levadura en el medio de Guayaba agria.

Las Figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7 muestran la observación microscópica directa con Azul de Lactofenol en medio guayaba agria.

Figura 2: Observación microscópica de los Ascos.

Figura 3: Ascos con Pre. Ascosporas

Figura 4: Fraccionamiento de Ascosporas.

Figura 5: Observación microscópica de Fraccionamiento.

Figura 6: Observación microscópica en Azul de Lactofenol

Figura 7: Observación de células jóvenes en confirmación de Blastosporas.

Figura 8: Observación Fuscina (100 X) en donde se aprecia las células alargadas y formación de pseudomicelio rudimentario.

Figura 9: Pruebas de Fermentación y Asimilación de Azúcares.

Figura 10: Crecimiento macroscópico de la levadura en el medio malta

Figura 1. Crecimiento macroscópico de la Levadura en el medio de Guayaba agria

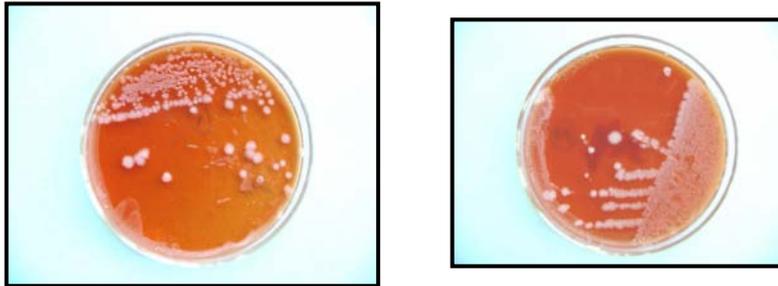


Figura 2. Observación microscópica de los Ascos.

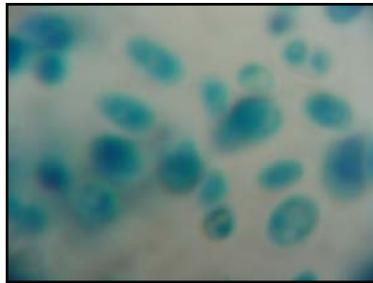


Figura 3. Observación microscópica del Núcleo celular (D) y Ascos con Pre-Ascospora (E)

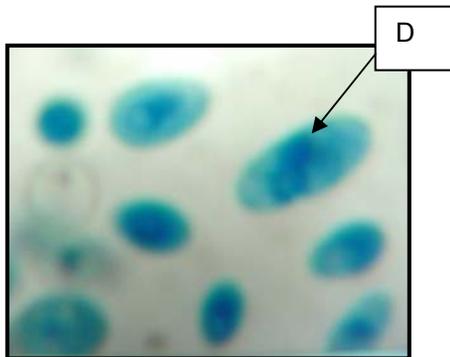


Figura 4. Fraccionamiento de Ascosporas. (F)

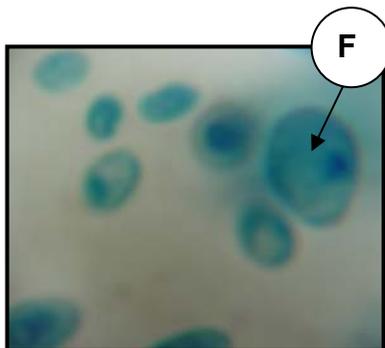


Figura 5. Observación microscópica de Fraccionamiento (A).

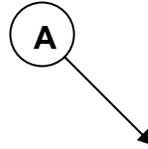
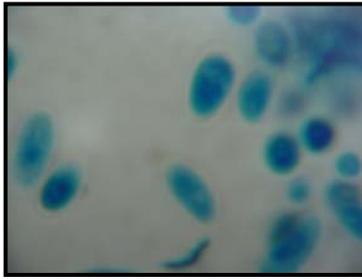


Figura 6. Observación microscópica en Azul de Lactofenol

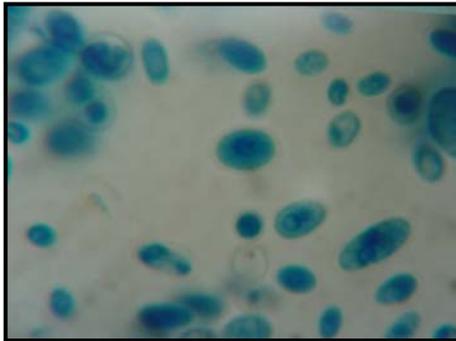


Figura 7. Observación de células jóvenes en conformación de Blastosporas. (B)  
Dra El Dr Rodolfo dice que cree que es un error "celulas jóvenes" creo que el del error es Él

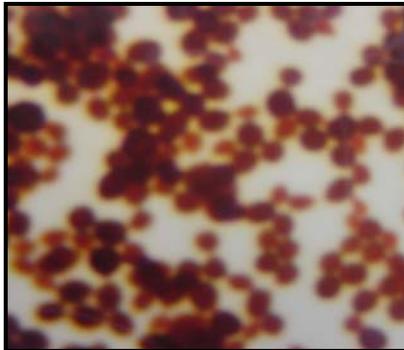


Figura 8. Observación Fuscina (100 X) en donde se aprecia las células alargadas y formación de pseudomicelio rudimentario ( C )

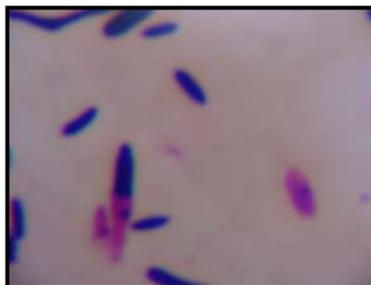
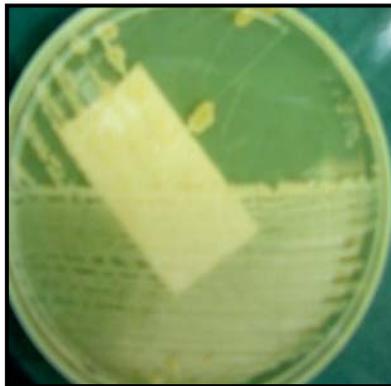


Figura 9. Pruebas de Fermentación y Asimilación de Azúcares.



Figura 10. Crecimiento macroscópico de la levadura en el medio malta



## Anexo E. Análisis Estadísticos

### a) Análisis de todos los datos (Cepas y medios).

Regresión múltiple.

Variable dependiente = **POBLACIÓN**.

Parámetro	Estimación	Error estándar	T estatico	Valor P
Constante	142,192	252,947	0,562142	0,5774
Cepa	61,5658	70,9879	0,867272	0,3914
Medio	-141,904	114,387	-1,24055	0,2226

### Análisis de Varianza

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor P
Modelo	308643,0	2	154321,0	1,18	0,3174
Residual	4,82349E	37	130365,0		

Total (corr.) 5,13213E6      39

R- cuadrado = 6,01366 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 0,933606 percent

Error estándar de Est = 361,06

Mean absolute error = 157,817

Durbin-Watson statistic= 2, 26067

La ecuación que se ajusta al modelo:

**POBLACIÓN = 142,192 + 61,5658 \* CEPA – 141,904 \* MEDIO.**

**b) Análisis por grupo de poblaciones: Bacilos, Cocos y Levaduras.**

**-Análisis para Bacilos**

Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: **POBLACIÓN**

Parámetro	Estimación	Error estándar	T estatico	Valor P
Constante	442,192	268,865	1,64686	0,1126
Medio	-141,904	174,11	-1,24985	0,2234

**Análisis de Varianza**

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor P
Modelo	305987,0	2	305987,0	1,56	0,2234
Residual	4,70107E6	24	195878,0		

Total (corr.) 5,0070539 26

R- cuadrado = 6,11113 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 2,19909 percent

Error estándar de Est = 442,581

Mean absolute error = 205,84

Durbin-Watson statistic= 2,29833

**POBLACIÓN =442,783 - 217, 613 \* MEDIO.**

**-Análisis para Levaduras.**

Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: **POBLACIÓN**

Parámetro	Estimación	Error Standar	T estatico	Valor P
Constante	13,6775	3,40904	4,01213	0,0070
Medio	-3,8275	2,15607	-1,77522	0,1262

**Análisis de Varianza**

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor P
Modelo	29,2995	1	29,2995	3,15	0,1262
Residual	55,7835	6	9,29725		

Total (corr.)      85,083            7

R- cuadrado = 34,4364 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 23,5091 percent

Error estándar de Est = 3,04914

Mean absolute error = 2,16625

Durbin-Watson static= 2,79482

**POBLACIÓN = 13,6775 - 3,8275\* MEDIO.**

### -Análisis para Cocos.

Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: **POBLACIÓN**

Parámetro	Estimación	Error estándar	T estatico	Valor P
Constante	1,61667	2,73192	0,591769	0,5858
Medio	3,62	1,72782	2,09513	0,1042

### Análisis de Varianza

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor P
Modelo	19,6566	1	19,6566	4,39	0,1042
Residual	17,9121	4	4,47803		

Total (corr.)      37,5687      5

R- cuadrado = 52,3217 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 40,4021 percent

Error estándar de Est = 2,11614

Mean absolute error = 1,43556

Durbin-Watson static= 1,38409

**POBLACIÓN = 1,61667 + 3,62\* MEDIO.**

**c) Análisis del efecto sinérgico**

**-Análisis estadístico con respecto a la razón (Relación 1:1 y 1:3 )**

Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: **EFECTO RESPECTO A LA RAZÓN**

Parámetro	Estimación	Error estándar	T estatico	Valor P
Constante	6,41181	- 0,17844	35,9326	0,000
Co-cultivo	0,0169761	0,00843578	2,01239	0,511
Razón	0,120964	0,0993923	1,21703	0,2309

**Análisis de Varianza**

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor
Modelo	0,594242	2	0,297121	2, 87	0,0688
Residual	4,03877	39	0,103558		

Total (corr.) 4,63301 41

R- cuadrado = 12,8263 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 8,35581 percent

Error estándar de Est = 0,321805

Mean absolute error = 0,2254

Durbin-Watson static= 2,06166

**EFECTO = - 641181 - 0,0169761 \* Co-cultivo -0,120964 \* Razón**

**-Análisis estadístico con respecto a la producción del ácido butírico.**

-Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: **EFEECTO: PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO BUTÍRICO**

Parámetro	Estimación	Error estándar	T estatico	Valor P
Constante	- 0,216237	0,147982	-1,46123	0,1520
Co-cultivo	-0,00170157	0,00699589	-0,243225	0,8091
Razón	-0,0134754	0,0824271	0,163483	0,8710

#### **Análisis de Varianza**

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor P
Modelo	0,00635627	2	0,00317814	0,04	0,9564
Residual	2,77769	39	0,0712229		

Total (corr.)    2,78405            41

R- cuadrado = 22,831 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 0,0 percent

Error estándar de Est = 0,266876

Mean absolute error = 0,19 3122

Durbin-Watson static= 1, 80083

**EFEECTO = - 0,216237 - 0,0017057 \* Co-cultivo – 0,0134754 \* Razón**

**-Análisis estadístico con respecto a la producción de ácido acético**

- Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: **EFFECTO: PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO.**

Parámetro	Estimación	Error estándar	T estatico	Valor P
Constante	-14,0456	54,2051	-2,59119	0,0134
Co-cultivo	-0,444755	0,256255	-1,73559	0,0905
Razón	1,47369	3,01926	0,488097	0,6282

**Análisis de Varianza**

Fuente	suma de cuadrados	Df	significado de cuadrado	-Ratio	Valor P
Modelo	304,576	2	152,288	1,59	0,2161
Residual	3726,87	39	95,5609		

Total (corr.)      4031,45      41

R- cuadrado = 7,555 percent

R- cuadrado (ajustado por d.f.) = 2,81423 percent

Error estándar de Est = 9,77553

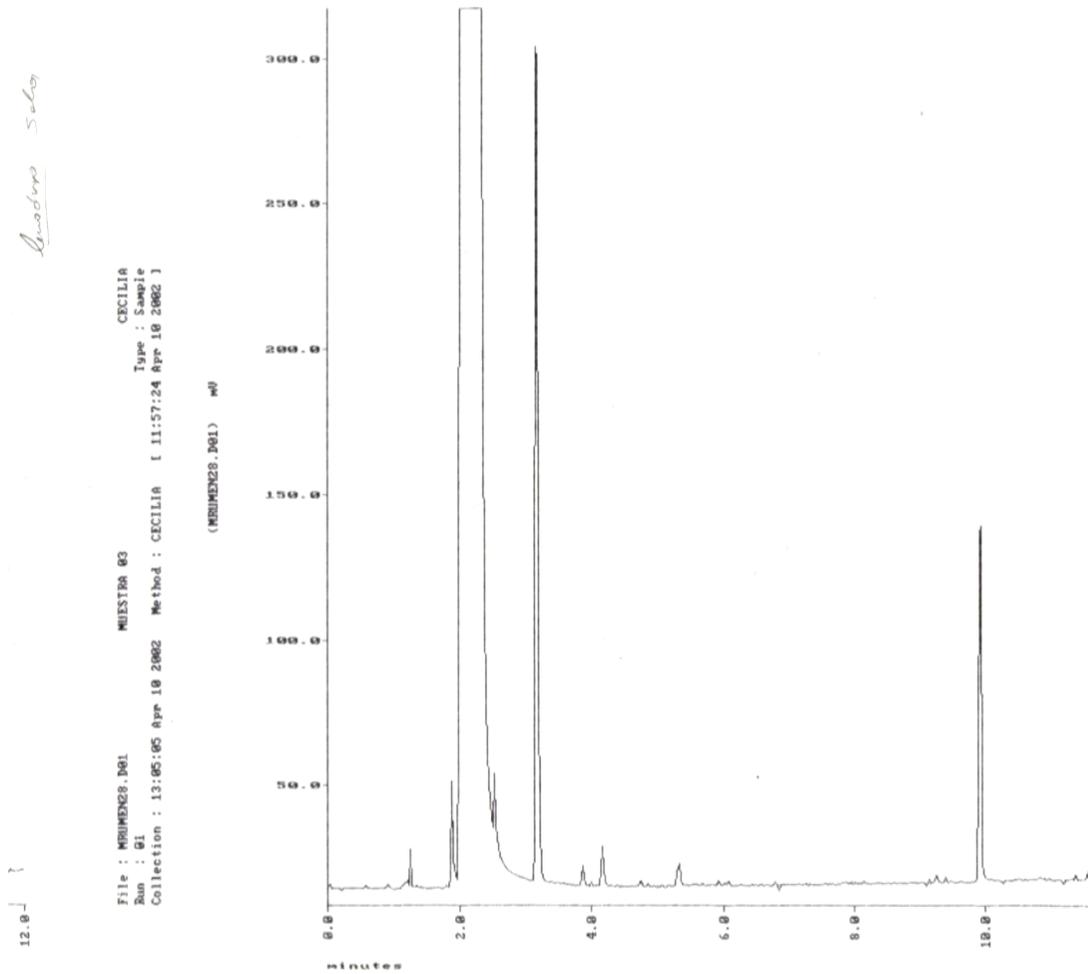
Mean absolute error = 7,88906

Durbin-Watson static= 1,283 98

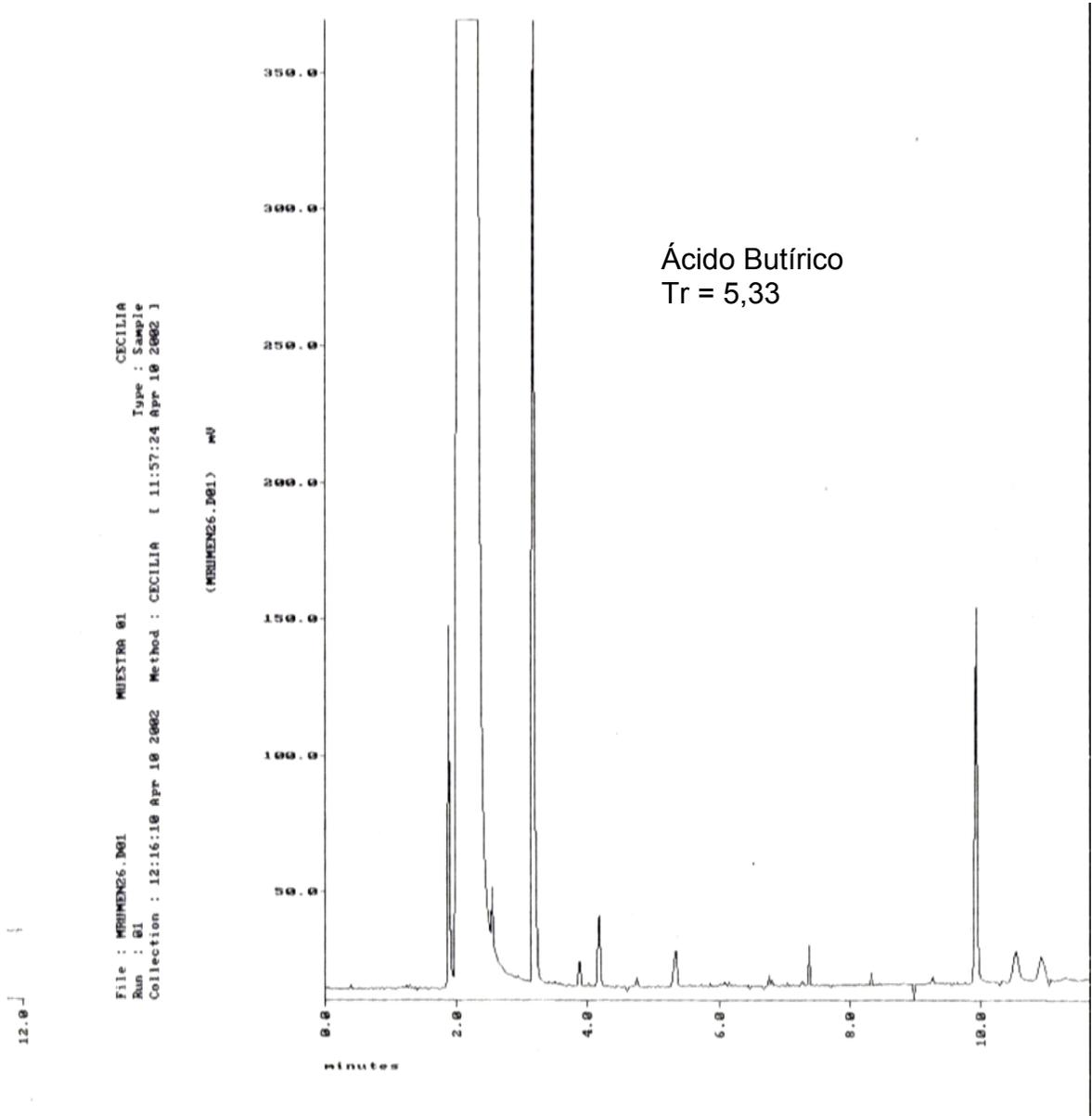
**EFFECTO = - 14,0456 - 0,444755 \* Co-cultivo + 1,47369 \* Razón**

## Anexo F. Cromatogramas.

**Cromatograma 1.** Producción de ácido acético y ácido butírico por la Levadura *Debaryomyces hanseni* (ZopF)



**Cromatograma 2.** Producción de ácido acético y ácido butírico por *Butyrivibrio fibrislvens*



**Cromatograma 3.** Producción de ácido Acético y ácido Butírico por la Levadura *Debaryomyces hansenii* (ZopF) y la bacteria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*

