

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
ZOOTECNIA**



**CARACTERIZACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS
LACTOBACILOS DE LA RUMINAZA DE BOVINOS FAENADOS; EN EL
MUNICIPIO DE CHIQUIMULA, CHIQUIMULA.**

ADELA MARÍA EVANGELINA CERNA CASASOLA

CHIQUIMULA, GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2013.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS
LACTOBACILOS DE LA RUMINAZA DE BOVINOS FAENADOS; EN EL
MUNICIPIO DE CHIQUIMULA, CHIQUIMULA.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Sometido a consideración del Honorable Consejo Directivo

Por

ADELA MARÍA EVANGELINA CERNA CASASOLA

Al conferírsele el título de

ZOOTECNISTA

En el grado académico de

LICENCIADA

CHIQUIMULA, GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2013

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
ZOOTECNIA**



**RECTOR
Dr. CARLOS ESTUARDO GALVEZ BARRIOS**

CONSEJO DIRECTIVO

Presidente:	M.Sc. Nery Waldemar Galdámez Cabrera
Representante de Profesores:	M.Sc. Edgar Arnoldo Casasola Chinchilla
Representante de Profesores:	Ph.D. Felipe Nery Agustín Hernández
Representante de Graduados:	Lic. Zoot. Alberto Genesio Orellana Roldán
Representante de Estudiantes:	Br. Heidy Jeaneth Martínez Cuestas
Representante de Estudiantes:	Br. Otoniel Sagastume Escobar
Secretaria:	Licda. Marjorie Azucena González Cardona

AUTORIDADES ACADÉMICAS

Coordinador Académico:	Ing. Agr. Edwin Filiberto Coy Cordon
Coordinador de Carrera:	Lic. Zoot. Merlin Wilfrido Osorio López

ORGANISMO COORDINADOR DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

Presidente: M.Sc. Raúl Jáuregui Jiménez
Secretario: M.Sc. Baudilio Cordero Monroy
Vocal: Lic. Zoot. Alejandro Linares

TERNA EVALUADORA

Dra. Blanca Zelaya de Romillo
Dra. Virginia de Corzo
M.Sc. Raúl Jáuregui Jiménez

Chiquimula, noviembre de 2013.

Señores:

Miembros del Consejo Directivo
Centro Universitario de Oriente
Universidad de San Carlos de Guatemala
Chiquimula, Ciudad.

Señores Representantes:

En cumplimiento de las normas establecidas por la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala y el Centro Universitario de Oriente, presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

“CARACTERIZACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS LACTOBACILOS DE LA RUMINAZA DE BOVINOS FAENADOS; EN EL MUNICIPIO DE CHIQUIMULA, CHIQUIMULA, AÑO 2013”.

Como requisito previo a optar al título profesional de Zootecnista en el Grado Académico de Licenciado.

Esperando que el presente trabajo de investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo

Atentamente,

ADELA MARÍA EVANGELINA CERNA CASASOLA



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE
CUNORI
CARRERA ZOOTECNIA



Chiquimula, noviembre de 2013

Señor Director
M.Sc. Nery Waldemar Galdámez Cabrera
Centro Universitario de Oriente
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director.

En atención a la designación efectuada por la Comisión de Trabajos de Graduación, para asesorar a la estudiante **ADELA MARÍA EVANGELINA CERNA CASASOLA**, en el trabajo de graduación denominado: **"CARACTERIZACIÓN AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS LACTOBACILOS DE LA RUMINAZA DE BOVINOS FAENADOS; EN EL MUNICIPIO DE CHIQUIMULA, CHIQUIMULA"** tengo el agrado de dirigirme a usted, para informarle que he procedido a revisar y orientar a la sustentante sobre el contenido de dicho trabajo.

En ese sentido el tema desarrollado, en mi opinión, genera una nueva opción que mejora la calidad alimenticia de los ensilados, mejorando con ello el rendimiento productivo de los rumiantes, en beneficio de los productores pecuarios de la región y del país en general.

Por los motivos anteriormente expuestos, es mi opinión que la presente investigación reúne los requisitos exigidos por las normas pertinentes; razón por la cual recomiendo su aprobación para su discusión en el Examen General Público, previo a optar al título de Zootecnista en el grado académico de Licenciada.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Lic. Zoot. Merlin Wilfrido Osorio López
Asesor Principal





D-TG-Z-091/2013

EL INFRASCRITO DIRECTOR DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, POR ESTE MEDIO HACE CONSTAR QUE: Conoció el documento de la investigación que efectuó la estudiante **ADELA MARÍA EVANGELINA CERNA CASASOLA** titulado “**CARACTERIZACIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS LACTOBACILOS DE LA RUMINAZA DE BOVINOS FAENADOS; EN EL MUNICIPIO DE CHIQUIMULA, CHIQUIMULA**”, trabajo que cuenta con Comisión de Trabajos de graduación de la carrera de Zootecnia. Por tanto, la Dirección del CUNORI con base a las facultades que le otorga las Normas y Reglamentos de Legislación Universitaria **AUTORIZA** que el documento sea publicado como Trabajo de Graduación, a Nivel de Licenciatura, previo a obtener el título de Zootecnista.

Se extiende la presente en la ciudad de Chiquimula, a nueve de noviembre de dos mil trece.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

MSc. Nery Waldemar Galdámez Cabrera

**DIRECTOR
CUNORI - USAC**



c.c. Archivo

ars

ÍNDICE GENERAL

TÍTULO	PÁG
Índice general	i
Índice de cuadros	iii
Índice de apéndice	iv
Índice de fotos	v
Índice de anexos	vi
Resumen técnico	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. OBJETIVOS	4
V. MARCO TEÓRICO	5
5.1 Marco conceptual	5
5.1.1 Características generales del rumen	5
Color	5
Olor	6
pH	6
Densidad	7
Potencial de óxido reducción	8
Calidad del contenido ruminal	10
5.1.2 Uso del contenido ruminal	10
Harina forrajera (HF) o contenido ruminal deshidratado	10
Bloques nutricionales	10
Inoculante orgánico para silos	11
5.1.3 Población microbiana del rumen	11
5.1.3.1 Población de hongos del rumen	12
5.1.3.2 Población de protozoos del rumen	13
5.1.3.3 Población de bacterias del rumen	15
Identificación de las bacterias del rumen	19
Clasificación de las bacterias del rumen	19
5.1.4 Inoculante	21
Tecnología de la formulación	24
Emulsiones aceite en agua	25
Lactobacilos	25
5.2 Marco Referencial	28

5.2.1 Antecedentes	28
VI. MARCO METODOLÓGICO	31
6.1 Ubicación	31
6.2 Población	31
6.3 Muestra	32
6.4 Manejo del experimento	33
6.4.1 Fase pre- experimental	33
6.4.2 Manejo del experimento	37
1. Recolección de muestras	37
2. Pruebas físicas del contenido ruminal	38
Verificación del color	38
Verificación del olor	38
Verificación de la densidad relativa	38
3. Pruebas químicas del contenido ruminal	38
Nivel de pH	38
Potencial de óxido reducción	39
4. Pruebas microbiológicas del contenido ruminal	39
Determinación de bacterias	39
Identificación de bacterias	40
Aislamiento de colonias de bacterias	40
Pruebas de diferenciación bioquímicas	41
5. Inóculo	41
6.5 Análisis estadístico	42
6.6 Variables	43
6.6.1 Variables cualitativas	43
6.6.2 Variables cuantitativas	43
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. RECOMENDACIONES	56
X. BIBLIOGRAFIA	57
XI. APÉNDICE	60
XII. ANEXOS	71

ÍNDICE DE CUADROS

1. Dentro del Texto

Cuadro No.	PÁG
1. Características físicas y químicas del contenido ruminal	9
2. Características de algunas bacterias del rumen	18
3. Características físicas del contenido ruminal fresco y ensilado	29
4. Contenido de fibra en los diferentes tratamientos de maduración del ensilaje	29
5. pH de los diferentes tratamientos de maduración del ensilaje	29
6. Protocolo sintetizado para la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	44
7. Análisis de T- student para las características organolépticas de la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	46
8. Crecimiento de bacterias lácticas (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) en UFC/ml, a diferentes temperaturas de incubación utilizadas en la caracterización de la ruminaza; municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	52
9. Cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) a diferentes niveles de dilución de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	53

ÍNDICE DE APÉNDICE

TÍTULO	PAG
A1.Boleta para resultado de pruebas físicas, químicas y microbiológicas; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	61
A2. Cuadro de vaciado para datos de pruebas cualitativas y cuantitativas del contenido ruminal; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	62
3A. Cuadro de resultados obtenidos de pruebas físicas y químicas del contenido ruminal en fresco; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013	63
4A. Cuadro de resultados obtenidos de pruebas microbiológicas en función del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	64
5A. Cuadro de análisis de Varianza para variable pH en la densidad de la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013	65
6A. Cuadro de análisis de Varianza para variable pH en el potencial de óxido reducción de la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013	65
7A. Cuadro de resultados correlaciones de Pearson de las características organolépticas de la ruminaza en fresco de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula, 2013.	66
8A. Cuadro de resultados de las pruebas de diferenciación bioquímica de colonias aisladas; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	66

ÍNDICE DE FOTOS

Foto No.	PAG
1A. Elaboración de medios de cultivo	67
2A. Esterilización de medios de cultivo	67
3A. Medios de cultivo identificados	67
4A. Recolección de muestras	67
5A. Muestras recolectadas	67
6A. Traslado de muestras protegidas	67
7A. Verificación de color	68
8A. Verificación de la densidad relativa	68
9A. Pruebas químicas	68
10A. Incubación de muestras anaerobiosis	68
11A. Muestra incubada en agar sangre	68
12A. Muestra incubada en agar MRS	68
13A. Tinción de Gram	69
14A. Vista microscópica de los Lactobacilos	69
15A. Incubación de bioquímica	69
16A. Resultados de las pruebas bioquímicas	69
17A. Lavado de cajas con caldo MRS	69
18A. Fermentación de Lactobacilos	69
19A. Tubos pre centrifugación	70
20A. Sedimentación en tubos centrifugados	70
21A. Elaboración de inóculo	70
22A. Homogenización de ingredientes	70
23A. Dilución de inóculo	70
24A. Inóculo terminado	70

ÍNDICE DE ANEXOS

TÍTULO	PAG
1A.Guía para las pruebas cualitativas en fresco del contenido ruminal en fresco; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.	72
2A.Tinción de Gram (Aquahual, MDLA; Pérez, MDL, 2004).	73
3A. Clasificación de los grupos de Lactobacilos (Sorgensen, 1959).	74

Cerna Casasola, A. 2013. Caracterización, aislamiento e identificación de los Lactobacilos de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013. Tesis Lic. Zoot. Chiquimula, GT, USAC 89 p.

Palabras claves: contenido ruminal, inóculo de *Lactobacillus acidophilus*, ph del contenido ruminal, potencial de óxido reducción, crecimiento microbiano, unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ ml), pruebas bioquímicas.

RESUMEN

En la presente investigación se caracterizó físico, químico y microbiológicamente el contenido ruminal, se aisló el *Lactobacillus acidophilus* del rumen y se elaboró un inóculo a partir del microorganismo aislado; con el propósito de utilizar, el lactobacilos, como un inoculante para ensilaje. El estudio se realizó en el Centro Universitario de Oriente, Chiquimula, Guatemala.

Las muestras se recolectaron de animales faenados y fueron analizadas mediante las variables color (verde olivo), olor (aromático), pH (6.57), potencial de óxido reducción (19.88), densidad relativa (1.017 a 30° C) y UFC/ ml. De las bacterias recolectadas se sembraron las colonias que presentaran características morfológicas deseadas y luego se realizaron pruebas bioquímicas para identificar la colonia aislada.

Con la bacteria aislada, se fermentó a 42° C durante 32 horas en caldo MRS; al termino de este proceso, todo el caldo fue distribuido en tubos de ensayo para ser centrifugado a 14000 rpm. El sedimento se lavó con agua estéril y se almacenó en frascos ámbar, donde luego se le adicionó agua desmineralizada (65%), aceite de oliva (30%) y Tween 20 (5%). Se realizó una cuantificación por dilución donde se obtuvieron crecimientos promedios de 6.5; en 10^8 fue de 4; para 10^9 se obtuvieron 2 y para 10^{10} fue 5 UFC de *Lactobacillus acidophilus*.

Después del aislamiento se elaboró un producto que presentó un crecimiento a mayor dilución y que puede considerarse como aceptable, recomendándose realizar en futuras investigaciones la evaluación de los *Lactobacillus acidophilus* en el ensilado de napier para determinar su efecto en la calidad nutricional del ensilado.

I. INTRODUCCIÓN

Las graves deficiencias en la disponibilidad de forrajes y calidad de los mismos es una problemática que afronta el sector pecuario en el oriente del país. El empleo de algunos desperdicios orgánicos, en la alimentación animal derivados de las actividades agroindustriales y pecuarias, no solo ha ofrecido la posibilidad de incrementar la eficiencia productiva y económica de las explotaciones animales, sino que también la posibilidad de abatir, de manera importante, las dificultades de contaminación ambiental. Este último, particularmente, aplicable al empleo de subproductos de origen animal en la alimentación de rumiantes, y de algunos de los cuales se conoce ampliamente su potencial nutricional, tal es el caso de las excretas de pollo de engorda y gallinas de postura, harinas de plumas, de sangre y de hueso, contenido ruminal, entre otros.

El contenido ruminal (ruminaza) es un desecho obtenido del faenado en los mataderos y representa el alimento no digerido por los animales bovinos, ovinos y caprinos, que es desechado al momento de sacrificarlos. Se estima que en el rastro municipal de Chiquimula, desechan 500 Kg semanales, haciendo un promedio de 20 Kg por animal.

El rumen es un ecosistema anaeróbico que presenta características muy particulares de pH, temperatura y una inmensa población de microorganismos, como protozoos hongos y bacterias que están en simbiosis con el animal hospedero. En la medida que el hombre pueda manipular estos microorganismos, se hará de los hospederos animales más eficientes y se logrará una mejor respuesta técnica a la deficiente alimentación.

Esta investigación forma parte del proyecto: “Caracterización física, química y microbiológica de la ruminaza de bovinos llevados a matadero”, que permite usar los Lactobacilos aislados de la ruminaza como aditivo en el proceso de ensilaje siendo una alternativa para mejorar considerablemente la calidad del ensilado.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de bovinos en el oriente de Guatemala, presenta el problema de la disponibilidad de forrajes y la calidad de los mismos, que decaen considerablemente en la época seca, afectando, significativamente, la productividad de los sistemas, teniendo que recurrir a los alimentos balanceados, los cuales han incrementado su costo. Una opción para reducir el efecto de esta situación es el uso de forrajes ensilados, sin embargo, algunas veces no se dispone de los recursos forrajeros necesarios para producir ensilados de buena calidad.

Una alternativa es el uso de la ruminaza que es considerada un desecho obtenido del faenado del ganado bovino, pero por su alto contenido de flora microbiana, este desecho, también puede ser una opción como un inoculante para ensilados.

En la ruminaza, se encuentran bacterias benéficas como los Lactobacilos que se pueden utilizar en inóculos para aplicarse en ensilajes pero se tiene poca información a nivel local, sobre el efecto de estas bacterias como inoculante, estas puede variar la calidad química de los ensilajes, a niveles absolutos o relativos necesarios para obtener un producto conservado de buena calidad nutricional.

III. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda incesante de fuentes alimenticias que contribuyen a incrementar la eficiencia productiva y económica de la explotación animal actual, promueve la necesidad de nuevas alternativas de alimentación para los animales. Siendo una de ellas el aprovechamiento de los desechos de matadero, como la ruminaza, que se han clasificado como una opción valiosa de recursos proteicos para la alimentación animal.

Las opciones que tiendan a reducir la contaminación ambiental causada por los desechos de matadero, en especial la ruminaza, ha resultado en una serie de investigaciones para aprovecharlo en la alimentación de diferentes especies, entre las cuales se tiene a los bovinos y los cerdos, o en su defecto, como inoculador para ensilados. El uso adecuado de inoculadores redunda en el beneficio de manipular adecuadamente los microorganismos benéficos de la ruminaza que pueden ser aprovechados para mejorar la digestibilidad de la alimentación de los animales.

El presente trabajo forma parte del proyecto “Caracterización física, química y microbiológica de la ruminaza de bovinos llevados a matadero.” Determina el potencial de los Lactobacilos como inoculante para ensilado, información que servirá de base para que los productores, mejoren la calidad nutricional y contribuyan en buena medida a disminuir la contaminación ambiental provocada por éstos desechos en los rastros.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar, aislar e identificar los Lactobacilos de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula.

Objetivos específicos

Identificar las características físicas y químicas del contenido ruminal en fresco en términos de color, olor, densidad, pH y potencial de óxido reducción.

Determinar la proporción de las bacterias lácticas en el contenido ruminal en función del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

Desarrollar un inóculo a nivel *in vitro*, en base a las bacterias ácido lácticas aisladas de la ruminaza, para su posterior utilización en el proceso de ensilaje.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Marco conceptual

5.1.1 Características generales del rumen

Según Navas (2001); el contenido del rumen y retículo es de aproximadamente de 30-60 Kg en los bovinos. Posee una temperatura que se encuentra en un rango entre los 39 – 40° C.

El alimento y los productos de la fermentación se acomodan en tres capas dependiendo de su gravedad y peso específico:

- **Capa gaseosa.** Se localiza en la parte superior y en ella se encuentran los gases producidos durante la fermentación de los alimentos.
- **Capa sólida.** Está formada principalmente por alimento y microorganismos flotantes.
- **Capa líquida.** Se localiza ventralmente y contiene líquido con pequeñas partículas de alimento y microorganismos suspendidos.

Color

Para Kouva (1994); el color de un contenido ruminal de un animal sano es de color verde olivo. La cual es la coloración normal del contenido ruminal puede variar en un animal normal, del verde olivo, al pardo verdoso y hasta el grisáceo verdoso, de acuerdo con el tipo de alimentación suministrada (Núñez Ochoa & Bouda, 2007). Un color plomizo lechoso (grisáceo verdoso) indica sobrecarga por consumo de granos (acidosis), el color negruzco (negro verdoso) revela reflujo abomasal por la putrefacción de la ingesta y el exceso de proteínas (Contreras y Noro 2010).

Olor

El olor del contenido ruminal sano es aromático (Kouva 1994). Algunos autores establecen que en bovinos sanos, el contenido ruminal es aromático penetrante similar al del ensilaje. En inactividad de la flora ruminal el olor es más suave e indiferenciado (amoniacal). Un olor ácido fuerte se presenta en acidosis ruminal y también en un olor rancio pútrido por putrefacción proteica (Contreras y Noro 2010).

pH

Son varios los factores que intervienen para cambiar el pH en el rumen. La naturaleza de la dieta suministrada es factor determinante en las fluctuaciones del pH ruminal, aunque los rumiantes poseen un sistema altamente desarrollado para mantener el pH dentro de los límites fisiológicos 5.5 a 7,3 (Falla 1994).

Para Kouva (1994); los ácidos importantes son el ácido acético, propiónico y butírico. Cuando el pH es de siete la proporción es mayor de ácido acético; por el contrario al encontrarse con un pH ruminal de 5.5 la proporción de mayor presencia es la del ácido butírico.

El pH ruminal también varía por el tipo de alimento suministrado al animal, por ejemplo las raciones ricas en fibras (pasto) pueden dar como resultado un pH de siete. En el caso de una dieta a base de carbohidratos (concentrados), el pH podría ubicarse en un seis (Kouva 1994).

El consumo excesivo de carbohidratos rápidamente fermentables, dietas ricas en granos o que no promuevan la salivación, da como resultado el aumento de la concentración de ácido láctico que pueden resultar en una repentina baja de pH a nivel de 4.6; pero la magnitud de la disminución del pH debido a un aumento en la tasa de

fermentación ruminal dependerá de la capacidad búfer del rumen (Araujo y Vergara 2007).

Dado el caso, que el ambiente ruminal posee un sistema buffer eficiente, basado en la presencia de los ácidos orgánicos, carbonatos y fosfatos salivales. Adicionalmente ayuda el amonio a concentraciones de 12 mmol/L o mayor. La presencia de estos últimos es provocada por el consumo de forraje a partir de la formación del bolo alimenticio (Contreras y Noro 2010).

Cabe agregar que durante el ayuno prolongado se eleva el pH ruminal, se inhibe el crecimiento de las bacterias que convierten el lactato en ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y deja el ecosistema ruminal más susceptible a la acidosis severa; cuando el animal es realimentado, tiende a comer más rápidamente y en mayor cantidad, originándose un doble efecto para bajar el pH, mayor producción de AGCC y ausencia de bacterias capaces de convertir lactato en AGCC. Esto conlleva a establecer condiciones fisiopatológicas como el incremento del ácido láctico, hiperosmolaridad, y acidemia sistémica. La habilidad del rumen para absorber AGCC ayuda a mantener el pH (Araujo y Vergara 2007).

Ahora bien, una fibra larga estimula la rumia y la secreción salival, mientras que la fibra corta no puede ser mantenida en el rumen largo tiempo, disminuyendo la digestibilidad y el pH. En el nivel de consumo, cuando los animales aumentan el consumo, más material fermentable está entrando al rumen, hay una mayor producción de ácidos orgánicos y baja el pH (Araujo y Vergara 2007).

Densidad

Los parámetros fisiológicos de bovinos *in vivo*, es de 1.022 y 1.055, con una media de 1.036 sin temperatura determinada No es el caso de bovinos en pastoreo, que se les encontró una densidad del contenido ruminal de 0.80- 0.90, siendo considerablemente

menores que los ya mencionados. Los datos acerca de la materia seca y la densidad están sujetos a error, dado que el contenido del rumen del ganado vacuno alimentado con forraje tiende a estratificarse. El saco dorsal tendrá un contenido más alto de las partículas alimenticias menos densas, mientras que el contenido de los sacos ventral y craneal tiende a tener de mayor densidad (Church 1974).

El tamaño de las partículas también influye directamente en la densidad ruminal, por lo tanto deben cumplir ciertos criterios antes de poder salir del rumen: a) reducción del tamaño; b) reducir la flotabilidad; y c) aumentar la gravedad específica funcional (GEF) y las posibilidades de abandonar el rumen aumentan con el tiempo de residencia. Las partículas que contienen más fibra indigerible y menos nitrógeno, son más pesadas y alcanzan una GEF más rápidamente y abandonan el rumen más pronto y las partículas del alimento que contienen más fibra neutro detergente (FDN) digestible permanece mayor tiempo en el rumen debido a esta retención selectiva. Las partículas en fermentación atrapan gas y reducen su gravedad específica funcional, permaneciendo más tiempo en el rumen; entonces la digestibilidad potencial y la densidad están inversamente relacionadas (Araujo y Vergara 2007).

Potencial de óxido reducción

El ambiente intraruminal es anaerobio por excelencia lo que indica que se encuentra constantemente en condiciones de reducción. La baja en la concentración de oxígeno en el rumen, según lo indica un potencial negativo de oxidación considerado como normal de -350 milivoltios (mV) y varía entre un rango de -450 y -250 mV en muestra tomada en bovinos in vivo (Contreras y Noro 2010).

El potencial de óxido reducción (redox) es una medida de la actividad de electrones y está relacionado con el pH y el contenido de oxígeno, siendo análogo al pH, ya que este mide la cantidad de protones y el potencial de redox de los electrones. Un

potencial de redox positivo y de alta magnitud, es de un indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de oxidación y uno negativo, de baja magnitud, es de un ambiente reductor (Contreras, Pedro A.; Noro, Mirela, 2010). Las características reductivas del fluido ruminal pueden usarse como un índice de la tasa de fermentación (Araujo y Vergara 2007).

El potencial de redox afecta la actividad metabólica de los microorganismos, los microorganismos aerobios estrictos tienen un metabolismo activo en potencial redox positivo, mientras que los anaerobios estrictos demuestran actividad metabólica solo en potenciales redox negativos. El potencial redox negativo del rumen es responsable que los hidratos de carbono sólo se degraden hasta AGVs y no hasta CO_2 y agua, de manera que la energía contenida en los AGVs quede disponible para el rumiante (Contreras y Noro 2010).

Cuadro 1. Características físicas y químicas del contenido ruminal

Características	Ingestión	Acidosis aguda	Acidosis crónica	Alcalosis	Putrefacción	Normal
Color	Pardo verde oscuro	Lechoso gris	Grisáceo verdoso	Pardo verde	Negro verdoso	Verde olivo
Olor	Mohoso	Ácido picante	Ácido	Amoniacal	Amoniacal podrido	Aromático
Viscosidad	Acuoso	Acuoso	Líquido viscoso	Variable	Pastoso espumoso	Líquido viscoso
Sedimentación	Rápida	Rápida y tardada	Rápida	Variable	Sin separación	8 minutos
Flotación	Falta	Falta	Falta	Variable	Falta	8 minutos
pH	6.8- 7.2	3.8- 4.5	5-6	7.3- 8	7.5- 8.5	6- 7
AGV*	Bajos	Muy bajos	bajos	Bajos	Muy bajos	80-120 m mol/L
Ac. Red	> 8	Falta	> 8	> 8	> 8	3-6 minutos

Fuente: Kouva 1994.

Calidad del contenido ruminal

Según Falla (1994); para el manejo adecuado y de calidad del contenido ruminal, se están implementando los procesos para la utilización de este en la alimentación animal; uno es el industrial para la obtención de un producto final denominado Harina Forrajera (HF), otro sería del tipo semi- industrial para la fabricación de los denominados bloques nutricionales y otro es el artesanal que es la obtención para ser utilizados dentro de los procesos de ensilajes como inoculantes.

5.1.2 Uso del contenido ruminal

Harina Forrajera (HF) o contenido ruminal deshidratado

Falla (1994) describe que el contenido ruminal puede ser procesado en la planta de subproductos de matadero, en forma similar al procesamiento de la sangre (deshidratación), con la diferencia de que en este proceso no se adiciona tipo alguno de desperdicio. El producto obtenido es utilizado en la industria de los piensos balanceados para ser incluidos en la formulación de algunas dietas alimenticias. Utilizando por el aporte energético y de aminoácidos azufrados que incluye dentro de su valor nutricional.

Bloques nutricionales

Falla (1994) también describe este tipo de alimentación como una alternativa del uso del contenido ruminal para aquellos mataderos de baja capacidad de matanza. Este

suplemento está constituido por una parte fibrosa (contenido ruminal), una base proteica (urea 46.6% de Nitrógeno no proteico), una parte energética (melaza; subproductos de refinación de los líquidos de la caña de azúcar), una parte mineral (hueso calcinado; 30% de Calcio y 15% de Fósforo) y sales minerales y un aglutinante (cemento; melaza de Bauxita y caliza) o Cal (Carbonato de Calcio). Estos compuestos dependiendo de factores tales como requerimientos nutricionales, consumo óptimo y la disponibilidad de estos ingredientes en la zona de trabajo varían su proporción en la mezcla.

Inoculante orgánico para silos

El contenido ruminal sin ser procesado puede ser utilizado como inoculante para los silos. Este es utilizado al transcurrir poco tiempo después de faenado el animal por el tiempo de vida que estos microorganismos tienen dentro del rumen. El contenido ruminal es adicionado dentro de los ingredientes de los silos; se le adiciona ingredientes ricos en glucosa para la alimentación de las bacterias que servirán para mejorar la calidad del alimento ensilado. (Falla 1994).

5.1.3 Población microbiana del rumen

Para Shimada (2009), es precisamente la presencia de microorganismos en el rumen lo que confiere al animal sus características digestivas diferenciales con respecto a otros mamíferos domésticos. El aprovechamiento de nitrógeno no proteico para su conversión en aminoácidos y proteínas microbianas, síntesis de la gran mayoría de las vitaminas hidrosolubles, producción y utilización de ácidos grasos de cadena corta como fuente de energía metabólica de compuestos químicos presentes en el alimento.

Según Montalbetti, (2002); las bacterias constituyen la mitad de la biomasa en el rumen normal y son responsables de la actividad metabólica. Los hongos constituyen hasta el 8% de la biomasa intraruminal y se ubican en la ingesta de lento movimiento evitando su rápido lavado y contribuyen a la digestión de forrajes de baja calidad. Los protozoos son los organismos más notables en el rumen, forman gran proporción de la biomasa, entre un 20 – 40 %, pero su contribución es menor por la gran retención y la menor actividad metabólica. Su tiempo de generación es grande y la sobrevivencia en el rumen depende de las estrategias que reducen el lavado.

El crecimiento y multiplicación de los microorganismos va acompañada de la muerte y autólisis de otros, de modo que en el rumen siempre existen células vivas, muertas y dañadas. Todas estas células formadas por la transformación de los nutrientes de la ración, pasa con los productos de la digestión al abomaso e intestino, donde son digeridas por el animal hospedador al mismo tiempo que los residuos de los alimentos no degradados, incrementando así la proporción de proteína de origen microbiano en el alimento. (Montalbetti 2002).

5.1.3.1 Población de hongos en el rumen

Para Montalbetti (2002); los flagelados poseen zoosporas móviles y colonizan regiones dañadas de los tejidos vegetales en las dos horas de la digestión, en respuesta a las materias solubles. En 22 horas, más del 30% de las partículas mayores se ven invadidas por rizoides. Su rol principal es facilitar la separación de la pared celular de la célula vegetal. Según Shimada (2009); la forma de atacar las partículas alimenticias es de adentro hacia afuera (en contraste con las bacterias, que lo hacen en dirección opuesta), tienden a hidrolizar las fracciones de fibra (aunque no digieren la lignina, contribuyen a la ruptura del complejo lignocelulósico de la pared celular) y aportan cerca de 5% de la proteína de origen microbiano.

Se han identificado especies de cuatro géneros: *Neocallimastix*, *Caecomyces* (formalmente *Sphaeromoma*), *Pyromces* (formalmente *Phyromonas*) y *Orpinomyces*. Su ciclo de vida implica un cuerpo fructificante (esporangio) originado a partir de una zoospora móvil que se adhiere a las fibras y desarrolla esporangios y filamentos rizoides, que penetran la matriz lignocelulósica, donde actúan las enzimas. Los hongos liberan un complejo celulósico más rápidamente que las bacterias. Alimentos altamente molidos o concentrados presentan menos hongos. Los hongos producen Ácidos Grasos Volátiles (AGV), gases y trazas de etanol y lactato. (Montalbetti 2002).

5.1.3.2 Población de protozoos en el rumen

Según Montalbetti (2002); su principal función es ingerir partículas del tamaño de las bacterias, de azúcares solubles y transformar 80% de ellos en un polisacárido de estructura similar al almidón. Se piensa que esta función protege al rumiante al disminuir el riesgo de acidosis.

Para Shimada (2009); la población de protozoos en el rumen es muy variable, se sabe que hay desde sólo unos 100 mil, hasta dos millones por mililitro en los casos de mayor abundancia. La mayoría de los componentes son del género Ciliata, los organismos unicelulares más complejos. Su biomasa es similar a la de las bacterias, pero pueden sobrepasarlas más de tres veces según la dieta, o inclusive, desaparecer.

Las diferentes especies varían en tamaño, entre 25 a 250 micras, agrupándose en 17 géneros de la sub clase Entodiniomorpha y dos géneros de la sub clase Holotriches, que difiere de su morfología y metabolismo. Los tiempos de generación oscilan entre 0.5 a 2 días. Los más lentos pueden llegar a desaparecer con los fluidos del rumen, varios permanecen adheridos a fragmentos de alimentos, por lo que son más retenidos que las bacterias y una gran parte pueden ser lisadas en el rumen. Las especies presentes varían con la especie animal, la localidad y la dieta. Su tamaño

reducido junto con su reducida población hace que contribuya sólo en forma moderada a la biomasa de origen protozoario. (Shimada 2009).

Los ciliados del rumen parecen encontrarse sólo en los rumiantes, de forma de contraste con algunas especies bacterianas del rumen, no pueden obtenerse de otras fuentes naturales más que de las ingestas del rumen o materiales tales como saliva, recién contaminada con ingestas del rumen. La mayoría de los protozoarios son celulolíticos y algunos de ellos, como los entodinomorfos, producen más alfa-amilasa y maltasa que las bacterias. La población de protozoos aumenta al incrementarse el nivel de proteínas de los alimentos. (Shimada 2009).

- **Ciliados celulolíticos:** pocos géneros de *Epidinium* están implicados en la fragmentación de los restos vegetales. Estos segregan enzimas que causan la separación de las células y la fragmentación del material. Más de la mitad de la actividad celulolítica del rumen se asocia con los ciliados. La mayor actividad se da cuando la enzima es liberada luego de la lisis celular que ocurre por exposición al O₂ en la ruminación o por hipotonía causada luego de la ingestión de agua.
- **Ciliados amilolíticos:** todos los Entodiniomorphes usan almidón cuyo exceso almacenan como amilopectina. Pero uno de los dos géneros *Holotriches* no puede usar almidón. La mayoría prefiere azúcares solubles y se mueven rápidamente hacia ellos.

Otras fuentes de energía: los ciliados son responsables del 30-40% de la lipólisis. Incrementan el contenido de ácidos grasos saturados. Un 75% de los lípidos microbianos están normalmente asociados con los ciliados. No son muy importantes en la degradación de proteínas de la dieta, usan las de las bacterias fagocitadas. El rumen es un complejo ecosistema, el cual se encuentra en forma dinámica, influenciado por el ingreso desde el exterior del alimento, agua, otros microorganismos, etc., la salida de los materiales al intestino, y por las complejas interacciones que se dan dentro de este. (Montalbetti 2002).

Shimada (2009) menciona algunos factores que afectan a la población protozoaria son el tipo de alimento (los holotricos aumentan en número al emplear forrajes y los entodinomorfos al usar granos), la cantidad y calidad del alimento (al incrementarse uno u otro, aumentan los protozoos), la frecuencia de la ingestión, la presencia de sal (un exceso disminuye el número y tamaño de los protozoos), el oxígeno (cuya presencia causa la muerte), el pH (cuando es pequeño afecta su crecimiento), también los alimentos sometidos a procesamiento (molido fino o formación de pastillas), disminuye la población al aumentar la velocidad de paso de la ingesta, incrementar la fermentación y disminuir el pH.

Otros factores son los tratamientos térmicos que gelatinizan los granos y favorecen el crecimiento de las bacterias a costa de los protozoos y la inclusión de ciertos aditivos químicos tales como clortetraciclina, tilosina, aureomicina, penicilina o dietilbestrol en la dieta, pueden causar un incremento de los protozoos ruminales (Shimada 2009).

5.1.3.3 Población de bacterias en el rumen

El rumen contiene una gran variedad de bacterias, casi todas son anaerobias no esporuladoras, unas pocas especies son anaerobias facultativas y ocasionalmente se detectan bacterias anaerobias que forman esporas. Realizan varias de las funciones vitales para el desarrollo del huésped. Las fibras y otros polímeros insolubles vegetales que no pueden ser degradados por las enzimas del animal son fermentados a AGV, principalmente acético, propiónico y butírico, y a gases CO_2 y CH_4 . Los AGV atraviesan las paredes del rumen y pasan a la sangre, luego son oxidados en el hígado y pasan a ser la mayor fuente de energía para las células (Montalbetti 2002).

La fermentación esta acoplada al crecimiento microbiano y las proteínas de la biomasa constituyen la principal fuente de nitrógeno para el animal (Shimada 2009).

Además de las funciones digestivas, los microorganismos del rumen sintetizan aminoácidos y vitaminas, principalmente del complejo B, siendo la principal fuente de esos nutrientes esenciales para el animal. También algunas bacterias degradan componentes tóxicos de la dieta como los aminoácidos mimosina y sus derivados, componentes del forraje de *Leucaena*, fenoles vegetales como la cumarina (1,2 benzopirona), la canavanina, análoga a la arginina, componente de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, que inhibe algunas bacterias del rumen, pero es hidrolizada por otras (Montalbetti 2002).

Para Shimada (2009) la población es variable, se sabe que es de 5000 a 20000 millones por gramo de contenido ruminal. Su tamaño es de cuatro micras promedio. Son exclusivas del tubo digestivo, principalmente del retículo- rumen, las mismas especies están presentes en el intestino grueso aunque en concentraciones de sólo 10 a 1000 millones por gramo de digesta.

Según Montalbetti (2002) el rumen incluye entre 10^{10} y 10^{11} bacterias/ml, y más del 75% se asocia a partículas alimenticias. La densidad general no varía con la dieta, pero el número de las diferentes especies está afectado a la disponibilidad del sustrato para la fermentación.

Para Montalbetti (2002) las bacterias muestran una gran diversidad de géneros y especies, lo que refleja la diversidad de alimentos existentes. Al igual que las partículas del contenido ruminal las que se adhieren a los alimentos se encuentran en forma estratificada. De acuerdo con el sustrato pueden ser gran negativas (como las que fermentan forrajes) o gran positivas (principalmente las que desdoblan granos como los *Lactobacilos*).

Un grupo de bacterias como sustrato nutrientes, como la celulosa, almidón o glucosa, y un segundo grupo fermentan los productos metabólicos formados por el primer grupo, hasta ácido láctico. La cantidad total de bacterias y la relación relativa de las diversas especies, varían de acuerdo con la ración consumida por el animal; las raciones ricas en alimentos concentrados estimulan los altos recuentos bacterianos totales y favorecen el desarrollo de *Lactobacilos* (Shimada 2009).

La mayoría de los tipos de bacterias del rumen se adhieren a la superficie de las partículas de alimento, y algunas lo hacen sobre el epitelio del rumen. Esta unión de las bacterias a las superficies es beneficiosa para el animal hospedero, ya que las bacterias libres, no adheridas, tienden a ser arrastradas a un ritmo demasiado rápido, antes de que su actividad sea completamente realizada. (Bondi 1988).

La mayoría de las especies bacterianas han sido encontradas sólo en el rumen, sin embargo, muchas especies similares o idénticas se han encontrado presentes en otros entornos como en el aparato gastrointestinal de mamíferos no rumiantes, sedimentos orgánicos de aguas naturales y lodos de aguas residuales. Muchas de las bacterias del rumen son altamente especializadas, poseen numerosos requerimientos nutricionales que le deben hacer aportados por el sistema. Otras, por el contrario, emplean pocas fuentes de energía y otro grupo son más inconstantes en el requerimiento de energía. (Grudsky *et al* 1983).

Cuando dos o más microorganismos combinan sus capacidades metabólicas para degradar una sustancia que no puede ser catabolizada en forma individual por ninguno de los dos se llega al concepto de sintrofia, en el rumen existen grupos sintróficos relacionados a la degradación de fibras, incluyendo, por ejemplo a los celulolíticos, hemicelulolíticos y los microorganismos que suelen, como las bacterias metanogénica. Los más competitivos presentan adhesión al sustrato y almacenamiento de energía dentro de la célula. (Montalbetti 2002).

Cuadro 2. Características de algunas bacterias del rumen

Organismo	Morfología	Sustrato	Productos de fermentación
<i>Fibrobacter succinogenes</i> *	Bacilo	Celulosa	Succinato, acetato, formiato
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> *	Bacilo	Celulosa	Acetato, formiato, lactato, butirato, H ₂ y CO ₂
<i>Ruminococcus albus</i> *	Coco	Celulosa	Acetato, formiato, H ₂ y CO ₂
<i>Clostridium lochheadii</i>	Bacilo (espora)	Celulosa	Acetato, formiato, butirato H ₂ y CO ₂
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Coco	Celulosa	Acetato, succinato y H ₂
<i>Clostridium polysaccharolyti-cum</i>	Bacilo (espora)	Celulosa y almidón	Acetato, formiato, butirato y H ₂
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Bacilo	Almidón	Formiato, acetato y succinato
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Bacilo	Almidón	Formiato, acetato y succinato
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Bacilo curvado	Almidón	Acetato, propionato y lactato
<i>Succinomas amylolytica</i>	Ovalado	Almidón	Acetato, propionato y succinato
<i>Streptococcus bovis</i>	Coco	Almidón	Lactato
<i>Selenomonas lactilytica</i>	Bacilo curvado	Lactato	Acetato y succinato
<i>MegaspHaera elsdenii</i>	Coco	Lactato	Acetato, propionato, butirato, valerato, coproato, H ₂ y CO ₂
<i>Viellonella párvula</i>	Coco	Lactato	Acetato, propionato y H ₂
<i>Lachnospira multiparus</i>	Bacilo curvado	Pectina	Acetato, formiato, lactato, H ₂ y CO ₂
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Bacilo	Lipolítico	Acetato, propionato y succinato
<i>Eubacterium ruminantium</i>	Bacilo	Xilano	Formiato, butirato, lactosa y CO ₂
<i>Lactobacillus ruminis</i>	Bacilo	Azúcares	Lactosa
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	Bacilo	Azúcares	Lactosa
<i>Methanobrevi- bacter ruminantium</i>	Bacilo	Metanógenos	CH ₄ (de H ₂ + CO ₂ o formiato)
<i>Methanomicro-bium mobile</i>	Bacilo	Metanógenos	CH ₄ (de H ₂ + CO ₂ o formiato)
<i>Eubacterium oxidoreducens</i>	Bacilo	Aromáticos	Lactosa y H ₂
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Bacilo a cocoide	Azúcares	Succinato, Acetato y Formiato.
<i>Bacteroides amylophilus</i>	Bacilo	Azúcares	Succinato, Acetato, Lactosa y Formiato.
<i>Veillonella alcalescens</i>	Cocos	Lactato	Acetato y Propionato
<i>Clostridium longisporum</i>	Bacilo	Azúcares	-----
<i>Borrelia sp.</i>	Espiroqueta	Glucosa, lactato y glicerol	-----
<i>Cillibacterium cellulosolvens</i>	Cocoide	Azúcares	-----
<i>Butyrivibrio lactacidogens</i>	Bacilo curvado	Glucosa, xilano, almidón	-----
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	Espirales	Glucosa	Acetato, Succinato y Lactato
<i>Barcina bakeri</i>	Cocos	-----	-----
<i>Treponema bryantii</i>	Espiroquetas	Azúcares	-----
<i>Fusocillus sp.</i>	-----	Lípidos	-----
<i>Micrococcus sp.</i>	Cocos	Lípidos	-----
<i>Methanobacterium formicicum</i>	Bacilo	Lípidos	-----
<i>Ruminococcus bromii</i>	Coco	Lípidos	-----

Fuentes: Montalbetti A. 2002.

Identificación de las bacterias del rumen

Para; existe una variedad de criterios utilizados para la identificación de las bacterias ruminales.

- **La Morfología (forma- tamaño) se usa para identificar numerosas especies, sin embargo muchas de las especies son similares en la identificación en base a este criterio solamente, debido a que la mayoría de las especies son cocáceas. Otras formas bacterianas que se encuentran son espiroquetas, rosetas, tetracocus, sarcinas, etc. Otro inconveniente para identificar sólo por morfología, es el hecho de que existen cepas que modifican su forma dependiendo del medio en que se encuentran.**
- **La Motilidad es otra característica que permite identificar ciertas especies.**
- **Tinción: la tinción de Gram es también usada como método de identificación, pero más útil resulta el uso de varios procesos de tinción y la utilización del microscopio electrónico de transmisión y el de barrido.**

La identificación también puede efectuarse parcialmente por estudios de tipo metabólico, como por ejemplo: principales(es) sustrato(s) atacado(s), fuentes de energía utilizadas, nutrientes requeridos para desarrollarse en medios de cultivo, etc. Sin embargo, existe mucha superposición entre las diferentes especies al utilizar estos métodos. (Grudsky *et al* 1983).

Clasificación de las bacterias del rumen

Grudsky *et al* (1983); dan diversas clasificaciones de las bacterias ruminales basándose principalmente en los sustratos utilizados y en los productos principales de la fermentación.

- **Bacterias celulolíticas:** la degradación de la celulosa es la principal función del rumen. Las bacterias activas en el rumen se adhieren a fragmentos vegetales y segregan sus enzimas hidrolíticas que liberan oligosacaridos solubles, principalmente celobiosa, utilizada por la microflora celulolítica y por otros microorganismos que no degradan la celulosa. Si esta no se hidroliza puede producirse una inhibición de otro grupo de bacterias al no estar presentes el sustrato que requieren. Es posible que la glucosa, otro producto de la celulolisis, pueda inhibir la actividad de algunas enzimas también degrada la fracción mal llamada hemicelulosa. Las bacterias celulolíticas colonizan la superficie de restos vegetales en las entradas al rumen. Ante la existencia de amonio ellas se multiplican rápidamente. Por esto el agregado de urea al alimento favorece esta multiplicación.
- **Bacterias amilolíticas:** la mayoría de ellas no usan la celulosa. Las enzimas amilolíticas se encuentran muy distribuidas entre las bacterias y son las que aseguran la conversión de materiales amiláceos, como granos de cereales, en AGV. Con la presencia de amonio el proceso es más eficiente.
- **Bacterias que utilizan azúcares:** la mayoría de las bacterias que son capaces de utilizar polisacáridos, son también capaces de utilizar disacáridos o monosacáridos.
- **Bacterias que utilizan ácidos:** un gran número de bacterias utilizan ácido láctico, no obstante este ácido no está presente en cantidades apreciables en el rumen, excepto en condiciones anormales. Otras bacterias utilizan ácido succínico, málico y fumárico, así como también utilizan ácido fórmico y ácido acético, pero probablemente no como fuentes primarias de energía. También el ácido oxálico es descompuesto por bacterias ruminales. Ejemplo de bacterias que utilizan lactato: *Veillonella gazogenes*, *Veillonella alcalescens*, *Propionibacterium sp.*, *Desulpho vibrio* y *Selenomona lactilytica*.

- **Bacterias proteolíticas:** cierto número de bacterias ruminales utilizan aminoácidos como fuentes primarias de obtención de energía. Ej: *Bacteroides amylophilus*, *Clostridium porogenes* y *Bacillus licheniformis*, son tres especies que tienen reconocida capacidad proteolítica.
- **Bacterias productoras de amonio:** algunas especies bacterianas producen amonio a partir de distintas fuentes. Ej.: *Bacteroides ruminicola*, *Selenomona ruminantium*, *Peptostreptococcus elsdenii* y algunos *Butyrivibrios*.
- **Bacterias que producen metano:** las principales son *Methanobacterium ruminantium* y *Methanobacterium formicum*, de menor importancia son, *Methanobacterium sohngenii*, *Methanobacterium suboxydans* y *Methanobacterium sp.*
- **Bacterias lipolíticas:** existen bacterias que utilizan glicerol y lo hidrolizan. Otros microorganismos hidrogenan ácidos grasos insaturados y algunos metabolizan ácidos grasos de cadena larga a cetonas. Ejemplos de bacterias lipolíticas son: *Selenomona ruminantium* y *Anaerovibrio lipolítico*.
- **Bacterias sintetizadoras de vitaminas:** especial importancia tienen las bacterias sintetizadoras de vitaminas del complejo B. Ej.: *Selenomona ruminantium*.

5.1.4 Inoculante

La adición de inoculantes microbiales homofermentadores ayuda a disminuir más rápido el pH, inhibiendo otras bacterias y conservando la proteína de la planta. Actualmente la mayoría de inóculos son seleccionados de grupos de bacterias ácido lácticas, siendo los lactobacilos los más importantes. Ya que estas son anaerobias facultativas y pueden utilizar muchos carbohidratos como fuente de energía, produciendo ácido láctico como producto final. La capacidad de los lactobacilos de crecer rápidamente y tolerar ambientes ácidos, explica su efectividad para habitar en el tracto digestivo de muchas especies de animales. (Acevedo y Buitrago 2008).

Una rápida disminución en el pH y un bajo pH al final puede inhibir las bacterias de *Clostridium* que producen ácido butírico. Normalmente menos ácido acético, butírico, y etanol es producido durante la homofermentación, la cual mejora la recuperación de la materia seca entre un 2 a 3 % comparado con la heterofermentación. Además, los inoculantes homofermentativos pueden mejorar el desempeño animal en un 3 a 5%. Lo más importante de los inoculantes es la cantidad de bacterias productoras de ácido láctico vivas por unidad de cultivo (dosis de inoculación). Un producto debe asegurar al menos 9×10^{10} bacterias productoras de ácido láctico vivas por tonelada de cultivo o bien 100,000 por gramo de cultivo. (Acevedo y Buitrago 2008).

Algunos productos dicen cuántas bacterias hay en la bolsa o envase, o cuantas bacterias hay por gramo de inoculante. En esos casos, se debe calcular la cantidad a aplicar dividiendo el número de bacterias que dice en el paquete entre el número de toneladas que el paquete puede tratar. Dosis de aplicación del inoculante mayores al mínimo puede ser mejor, aunque no siempre, porque hay diferencia en la actividad de las bacterias o bien en la estabilidad de la población bacteriana entre algunos productos en particular (Contreras- Gevea 2006).

Para Acevedo y Buitrago (2008); las *bacterias ácido lácticas*: Deben cumplir con ciertos criterios a la hora de seleccionárselas como inoculantes de ensilado:

- Tener una tasa rápida de crecimiento y ser capaz de competir y dominar organismos presentes en el ensilado.
- Ser homofermentativas
- Ser resistentes a los ácidos y producir rápidamente un pH final de 4.0.
- Ser capaces de fermentar glucosa, fructosa, sacarosa y de preferencia, fructosanos y pentosanos.
- No deben tener ninguna acción sobre ácidos orgánicos.
- Deben tener un buen crecimiento en un amplio rango de temperatura, de preferencia arriba de 50°C para sobrevivir a cualquier aumento de temperatura durante las primeras etapas del ensilaje.
- Deben carecer de actividad proteolítica.

Los inoculantes microbiales contienen bacterias seleccionadas para dominar la fermentación de los cultivos en el silo. Estos están divididos en dos categorías dependiendo de cómo fermentan un azúcar común en la planta, la glucosa. Los homofermentadores producen solo ácido láctico y dentro de ellos se encuentran especies de *Lactobacillus* como *Lactobacillus plantarum*, y especies de *Pediococcus spp.* y *Enterococcus spp.* La otra categoría, los heterofermentadores producen ácido láctico, ácido acético o etanol, y bióxido de carbono. *Lactobacillus buchneri* es el mejor ejemplo de un heterofermentador (Contreras- Gevea 2006).

Existen diferencias en funcionamiento entre cepas específicas de un organismo, por ejemplo: no todas las cepas de *Lactobacillus plantarum* crecen a la misma velocidad. Algunas cepas de *L. plantarum* pueden crecer mejor en alfalfa, otras mejor en maíz. Algunas cepas pueden crecer mejor bajo condiciones secas o con más alta temperatura que otras, etc. Debido a estas diferencias, es importante usar un producto específico para el cultivo a ensilar. Si el producto está etiquetado solo para maíz no lo use para alfalfa o viceversa (Contreras- Gevea 2006).

Existen diferencias entre la fermentación de microorganismos homofermentativos y heterofermentativos. Los homofermentativos son más eficientes en el uso de la energía que los heterofermentativos. Durante la homofermentación, cada molécula de glucosa produce dos moléculas de ácido láctico, una mayor recuperación de materia seca y poca pérdida de energía en el ensilaje. El ácido láctico es además un ácido fuerte que reduce más el pH en el ensilado que otros ácidos (Contreras- Gevea 2006).

El pH es más alto cuando la fermentación es dominada por heterofermentadores comparado con homofermentadores. Por cada molécula de glucosa usada en heterofermentación, es producida una molécula de ácido láctico, una de ácido acético o etanol, y bióxido de carbono. El bióxido de carbono sale del ensilaje como un gas, resultando en pérdidas de materia seca. El ácido acético no es un ácido fuerte como el láctico, y el etanol no tiene efecto en el pH (Contreras- Gevea 2006).

Cuando el material a ensilar es leguminoso o tenga baja cantidad de carbohidratos solubles y una mayor resistencia a bajar el pH que los pastos o el maíz, el inoculante a

utilizarse debe ser homofermentativo. En consecuencia, el ensilado de leguminosas tiende a tener un pH más alto que el ensilado de maíz y zacates, haciéndolos más susceptibles a una fermentación clostridial cuando se ensilan más húmedo (>65% de humedad). Un inoculante homofermentativo hace un uso más eficiente de los azúcares de la planta al bajar el pH, especialmente cuando el contenido de humedad esta marginalmente alto (Contreras- Gevea 2006).

Tecnología de la formulación

Acevedo y Buitrago (2008); también describen que algunas de las funciones primordiales de las formulaciones son:

- ✓ Estabilizar el organismo durante la producción, distribución y almacenamiento.
- ✓ Ayudar a la manipulación y aplicación del producto, así es fácilmente entregado a su destino de la forma más apropiada.
- ✓ Proteger el agente de factores ambientales perjudiciales, de esta manera se aumenta la persistencia.

Existe un amplio rango de formulaciones sólidas y líquidas, los tipos principales usados para microorganismos han sido clasificados en productos secos (polvos, gránulos y bloques) y suspensiones (base aceite o base agua y emulsiones). (Acevedo y Buitrago 2008).

En las formulaciones líquidas el microorganismo se lleva en un líquido, normalmente agua o aceite. El aceite se evapora mucho menos que el agua debido a la presión de vapor y a la viscosidad. (Acevedo y Buitrago 2008).

Los productos se previenen de la aglomeración con dispersantes, los surfactantes actúan como agentes mojables. Generalmente se utilizan aceites biodegradables como los aceites vegetales, (Acevedo y Buitrago 2008).

Emulsión aceite en agua

Las emulsiones han sido elaboradas con varios aceites dispersos en agua, este tipo de emulsión es conocida como aceite en agua. Con el fin de preparar emulsiones estables para cualquiera de los dos tipos, agua en aceite (Water/ Oil= W/O) o aceite en agua (Oil/ Water= O/W), además de los dos líquidos, es necesario que exista una tercera sustancia conocida como emulsificante o agente dispersante. (Acevedo y Buitrago 2008).

Lactobacilos

Son bacilo microaerófilos, gram positivos y catalasa negativos, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Los Lactobacilos homofermentativos dan lugar a ácido láctico como producto principal de fermentación. Este grupo está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*. Los Lactobacilos heterofermentativos producen además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y otros productos volátiles; *Lactobacillus fermenti* es heterofermentativo y es capaz además, de dar buen crecimiento a temperaturas elevadas de entre 45° C (Sorgensen 1959).

Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos; otros son algo parecido al colibacilo, pero, al contrario de este, todos son grampositivos. Casi todos son inmóviles, pero se han señalado excepciones. Muchos cultivos muestran una forma diplobacilar característica, a menudo reniforme. Frecuentemente los cultivos viejos muestran considerable pleomorfismo (Sorgensen 1959).

Los lactobacilos, son microaerófilos o anaerobios, pero después de cultivos continuos, algunas cepas pueden desarrollarse en presencia de aire. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, que menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15; en general, se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso. Estos requerimientos nutritivos variados tienen aplicación práctica en técnicas de dosificación microbiológica de vitaminas y de algunos aminoácidos, para los cuales son más sensibles que los métodos químicos disponibles (Sorgensen 1959).

Por los altos requerimientos nutricionales con los que cuentan los lactobacilos, deben ser inoculados en un medio selectivo enriquecido que es útil en el cultivo de *Lactobacillus* a partir de muestras clínicas, lácteos y alimentos. El medio basal se compone de peptonas de extracto de levadura y glucosa. Este medio se complementa con monooleato de sorbitán complejo (una fuente de ácidos grasos) y de magnesio para los requisitos de crecimiento adicionales. El acetato de sodio y citrato de amonio se añaden para inhibir la flora normal, tales como las bacterias gram-negativas, flora oral y hongos. Con la adición de ambos de estos agentes inhibidores, se ha demostrado que mejora el crecimiento de *Lactobacillus*. El pH se ajusta a 6.3 hasta 6.7, para favorecer el crecimiento de *Lactobacillus* (Sorgensen 1959).

La clasificación de los lactobacilos se ha basado en la fuente de donde se aislaron. Los lactobacilos, según los productos de fermentación de azúcar, se dividen en dos grupos. El grupo homofermentativo es el mayor y convierte casi completamente el azúcar fermentado en ácido láctico; el grupo heterofermentativo está constituido por formas que producen cantidades importantes de otros productos de fermentación, incluyendo bióxido de carbono, etanol y ácido acético (Sorgensen 1959).

La mayoría de las especies de lactobacilos tienen como resultado altos porcentajes de ácido láctico, los cuales oscilan entre 0.3 a 2.7; pero la especie *Lactobacillus helveticus* que puede llegar a producir aproximadamente 3% de ácido acético en la leche, considerándose como la especie con mayor producción. Dentro de la

clasificación de los homofermentativos el mayor tipo de ácido acético es el dextrógiro (D), y en las heterofermentativas producen ácido acético del tipo levógiro (L) o racémico (Sorgensen 1959).

Los lactobacilos no son perjudiciales, al contrario, muchas veces inhibe el desarrollo de los gérmenes nocivos, como el *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y tienen capacidad de producir sustancias como la proteinosa y la peptidosa, y con respecto a la acidificación se encarga de regularlo, rebajando el pH, por todas estas características y las señaladas en el desarrollo, los lactobacilos forman la parte esencial de la flora bacteriana tanto del queso como en la leche (Sorgensen 1959).

Todas las especies de lactobacilos fermentan la glucosa, galactosa y lactosa. Otros azúcares fermentados por los homofermentativos son la maltosa y la trealosa. En el caso de la especie *lactis*, fermenta la salicina y la sacarosa; los *acidophilus* transforman la salicina, maltosa, melibiosa, amigdalina y la celibiosa; el *casei* transformar todos los anteriores más el manitol y el sorbitol; el *plantarum* fermenta los mismos azúcares que el *casei* más la rafinosa (Sorgensen 1959).

En los heterofermentativos fermentan siempre la glucosa, galactosa y lactosa. Otro de los azúcares para fermentar es la maltosa y la melibiosa. Para el *fermentis* además de los anteriores es la trealosa y la melibiosa. Por el contrario la mayoría de las especies no transforman la xilosa y la arabinosa, utilizando como negativos al momento de realizar una batería con azúcares (Sorgensen 1959).

5.2 Marco referencial

5.2.1 Antecedentes

A nivel mundial son varias las universidades que han realizado investigaciones sobre las propiedades del contenido ruminal y los resultados que tiene dentro de la alimentación animal. Dentro de estas investigaciones se mencionan algunas a continuación.

Trillos *et al* (2006); en la Universidad Popular del César en Colombia, está investigación tomó las muestras a partir de los animales faenados en el frigorífico de COOLESAR, con la finalidad de analizar sus características físico- químicas a través de análisis de laboratorio, para lo cual se realizó pruebas de olor, color, consistencia, fibra, grasa, ceniza, humedad, pH, fósforo, calcio, elemento libre de nitrógeno y proteína metodología de la AOAC.

Se emplearon métodos estadísticos completamente al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza apropiado para el diseño estadístico utilizado, determinándose las diferencias entre las medias de los tratamientos mediante la prueba de Mínima Diferencia Significativa. (Trillos *et al* 2006)

Trillos *et al* (2006); el tratamiento contenía una muestra respectiva de contenido ruminal de los animales sacrificados; los cuales consistieron en los siguientes tiempos de maduración: T0: 40% de contenido ruminal fresco y 60% de harina de sorgo. T1: 40% de contenido ruminal ensilado con 15 días de maduración y 60% de harina de sorgo. T2: 40% de contenido ruminal ensilado con 30 días de maduración y 60% de harina de sorgo. T3: 40% de contenido ruminal ensilado con 45 días de maduración y 60% de harina de sorgo. Los resultados del contenido ruminal fresco y ensilado se presentaron de la siguiente forma:

Cuadro 3. Características físicas del contenido ruminal fresco y ensilado

características	T ₀ fresco	T ₁ 15 días de ensilaje	T ₂ 30 días de ensilaje	T ₃ 45 días de ensilaje
Olor	Desagradable	Agradable	Agradable	Agradable
Color	Marrón oscuro	Marrón oscuro	Marrón oscuro	Marrón oscuro
Consistencia	Semi- pastoso	Semi- seco	Semi- seco	Semi- seco

Fuente: Trillos *et al* 2006.

Cuadro 4. Contenido de fibra en los diferentes tratamientos de maduración del ensilaje.

TRATAMIENTOS	MEDIA (%)
0 (fresco)	2.34750
1 (15 días ensilaje)	2.502500
2 (30 días ensilaje)	2.782500
3 (45 días ensilaje)	2.247500

Fuente: Trillos *et al* 2006.

Cuadro 5. PH en los diferentes tratamientos de maduración del ensilaje

TRATAMIENTOS	MEDIA (%)
0 (fresco)	4.4900
1 (15 días ensilaje)	4.3725
2 (30 días ensilaje)	4.0425
3 (45 días ensilaje)	4.0025

Fuente: Trillos *et al* 2006.

Acevedo y Buitrago (2008); en la Universidad EAFIT de Colombia propone el ensilado del contenido ruminal como suplemento alimenticio de ganado bovino. En el ensilado se evaluaron diferentes formulaciones líquidas con *Lactobacillus casei* basadas en agua, aceite y una emulsión de agua – aceite.

El proceso de ensilaje realizado se midió pH, olor, color y elaboración de análisis bromatológicos evaluando los parámetros nutricionales como porcentaje de materia seca, humedad, proteína, cenizas, fibra en detergente ácido (FDA) y fibra detergente neutro (FDN). Aunque algunos parámetros a tener en cuenta en el proceso de ensilado

fueron óptimos como el pH, %FDA, %FDN el contenido ruminal ensilado de 35 días fue rechazado por los bovinos (Acevedo y Buitrago 2008).

En Guatemala, Castillo (1981); existe una investigación sobre el contenido ruminal fue realizada en la Universidad de San Carlos, en donde se evaluó el contenido ruminal deshidratado como una posible fuente proteica para la alimentación de ratas como animales de laboratorio y novillos de engorde.

Para el uso del contenido ruminal para la alimentación de ratas se utilizó muestra de 24 ratas machos de 21 días de edad y peso similares, colocados en jaulas individuales. Los tratamientos fueron tres en sustitución de la Caseína por contenido ruminal deshidratado en: 100% de caseína y 00% de contenido ruminal, 75% de caseína y 25% de CRD, 50% de caseína y 50% CRD. El peso inicial de los roedores estuvo entre los 46 y 46.6 gramos. Los pesos obtenidos al final del experimento son de T1: 155.60, T2: 95.50 y T3: 69.50. Los aumentos de peso son menores con el incremento de la cantidad de CRD en la ración (Castillo 1981).

Para el experimento se utilizaron 30 novillos se emplearon 30 novillos encastados de Brahman. Los tratamientos tenían el nivel de sustitución de Harina de Algodón por CRD en 100-00%, 67- 33% y 34- 66%. Los pesos iniciales de los novillos se encontraban entre 694.70, 679.20 y 681.30 libras. Con una conversión alimenticia de 8.66, 10.69 y 11.37. Se observó un descenso en el peso y la eficacia alimenticia debido a la baja concentración de proteína del CRD utilizado para el experimento, el cual tenía un 15%. El CRD presentó un alto nivel de materia seca que hizo el bajo consumo de otros suplementos de la ración como lo fue la caña picada para el tratamiento III. En el tratamiento II tuvo un consumo similar al del tratamiento I pero un menor consumo de materia seca debido a la misma razón anterior (Castillo 1981).

VI. MARCO METODOLÓGICO

6.1 Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Centro Universitario de Oriente –CUNORI-, ubicado en el municipio de Chiquimula, el cual está localizado a la altura del kilómetro 169 de la ruta C.A.10, que del municipio de Río Hondo, Zacapa, conduce al municipio de Esquipulas Chiquimula.

La altitud del centro universitario es de 320 msnm con latitud Norte de 14° 47'58" y longitud Oeste, de 89° 31'05" (SIG 2012). El municipio se ubica en la zona de vida de bosque seco subtropical con temperaturas ambientales que van desde 19°C la mínima, hasta 42°C la máxima; y una precipitación pluvial promedio de 850 msnm anuales (De La Cruz 1982).

El municipio de Chiquimula, colinda al norte y al oeste con el departamento de Zacapa, al sur con el municipio de San José la Arada y San Jacinto y al este con el municipio de Jocotán (Osorio 2004).

6.2 Población

Para la investigación se tomó en cuenta los bovinos faenados en el rastro municipal de Chiquimula.

Mensualmente son llevados 600 animales en promedio, el número puede variar dependiendo la época del año.

6.3 Muestra

Se determinó el tamaño de la muestra por el número total de animales llevados al rastro municipal para ser faenados semanalmente, para lo cual se usó el muestreo aleatorio simple utilizando para el efecto la fórmula siguiente:

$$n = \frac{Z^2 pq N}{NE^2 + Z^2 pq}$$

Dónde:

n = es el tamaño de la muestra;

Z = es el nivel de confianza; es de 1.65

p = es la variabilidad positiva; es de 0.4

q = es la variabilidad negativa; es de 0.6

N = población total o universo

E = es el grado de precisión o el error; es de 10%

Al aplicar la fórmula de muestreo se determinó que de los 600 animales faenados mensualmente en el rastro municipal de Chiquimula, serán muestreados únicamente 60 animales. La presente investigación se realizó en la época seca (de abril a junio) y la época lluviosa (de julio a septiembre); con animales alimentados principalmente en la época seca con rastrojo y alimento balanceado; y en época lluviosa con forrajes frescos y alimento balanceado.

6.4 Manejo del experimento

6.4.1 Fase pre- experimental

Desinfección del área de trabajo en el laboratorio

En un inicio, la desinfección se realizó con agua con cloro y etanol, de cámara de flujo laminar, incubadora y frascos para anaerobiosis. Durante las primeras muestras, ninguna de ellas fue contaminada con colonias ajenas a las de las muestras.

Se optó por utilizar un nuevo protocolo para la desinfección, en dónde se utilizó amonio cuaternario (NH_4^+) al 10%, de igual forma se desinfectó el equipo y materiales que se utilizaron. Con este procedimiento la contaminación de las muestras fue casi nula y se realizó de manera general cada mes y sobre los materiales, cada vez que estos fueron utilizados.

Elaboración de medios de cultivo

Al inicio de la investigación se inició utilizando agar Sangre y agar Mc Conkey, de los cuales, únicamente el agar sangre nos permitió conocer el desarrollo de la colonia y para determinar sus características morfológicas (Ver Anexo foto1A - 3A).

De manera que la investigación avanzó, se utilizó el agar Caso y el agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe). En el primero se realizaron las primeras siembras de las muestras y el segundo para realizar las resiembras.

Para estabilizar el pH de los agares durante la elaboración de estos, se le adicionó Hidróxido de sodio (NaOH).

Formas de recolección de muestras

Se inició recolectando las muestras con jeringas de 60 ml, luego se hizo con medio de transporte y por último se probó con recipientes estériles. Se realizó una recolección con los tres medios de recolección, luego se determinó la efectividad por medio del conteo de unidades formadoras de colonias. El resultado obtenido fue de un mayor crecimiento en las muestras que se recolectaron por medio de los recipientes estériles.

Transporte de muestras

Para el traslado de las muestras hacia el laboratorio se inició únicamente colocando las muestras dentro de la hielera. Avanzando en la investigación se cubrió los recipientes con papel de aluminio, para evitar que la luz directa afectara la viabilidad de las bacterias. También se mantuvieron durante todo el traslado de las muestras con temperatura de 40° C, similar a las condiciones de temperatura similar al rumen.

Temperatura y tiempo de incubación

En el inicio de la investigación, se inicia incubando las muestras 37°C durante 24 horas. Dieron pocos resultados de manera positiva, por lo cual se buscó en la literatura nuevas temperaturas de incubación.

Seguidamente se realizaron pruebas con muestras incubadas a 28°C también durante 24 horas. Se obtuvo abundante crecimiento de hongos y cocos, por lo que se determinó, cambiar nuevamente la temperatura.

Posteriormente se realizaron dos nuevas pruebas, donde las temperaturas fueron de 30° y 35°C; la primera se incubó durante 120 horas y a la segunda 72 horas. Las

cuales tuvieron resultados negativos para lactobacilos. El único crecimiento que se obtuvo fue el de levadura Candida.

Finalmente se realizó una prueba comparativa entre muestras sembradas a 40° y a 45°C, estas fueron incubadas durante 48 horas y 24 horas respectivamente. Dando como resultado favorable las muestras incubadas a 40°C, el crecimiento de lactobacilos.

Se logró estabilizar las bacterias a una temperatura de 42°C durante 24 horas. En esta temperatura se realizaron el mayor número de aislamientos posibles. Sin embargo, hay que hacer notar que en los cultivos a 35 ° C, durante 48 horas, favoreció el crecimiento de algunas levaduras integrantes del licor ruminal; esto no sucedió a temperatura de 42 ° C por 48 horas. Dado el caso que el rumen presenta temperaturas que oscilan entre 38-42 °C. La mayor estabilidad y escaso crecimiento de cocos, levaduras y hongos en las muestras se obtuvo en la temperatura de 42 °C.

Las características de la colonia fueron generalmente pequeñas, lisas y aplanadas, de un color traslúcido y una forma irregular. Su morfología al frotis fue bacilos con variedad de grosor, se encontraron a pares levemente flexionados, en ocasiones presentó en cadenas largas, de forma filamentosa o en masa. En las pruebas bioquímicas los azúcares fermentados fueron sacarosa, lactosa, arabinosa y glucosa; la negativa obtenida fue la xilosa (Apéndice 10A).

Cantidad de luz

La cantidad de luz que reciban las colonias, de manera directa, es uno de los factores importantes para su crecimiento. Por lo tanto, para mantener estable su crecimiento se cubrió cada una de las cajas con siembra, en papel aluminio para su posterior incubación.

Al transcurrir la investigación, para el ahorro en papel aluminio, se optó por el papel craft para cubrir todo el frasco para anaerobiosis, un poco antes de ser introducido a la incubadora.

Método de siembra de las muestras

Las primeras muestras recolectadas se sembraron por el método de estrías simples. El cual permitía un crecimiento demasiado amplio de microorganismos. Y algunos microorganismos eran excesivamente agresivos.

Para evitar la agresividad de las bacterias, al momento de realizar el aislamiento se utilizó el método de siembra por agotamiento. El cual daba la pauta de seleccionar las bacterias que crecieron al final del último cuadrante.

Cuando ya se tuvieron las bacterias aisladas, se realizó la siembra masiva de las colonias, con lo cual se incrementaba la cantidad de biomasa, se obtuvo mayor número para al momento de realizados los lavados de placas.

Método de incubación

Durante los primeros muestreos las siembras se incubaron de manera aerobia, se obtuvieron diferentes tipos de bacterias y hongos. Indagando en la literatura, se determinó que los lactobacilos eran anaerobios o aerobios facultativos. Por lo tanto, para el resto de las muestras se realizaron de manera anaerobia.

Obteniéndose mejores resultados, al inicio se mantuvo abundante crecimiento de microorganismos. Poco a poco las colonias que presentaron características lechosas bien definidas, color amarillo de la colonia y con un forma convexa.

Almacenamiento del inóculo

Luego de realizado el inóculo, este fue almacenado en frascos de vidrio color ámbar; para evitar que la luz dé directamente con la preparación y disminuya el número de UFC.

6.4.2 Manejo del experimento

1. Recolección de muestras

- Se desinfectó con algodón y etanol, el cuchillo o bisturí y el área del rumen donde se realizó una incisión para la toma de la muestra.
- Se introdujo el termómetro, previamente desinfectado, para la lectura de la temperatura a la cual se encuentra cada contenido ruminal.
- Se introdujo el recipiente estéril o la jeringa, para recolectar el licor ruminal 1000 ml y con contenido sólido (fotos 4A y 5A).
- Se almacena la muestra envuelta en papel de aluminio para evitar que la muestra tenga algún contacto con la luz solar y en bolsa de nylon para evitar derrames (foto 6A).
- Para el traslado de la muestra hacia el laboratorio, fueron introducidas en un contenedor térmico previamente calibrado con la temperatura con la bolsa térmica y el agua caliente. La temperatura se mantuvo entre los 38° a 40°C, similar a la temperatura ruminal.
- Al momento de llegar las muestras al laboratorio, fueron colocadas en la cámara de flujo laminar para realizar su respectiva siembra.
- Durante todo el proceso que se realizó para la recolección de las muestras, fueron manipuladas con guantes estériles, para mantener la asepsia necesaria como medida de bioseguridad.

2. Pruebas físicas del contenido ruminal

Verificación del color

- En el laboratorio se colocó 100 ml de licor en un beaker (ver foto7A).
- Se comparó con una carta de colores para identificar el color específico del líquido ruminal (UNL 2010) (Sherwin- Williams US 2011).

Verificación del olor

- Se colocó 150 ml en un beaker y se prosiguió a oler la muestra. Para el resultado se confrontó con las descripciones de la guía del anexo 1A (UNL 2010).

Verificación de la densidad relativa

- Se agitó la muestra de líquido ruminal aproximadamente por un minuto, para homogenizarla.
- Aproximadamente 500 ml de licor ruminal fueron colocados en una probeta.
- Se introdujo un densímetro y se tomó la lectura (foto 8A).
- Previamente se tomó la densidad del agua que fue igual a 1.0 g/ml.

3. Pruebas químicas del contenido ruminal

Nivel de pH

- Se colocó una cantidad de la muestra en un beaker de 200 ml, a manera de que quedó totalmente cubierta la sonda.
- Se encendió el potenciómetro para que analizar la muestra.
- Se esperó unos segundos y luego tomó lectura de los resultados que se obtuvieron (foto 9A).

Potencial de óxido reducción

- Se llenó un poco más arriba de la mitad, un beaker de 200 ml con la muestra, de tal forma que la sonda del potenciómetro quedó cubierta.
- Se encendió el potenciómetro para el análisis respectivo de la muestra.
- Se esperó unos segundos después de encenderlo, y luego tomó la lectura (foto 9A).

4. Pruebas microbiológicas del contenido ruminal

Determinación de bacterias

La muestra se tomó con el asa previamente flameada y fría. Se inoculó la muestra haciendo 4-5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja con agar Caso y luego se cerró la caja. Se flameó de nuevo el asa y se hizo girarla caja un cuarto de vuelta, se flameó de nuevo el asa. Se abrió nuevamente la caja y se enfrió el asa de siembra se tocó la superficie del medio lejos de la zona de las estrías antes hechas. El asa se rozó una vez sobre la superficie de las últimas estrías y se hizo un segundo grupo de estrías en el segundo cuadrante como en el caso anterior. Se realizó la siembra en el último cuadrante de la caja, exceptuando que no se flameó de nuevo el asa y la estría fue más abierta (simple) que las anteriores.

La incubación se hizo anaerobia con cajas invertidas a 42°C durante 24 horas (ver anexo foto10A). Las siembras de las muestras se realizaron por duplicado. De las cajas que fueron inoculadas se transfirió una pequeña muestra de la colonia a otras cajas con agar MRS. Se incubó a 42° C durante 24 horas. Una vez que se tuvo determinado el número de colonias (ver anexo foto11A y 12A), por medio de la siguiente fórmula:

$$NC/cm^3 = \left[\frac{NOC}{NCC} * \frac{1}{AMC} \right] * 100$$

Dónde:

NOC= Número de organismos contados

NCC= Número de campos contados

AMC= Área del campo microscópico

NC= Número de células

Identificación de bacterias

Luego que se terminó el tiempo de incubación de las placas sembradas, se procedió a hacerles tinción Gram para determinar las características morfológicas de las colonias.

Aislamiento de colonias de bacterias

- Se tomó una placa de agar, dividió en cuatro cuadrantes en la placa. Se colocó la muestra a sembrar en el número 1.
- Se realizó las estrías hasta la mitad de la caja. Esterilizó el asa y girar la caja hasta el cuadrante número 2, se tomaron las dos últimas estrías y se siguió estriando hasta el cuadrante número 3.
- Al efectuar la siembra en el último cuadrante, no se flameo el asa de siembra y se hizo una estría más abierta (simple).
- Se tuvo el cuidado de no tocar las estrías ya hechas.
- Se realizó tinción Gram al crecimiento obtenido en el último cuadrante para determinar cuáles son colonias de lactobacilos (Aquiahual y Pérez 2004), (foto 13A).
- A partir de los resultados positivos de la tinción se realizó la resiembra por agotamiento en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), y el proceso de incubación antes descrito (foto 14A).

- Al finalizar se realizó de nuevo otra tinción y una nueva resiembra por agotamiento en medio MRS, con el mismo procedimiento de incubación.
- Luego de esta incubación se realizó una última tinción y una resiembra de forma masiva para obtener mayor cantidad de biomasa.
- Esta última resiembra fue la que se utilizó para realizar la fermentación en el caldo de MRS y preparar el inóculo.

Pruebas de diferenciación bioquímica

- En la batería que contenía los tubos con glucosa, sacarosa, arabinosa, lactosa (positivos) y xilosa (negativa); con campana de Durham y rojo de fenol como indicador se inoculó mezclando una azada de cada uno de los microorganismos.
- Se incubaron los tubos de forma anaerobia a 42°C durante 24 horas (foto 15A).
- Todas las pruebas en tubo fueron comparadas con tubos control, que contienen mismos azúcares, pero sin inocular (foto 16A).

5. Inóculo

- Se preparó el caldo de MRS, para lo cual se utilizó 600 ml de agua desmineralizada y 33 g de polvo.
- Se calentó con agitación frecuente y se llevó a ebullición durante un minuto.
- Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121° C durante.
- De una caja Petri de cultivo fresco se retiró toda la biomasa con una espátula de Drigalsky se aplicó de 2 a 3 ml de medio líquido con una pipeta serológica, para el lavado y se disolvió en 50 ml de medio MRS en un erlenmeyer de 100 ml y se incubó a 42°C a 150 rpm por 32 horas (foto 17A).
- Posteriormente, los 20 ml de preinóculo se transfirió a 550 ml de medio MRS en un erlenmeyers de 1000 ml y se cultivó bajo las mismas condiciones por 32 horas (foto 18A).

- Cada tubo fue centrifugado a una velocidad de 14000 rpm durante 10 minutos, luego se retiró el sobrenadante (fotos 19A y 20A). El sedimento se retiró con agua estéril y micropipeta y almacenado directamente en un frasco de vidrio color ámbar.
- *Cuantificación de colonias por dilución*: se colocaron 9 ml de agua estéril en tubos de ensayo se tomó 1 ml de la muestra y se vertió en el primer tubo, luego del primero se tomó la misma cantidad de muestra y se adicionó al segundo; así sucesivamente hasta completar los 10 tubos. Se colocó en cajas de petri con agar MRS por duplicado con una asa calibrada de las últimas cuatro diluciones. Se incubaron las cajas de forma anaerobia e invertida a 42°C durante 24 horas. Como la inoculación se hizo por duplicado se realizó un promedio entre las colonias por cada placa (foto 23A).
- Para la preparación se agregó un 65% de agua desmineralizada, 30% de aceite de aceite de oliva y 5% de Tween 20; previamente el agua fue esterilizada a 121°C durante 15 minutos a 15 psi (foto 21A).
- Inmediatamente de salir de la autoclave el agua fue mezclada con el aceite para aprovechar la temperatura que esta contenga y ayudar a homogenización (ver foto 22A). Para estabilizar este tipo de compuestos, también se adicionó Tween 20 el cual actuará como un agente surfactante.
- Se esperó a que la mezcla homogenizada tuviese una temperatura ambiente para unirla con el sedimento de los tubos en el frasco ámbar.
- Se refrigeró hasta su utilización en los microsilos.
- Se agregó en la elaboración microsilos (foto 24A).

6.5 Análisis estadístico

Los resultados se compararon por medio de un análisis de varianza, a través del paquete estadístico (SAS); con un nivel de confianza del 95%.

Para las características físicas, químicas y microbiológicas de la ruminaza, se utilizó tablas de frecuencia y T-student para los resultados obtenidos.

En la elaboración de los inóculos, los resultados también fueron tabulados con tablas de frecuencia, medidas de tendencia central y medidas de dispersión.

6.6 Variables

6.6.1 Variables cualitativas

- Olor
- Color

6.6.2 Variables cuantitativas

- pH
- densidad relativa (g/ml)
- Potencial de óxido reducción (milivoltios)
- Concentraciones de Lactobacilos (UFC/ml)
- Unidades formadoras de colonias (UFC/ml)
- Azúcares fermentados: lactosa, sacarosa, arabinosa, glucosa y xilosa.

VII. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1 Pruebas pre- experimentales

En la presente investigación se realizó la fase pre- experimental de caracterizar, evaluar y aislar las bacterias ácido lácticas, misma que condujo hacia la obtención de los resultados de las variables cualitativas y cuantitativas planteadas.

Como resultado de la fase pre-experimental y dado la falta de un protocolo específico, se presenta a continuación una síntesis del protocolo validado para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas.

Cuadro 6. Protocolo sintetizado para la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Fases	Descripción	Resultados
Desinfección	Amonio cuaternario (NH_4^+) al 10% para desinfección de laboratorio, equipo.	Laboratorio y equipo estéril viable para utilizar.
Medios de cultivo	Agar CASO y MRS (Man Rogosa y Sharpe).	Crecimiento óptimo de Lactobacilos.
Recolección de muestras	Recipientes estériles de 100 ml.	Mayor crecimiento de muestras.
Transporte de muestra	Recipiente estéril protegido y almacenada a 40°C.	Traslado en condiciones de temperatura similar al rumen.
Temperatura y tiempo de incubación	Temperatura de 42° C y de 24 a 48 horas de incubación	Estabilidad de Lactobacilos
Cantidad de Luz	Revestimiento de frasco para evitar la luz.	Condición de obscuridad óptima para crecimiento.
Siembra de muestras	Siembra por agotamiento.	Mejor selección de bacterias.
Método de incubación	Anaerobiosis	Características morfológicas mejor definidas
Almacenamiento del inóculo	Frasco de vidrio color ámbar	Lactobacilos protegidos de la luz directa.

Fuente propia 2013.

7.2 prueba experimental

En la investigación se evaluó el color y olor (características organolépticas); y se midieron las variables pH, densidad y potencial de óxido reducción (redox).

Los resultados se tabularon por medio de tablas de frecuencias y se analizaron por medio de medidas de tendencia central, medidas de dispersión, prueba de T-student y correlación de Pearson, para con ello determinar la existencia de diferencia significativa entre variables cuantitativas.

A las características organolépticas se les realizó un análisis univariado, obteniéndose alto coeficiente de variación, por la divergencia entre los valores dados por cada uno de los evaluadores.

En la parte microbiológica, los resultados fueron tabulados con tablas de frecuencia, medidas de tendencia central, medidas de dispersión y prueba T-student para determinar la existencia de diferencia significativa. En la elaboración del inóculo los resultados únicamente fueron tabulados con tablas de frecuencia.

7.2.1 Características físicas y químicas del contenido ruminal en fresco

Los resultados de las características organolépticas, físicas y químicas del contenido y licor ruminal en fresco, en términos de color, olor, densidad, pH y potencial de óxido reducción se presentan en el cuadro siete.

Cuadro 7. Análisis de T- student para las características organolépticas de la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Variable	N	Media	Desviación estándar	Error medio estándar	Varianza	Coeficiente de variación	Valor t	Valor P
Color	60	1.48	0.72	0.09	0.52	48.85	15.86	0.0001**
Olor	60	1.48	0.72	0.09	0.52	48.85	15.86	0.0001**
Densidad g/ml	90	1.017	2.54	0.27	6.45	15.06	62.99	0.0001**
pH	89	6.57	0.60	0.06	0.36	9.12	103.40	0.0001**
POR (mv)	75	19.88	1.76	0.20	3.11	8.87	97.68	0.0001**

Fuente propia 2013.

(**) Existe diferencia altamente significativa ($P \geq 0.01$)

POR= potencial de óxido reducción

7.2.1 Características organolépticas

Color

El color del contenido ruminal en fresco es característica importante, ya que mediante el análisis minucioso de este, se pueden detectar procesos patológicos de trastornos metabólicos específicos en el animal.

La coloración normal del contenido ruminal puede variar en un animal normal, del verde olivo, al pardo verdoso y hasta el grisáceo verdoso, esto de acuerdo con el tipo de alimentación suministrada. Un color plomizo lechoso (grisáceo verdoso) indica

sobrecarga por consumo de granos (acidosis), el color negruzco (negro verdoso) revela reflujo abomasal por la putrefacción de la ingesta y el exceso de proteínas (Núñez y Bouda 2007).

En los resultados obtenidos se puede observar que el mayor porcentaje se presentó en el color verde olivo con el 65%, el pardo verde 22% y el lechoso gris 13% (Apéndice 3A).

Las muestras evaluadas revelaron diferencia altamente significativa a $P \geq 0.01$ para esta variable ($CV = 48.85\%$). Estos resultados reflejan que las muestras obtenidas de los primeros bovinos probablemente contenían alimento a base de forrajes principalmente, en los otros porcentajes, es posible que los animales fueran suplementados con alimento balanceado y henos (cuadro 7). Esto se basa en que la coloración normal del contenido ruminal puede variar en un animal normal, del verde olivo, al pardo verdoso y hasta el grisáceo verdoso, lo que se evidencia en el coeficiente de variación obtenido.

Olor

Algunos autores establecen que en bovinos sanos, el contenido ruminal es aromático penetrante similar al del ensilaje. En inactividad de la flora ruminal el olor es más suave e indiferenciado (amoniacal). Un olor ácido fuerte se presenta en acidosis ruminal y también en un olor rancio pútrido por putrefacción proteica (Contreras y Noro 2010).

Para la variable olor, los resultados indican que la mayoría de frecuencias obtenidas fueron del olor aromático con 65%, para el olor amoniacal fue de 22% y para el olor ácido picante 13%, (Apéndice 3A). Los resultados obtenidos reflejaron que existió diferencia altamente significativa a $P \geq 0.01$ (Cuadro 7). En consecuencia, estos indican que el olor del contenido ruminal que agrupa la mayor proporción es el aromático,

característico de los bovinos alimentados a base de forrajes. Sin embargo la variabilidad mostrada ($CV = 48.85\%$) sugiere una alimentación heterogénea de los animales.

Ambas variables están relacionadas entre sí, porque depende una de la otra. Biológicamente, si los bovinos son alimentados principalmente con forrajes, entonces las características que presentará serán un color verde olivo y olor aromático. Mientras la dieta sea variada por alimento balanceado el color será pardoso verdoso y el olor amoniacal.

7.2.2 Densidad

Los parámetros fisiológicos de bovinos *in vivo*, es de 1.022 y 1.055, con temperaturas de 38 y 42 °C respectivamente; con una media de 1.036 sin temperatura determinada. Para el caso de bovinos en pastoreo, se reporta una densidad del contenido ruminal de 0.80- 0.90, siendo considerablemente menor que los ya mencionados. (Church 1974).

Para la variable densidad, los resultados mostraron una media de 1.017 a 30°C, dicha media se encuentran abajo de los parámetros fisiológicos normales de las condiciones ruminales. En la prueba de T- student se determinó la existencia de diferencia altamente significativa $P \geq 0.01$, (cuadro 7).Y la variabilidad fue baja si se toma en cuenta el coeficiente de variación obtenido (15.06%).

De esto se deduce que los resultado se encuentran dentro del rango inferior al normal, dado que las muestras del licor ruminal fueron obtenidas de bovinos faenados y no fueron analizadas inmediatamente después de su recolecta, por tanto, las muestras descendieron su temperatura hasta los 30°C.

Muchos son los factores que afectan la densidad como es el caso de la temperatura, porque a medida que aumenta la temperatura, la densidad del líquido se hace ligeramente menor (Contreras y Noro 2010).

7.2.3 pH

Considerando que el valor fisiológico normal de pH ruminal se encuentra entre 5.5-7.3. Los valores del pH ruminal superiores o inferiores a este rango serán considerados como patológicos. El pH de 3.8 a 5.0 corresponde a la acidosis aguda; el pH de 5.1 a 5.9, a la acidosis ruminal subaguda y subclínica; el pH de 7.3 a 8.5, a la alcalosis ruminal (Núñez y Bouda 2007).

Los resultados obtenidos para la variable pH, proyectaron una media de 6.57 y un CV = 9.12%, determinando que existe diferencia altamente significativa $P \geq 0.01$, (Cuadro 7); reflejado por medio de la prueba de T- student.

Según se ha visto, el pH del rumen varía considerablemente durante el día e influye profundamente sobre la población microbiana. El pH del rumen baja progresivamente inmediatamente después del suministro del alimento y retorna a los niveles previos a la suplementación alimenticia en 24 horas (Araujo y Vergara 2007).

De lo anterior se deduce que en la presente investigación, el mayor número de frecuencias manifestaron la coloración de verde olivo, un olor aromático, dando unas características cualitativas que implican un pH ácido normal dentro de los rangos fisiológicos. Esto sugiere que los bovinos utilizados para el estudio fueron alimentados básicamente con forrajes o suplementados con alimento balanceado.

7.2.4 Potencial de óxido reducción

El ambiente intraruminal es anaerobio por excelencia lo que indica que se encuentra constantemente en condiciones de reducción. La baja en la concentración de oxígeno en el rumen, según lo indica un potencial negativo de oxidación considerado como normal de -350 milivoltios (mV) y varía entre un rango de -450 y -250 mV en muestra tomada en bovinos in vivo (Contreras y Noro 2010).

En el potencial de óxido reducción se refleja una media de 19.88 mV con un CV = 8.87% y en donde la prueba de T- Student determinó que existe diferencia altamente significativa $P \geq 0.01$, (cuadro 7).

Los resultados obtenidos son superiores al rango normal. Esta alta variación es reflejada en la media, siendo el resultado de medir el licor ruminal de animales *post mortem*, el ingreso de oxígeno al momento de hacer la incisión en el rumen para recolectar la muestra, el tiempo de traslado hacia el laboratorio donde las muestras obtuvieron la ganancia de oxígeno y la disminución en el número de microorganismos ruminales.

Por ello, el potencial de redox afecta la actividad metabólica de los microorganismos, los microorganismos aerobios estrictos tienen un metabolismo activo en potencial redox positivo, mientras que los anaerobios estrictos demuestran actividad metabólica solo en potenciales redox negativos. El potencial redox negativo del rumen es responsable de que los hidratos de carbono sólo se degraden hasta AGVs y no hasta CO_2 y agua, de manera que la energía contenida en los AGVs quede disponible para el rumiante (Contreras y Noro 2010).

De acuerdo al análisis efectuado mediante la correlación de Pearson, existe una estrecha relación entre el pH y la densidad del licor ruminal (78%), se determinó que existe diferencia altamente significativa $P < 0.0001$, (apéndice cuadro 7A). En consecuencia, con estos resultado se generó la siguiente ecuación: $Y = 10.12 - 0.21x$, $R^2 = 0.78$ (apéndice cuadro 7A). Estos resultados demuestran que las variaciones del

pH influyen directamente en la densidad, dicho comportamiento se explica a través del análisis de varianza que se realizó y coincidiendo con su diferencia altamente significativa.

Fisiológicamente, si el pH fue ácido, entonces la densidad debería disminuir en igual forma por la naturaleza de la dieta suministrada; siendo un factor determinante en las fluctuaciones del pH ruminal. Mientras la dieta suministrada sea un grano demasiado fino los niveles de pH serán menores; por el contrario si la dieta suministrada es un heno, el rumen mantendrá un rango superior de pH, y sus valores oscilaran aproximadamente entre 7.5 a 7.2 (Araujo y Vergara 2007).

7.3.1 Crecimiento de bacterias lácticas a diferentes temperaturas

La proporción de las bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) en el contenido ruminal se evaluó en función del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro y la posterior identificación, dichos resultados se muestran a continuación:

Cuadro 8. Crecimiento de bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) en UFC/ml, a diferentes temperaturas de incubación utilizadas en la caracterización de la ruminaza; municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Temp	N	Media UFC/ml	Desviación estándar	Error medio estándar	Varianza	Coeficiente de variación	Valor t	Valor p
28°	4	36250	8920.95	4460.47	79583333.3	24.61	8.13	0.0039**
30°	3	87333.33	10066.45	5811.87	101333333	11.53	15.03	0.0044**
35°	3	191333.33	39513.71	22813.25	1561333333	20.65	8.39	0.0139**
37°	6	129500	44193.89	18042.08	1953100000	34.13	7.18	0.0008**
40°	9	83444.44	56311.88	18770.63	3171027778	67.48	4.44	0.0022**
42°	65	100369.23	45725.94	5671.60	2090861538	45.56	17.70	0.0001**

Fuente propia 2013.

(**) Existe diferencia altamente significativa ($P \geq 0.01$)

Los niveles normales de bacterias en el rumen, de animales no faenados, es de aproximadamente 10 a 5×10^{10} de UFC/ml bajo condiciones de temperatura entre 38 a 42°C (Montalbetti 2002).

En la investigación, las temperaturas de incubación utilizadas en el proceso de crecimiento y reproducción de las bacterias lácticas, *Lactobacillus acidophilus*, fueron, 35°C con 191,333 UFC/ml; 37°C con 129,500 UFC/ml y a 42°C con 100,369.23 UFC/ml; hay que hacer notar que el crecimiento de las bacterias a 37° y 42°C son altamente significativas $P \geq 0.01$, y para 35°C es solamente significativo pero con un mejor CV (20.65); además, fue donde mayor crecimiento se cuantificó con respecto a las bacterias lácticas extraídas del licor ruminal y aisladas en el medio de cultivo MRS (cuadro 8).

En efecto, la mayoría de los autores concuerdan en que las temperaturas ideales para el desarrollo de los lactobacilos oscilan dentro de los 20 - 48°C . Bajo

requerimientos mínimos de dióxido de carbono, pH y tiempo de incubación. (Sorgensen, 1959).

La bacteria aislada en el presente estudio fue el *Lactobacillus acidophilus* que presentó las siguientes características: el crecimiento del cultivo en agar MRS estuvo entre 24 a 72 horas, en condiciones anaerobias.

7.2.3 Desarrollo de inóculo a nivel *in vitro*

En la elaboración del inóculo a partir del *Lactobacillus acidophilus* de la ruminaza, para ser utilizado posteriormente en el proceso de ensilaje, se realizó una cuantificación por dilución de las bacterias lácticas; los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 9. Cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) a diferentes niveles de dilución de *Lactobacillus acidophilus*; municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Inóculo en agar MRS a 42° C		
Dilución	UFC	Promedio
10 ⁷	4 9	6.5
10 ⁸	5 3	4
10 ⁹	2 2	2
10 ¹⁰	3 7	5

Fuente propia, 2013

Un producto debe asegurar al menos 9×10^{10} UFC de bacterias productoras de ácido láctico vivas por tonelada de cultivo o bien 100,000 por gramo de cultivo (Acevedo & Buitrago, 2008). Algunos productos comerciales ofrecen una mezcla de bacterias

conteniendo aproximadamente de 10 a 12 $\times 10^{10}$ UFC/g, elaborados en base a mezcla de bacterias homofermentativas y heterofermentativas, permitiendo reducir la pérdida de la materia seca y disminuyen el crecimiento de hongos y levaduras que dañen la calidad del silo (Contreras- Gevea 2006).

Al efectuar las diluciones se observó que en las diluciones decimales de 10^7 se obtuvo un crecimiento promedio de 6.5; en 10^8 fue de 4; para 10^9 se obtuvieron 2 y para 10^{10} fue 5 UFC de *Lactobacillus acidophilus*. Los resultados arriba presentados, resultaron ser inferiores a los recomendables, probablemente debido a la inestabilidad que presentó la bacteria durante la investigación.

VIII. CONCLUSIONES

- Las características organolépticas y físicas del contenido ruminal en fresco en el municipio de Chiquimula, fue un color de verde olivo (65%), el olor aromático (65%), la densidad 1.017 a 30°C.
- Las características químicas del contenido ruminal en fresco en el municipio de Chiquimula, reflejo un pH de 6.57 y el potencial de óxido reducción 19.88 milivoltios. La dependencia que existe entre el pH y la densidad es altamente significativa ($P < 0.0001$), implicando que las variaciones del pH influye directamente en la densidad.
- La bacteria aislada fue *Lactobacillus acidophilus* y la proporción de bacterias lácticas en el contenido ruminal fue de 191,333 UFC/ml a 35°C, 129,500 UFC/ml a 37°C y a 42 °C con 100,369.23 UFC/ml, durante 24-48 horas de forma anaerobia considerando que los valores normales dentro del rumen son de 5×10^{10} UFC/ml de bacterias.
- Para el desarrollo del inóculo de *Lactobacillus* en una base de aceite con agua, el número de bacterias obtenido en las diluciones 10^{10} el crecimiento obtenido fue de 5 UFC; un producto que presenta un crecimiento a una mayor dilución puede considerarse como aceptable.
- Al utilizar la metodología de reproducción de las bacterias acidófilas, a base de caldo de MRS, no se alcanzó el conteo de UFC que sugieren otras investigaciones (10×10^{10} UFC).

IX. RECOMENDACIONES

- Evaluar la fermentación del *Lactobacillus acidophilus* con la adicción de diferentes niveles de melaza, como una fuente adicional de energía.
- Evaluar la digestibilidad del inóculo adicionado directamente al rumen en animales fistulados.
- En futuras investigaciones evaluar los *Lactobacillus acidophilus* en el ensilado de napier para determinar su efecto en la calidad nutricional del ensilado.
- Evaluar el licor ruminal a través de la técnica de ruminocentesis para desarrollar un inóculo a nivel *in vitro*.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, D; Buitrago, LF. 2008. Evaluación del contenido ruminal como suplemento alimenticio para el consumo de ganado bovino ensilándolo con *Lactobacillus casei* (en línea). Medellín, CO, Universidad EAFIT, Escuela de Ingeniería. 106p. Consultado 22 may. 2011. Disponible en <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.6CDA174/marcoTeorico.pdf>.
2. Aquiahual, MDLA; Pérez, MDL. 2004. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. México, Universidad Autónoma Metropolitana. 115 p.
3. Araujo, O; Vergara-López, J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen (en línea). Archivo Latinoamericano de Producción Animal 15 (1):133-140. Consultado 13 jul. 2013. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/request?la07044>
4. Bondi, A. 1988. Nutrición animal. Zaragoza, ES, Editorial Acribia. p. 30-33.
5. Castillo, G. 1981. Evaluación nutricional del contenido ruminal deshidratado. Tesis Licda. Zoot. Guatemala, USAC. p. 1-46.
6. Church, D. 1974. Fisiología digestiva y nutrición de los animales. Zaragoza, ES, Editorial Acribia. v. 1, 483 p.
7. Contreras, P; Noro, M. 2010. Rumen: morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa (en línea). Chile, Imprenta América Ltda. p. 145. Consultado 10 jul. 2013. Disponible en: http://www.consortiolechero.cl/chile/documentos/publicaciones/rumen_web.pdf
8. Contreras-Gevea, F. 2006. Inoculantes microbiales para ensilajes (en línea). Wisconsin, US, University of Wisconsin-Extensión. p. 4. Consultado 15 jul. 2013. Disponible en: <http://www.uwex.edu/ces/crops/uwforage/Microbial%20Inoculants%20for%20Silage-Espanol.pdf>

9. Cruz, JR De La. 1982. Clasificación de zonas de vida en Guatemala a nivel de reconocimiento; basada en el sistema Holdridge. Guatemala, Dirección General de Servicios Agrícolas. p.42.

10. Falla, L. 1997. Desecho de matadero como alimento animal en Colombia (en línea). Roma, IT, FAO. p. 77-109. (Estudio FAO Producción y Sanidad Animal no. 134). Consultado 30 mar. 2008. Disponible en <http://www.fao.org/ag/Aga/agap/frq/APH134/cap7.htm>

11. Grudsky, P et al. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen (en línea). Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. p. 1-13. Consultado 24 nov. 2009. Disponible en http://www.produccion_animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/12-microbiologia.pdf

12. Kouva, J. 1994. Patología del rumen. Toluca, MX, UNAM. 17 p. (Notas del curso).

13. Montalbetti, A. 2002. Microbiología del rumen (en línea). Buenos Aires, AR, Monografías.com. Consultado 24 nov. 2009. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos7/rumen/rumen.shtml>

14. Navas, C. 2001. Introducción a la digestión ruminal (en línea). México, UMAN. Consultado 24 nov. 2009. Disponible en http://produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/79introduccion_a_la_digestion_ruminal.htm

15. Núñez, L; Bouda, J. 2007. Patología clínica veterinaria. México, UNAM. Consultado 15 jul. 2013. Disponible en <http://books.google.com.gt/books?id=CkBbyoBNnWcC&pg=PA155&lpg=PA155&dq=coloraci%C3%B3n+del+contenido+ruminal&source=bl&ots=lduV8y6cWD&sig=a0DaDFnJogeT9UpvzhbbyMJWsyM&hl=en&sa=X&ei=VmNPURuUEZWn4AOtz4FY&ved=0CEoQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false>

16. Osorio, MW. 2004. Evaluación de cuatro cepas del hongo *Metarhiziumanisopliae*, (Metschinkoff) para el control de garrapatas del género *Boophilusspp.*, en bovinos, Chiquimula. Tesis Lic. Zoot. Chiquimula, GT, USAC – CUNORI. p. 41.
17. Sherwin-Williams, US. 2011. Color. Estados Unidos de América, Sherwin-Williams Company. 168 p.
18. Shimada, A. 2009. Nutrición animal. 2 ed. México, Editorial Trillas. p. 96 - 121.
19. SIG (Sistema de Información Geográfica, GT). 2012. Datos climáticos de la cabecera departamental de Chiquimula. Chiquimula, GT, SIG - CUNORI. 1 p.
20. Sorgensen, A. 1959. Microbiología de la fermentación industrial (en línea). 7 ed. Zaragoza, ES, Editorial Acribia. Consultado 03 jul. 2013. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos15/lactobacilos/lactobacilos.shtml>
21. Trillos, G *et al.* 2006. Análisis físico- químicos de los contenidos ruminales frescos y ensilados de bovinos sacrificados en el Valle del César (en línea). Valledupar, CO, Universidad Popular del César, Facultad de Ingenierías. Consultado 24 nov. 2009. Disponible en: http://www.engormix.com/analisis_fisicoquimicos_contenidos_ruminales_s_articulos_954_GDC.htm
22. UNL (Universidad Nacional del Litoral, AR). 2010. Examen del líquido ruminal (en línea). Argentina. 3 p. Consultado 11 may. 2011. Disponible en <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/Fisiologia/fisiologia1.htm>

XI. APÉNDICE

A1. Boleta para resultado de pruebas físicas, químicas y microbiológicas; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Fecha: _____ **Muestra:** _____

Pruebas Físicas y Químicas Pruebas microbiológicas

Temperatura: _____

Bacterias (UFC): _____

Color: _____

Olor: _____

Consistencia: _____

pH: _____

Potencial de óxido reducción: _____

Pruebas bioquímicas

Positivas: _____

Negativas: _____

A2. Cuadro de vaciado para datos de pruebas cualitativas y cuantitativas del contenido ruminal; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

No. muestra	color	olor	densidad	sedimentación	flotación	pH	potencial redox	Bacterias
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

Fuente propia 2013

3A. Cuadro de resultados obtenidos de pruebas físicas y químicas del contenido ruminal en fresco; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

variable	resultados	valor	%	resultados	valor	%	resultados	valor	%
color	verde olivo	1	65	pardo verdoso	2	22	lechoso gris	3	13
olor	Aromático, Con ligero olor a vinagre	1	65	Amoniaca, olor semejante al amoniaco	2	22	ácido picante, fuerte, ácido, semejante al vinagre	3	13
Densidad	15 g/ml		63.33	19 g/ml		16.67	21 g/ml		20
pH	5.5		15.55	6		21.11	7		63.34
potencial	0		16.67	18.9		63.33	23		20

Fuente propia 2013.

4A. Cuadro de resultados obtenidos de pruebas microbiológicas en función del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Temperatura	UFC/ml	Frecuencia	Porcentaje
28	145,000	4	1.60 %
30	360,000	3	3.99 %
35	417,000	3	4.62 %
37	836,000	6	9.25 %
40	632,000	9	7.00 %
42	6,643,000	65	73.54 %

Fuente propia 2013

5A. Cuadro de análisis de Varianza para variable pH en la densidad de la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular
Modelo	1	25.63	25.63	318.01	0.0001
Error	88	7.09	0.08		
Total	89	32.72			

Fuente propia 2013.

$$CV = 4.33R^2 = 0.78 \quad Y = 10.12 - 0.21x$$

6A. cuadro de análisis de Varianza para variable pH en el potencial de óxido reducción de la caracterización de la ruminaza de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular
Modelo	1	11.97	11.97	50.75	0.0001
Error	88	20.75	0.23		
Total	89	32.72			

Fuente propia 2013

$$CV = 7.41R^2 = 0.36Y = 5.76 + 0.05(x)$$

7A. Cuadro de resultados correlación de Pearson de las características organolépticas de la ruminaza en fresco de bovinos faenados; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula, 2013.

	pH	Densidad	Potencial
pH	1.00	0.78	0.36

Fuente propia 2013.

La densidad con 78.32% de correlación es altamente significativa ($P \geq 0.0001$)

8A. Cuadro de resultados de las pruebas de diferenciación bioquímica de colonias aisladas; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Azúcar	Caja 2A	Caja 4B	Caja 4B
Glucosa	+	+	+
Lactosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Arabinosa	+	+	+
Xilosa	-	-	-

Fuente propia 2013.

FOTOS

Foto 1A. Elaboración de medios de cultivo



Foto 2A. Esterilización de medios de cultivo.



Foto 3A. Medios de cultivo identificados



Foto 4A. Recolección de muestras

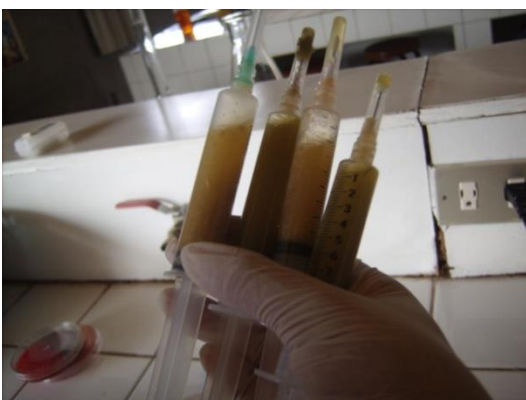


Foto 5A. Muestras recolectadas



Foto 6A. Traslado de muestras protegidas



Foto 7A. Verificación de color



Foto 8A. Verificación de la densidad relativa



Foto 9A. Pruebas químicas

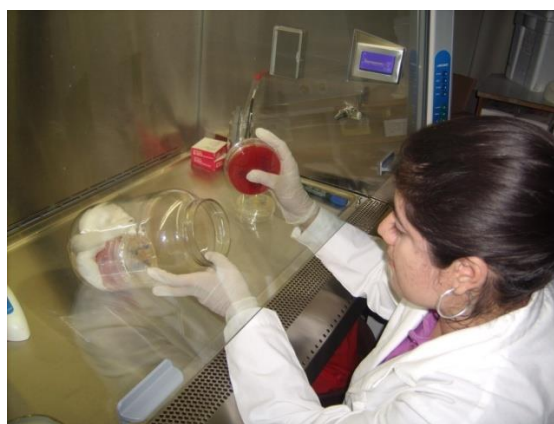


Foto 10A. Incubación de muestras anaerobiosis

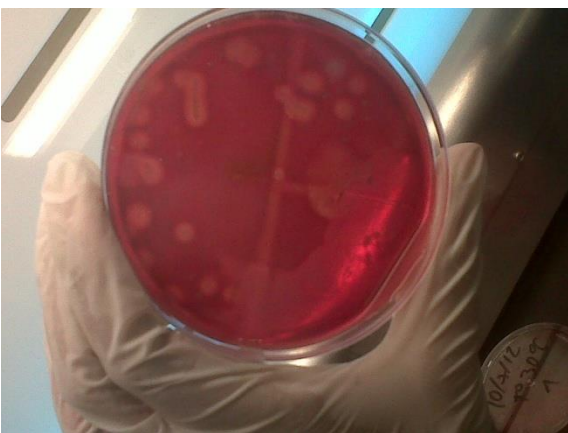


Foto 11A. Muestra incubada en agar sangre



Foto 12A. Muestra incubada en agar MRS

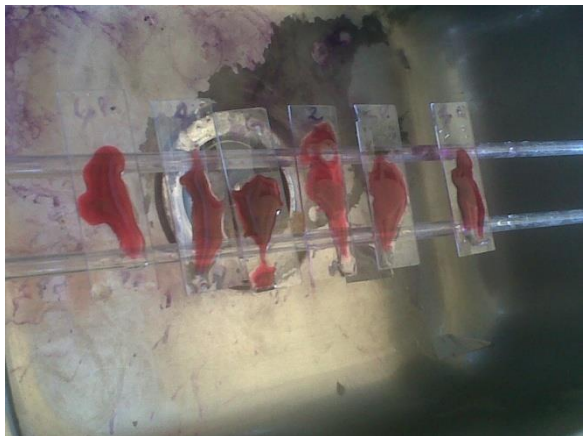


Foto 13A. Tinción de Gram

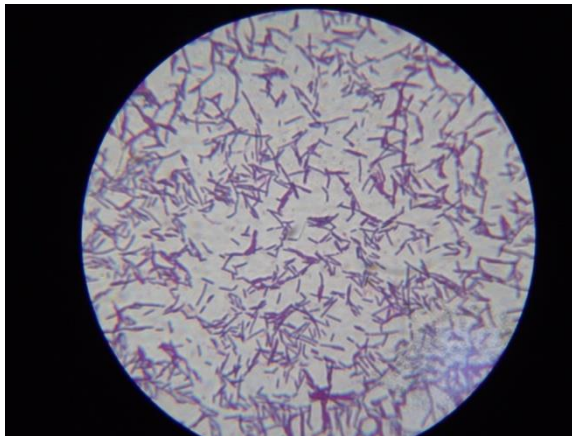


Foto 14A. Vista microscópica de los Lactobacilos



Foto 15A. Incubación de bioquímica



Foto 16A. Resultados de las pruebas bioquímicas



Foto 17A. Lavado de cajas con caldo MRS



Foto 18A. Fermentación de Lactobacilos



Foto 19A. Tubos pre centrifugación



Foto 20A. Sedimentación en tubos centrifugados



Foto 21A. Elaboración de inóculo



Foto 22A. Homogenización de ingredientes

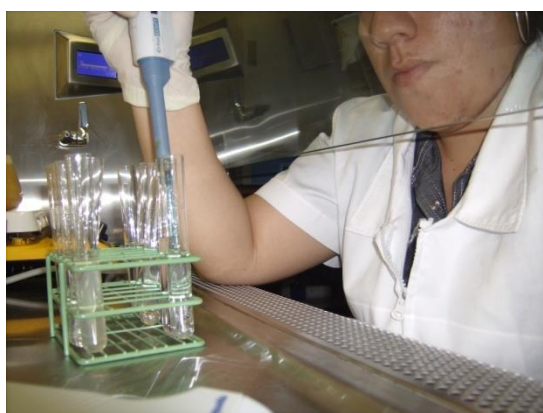


Foto 23A. Diluciones de inóculo



Foto 24A. Inóculo terminado

XII. ANEXOS

1A. Guía Para las pruebas del fresco del contenido ruminal en fresco; en el municipio de Chiquimula, Chiquimula 2013.

Características	Ingestión	Acidosis aguda	Acidosis crónica	Alcalosis	Putrefacción	Sano
Color	Pardo verde oscuro	Lechoso gris	Grisáceo verdoso	Pardo verde	Negro verdoso	Verde olivo
	 Eminent Bronze SW6412	 Connected gray SW6165	 Escape gray SW6185	 Fervent Brass SW6405	 Ripe olive SW6209	 Verdant SW6713
Olor	Mohoso	Ácido picante	Ácido	Amoniacal	Amoniacal podrido	Aromático
Viscosidad	Acuoso	Acuoso	Líquido viscoso	Variable	Pastoso espumoso	Líquido viscoso
Sedimentación	Rápida	Rápida y tardada	Rápida	Variable	Sin separación	8 minutos
Flotación	Falta	Falta	Falta	Variable	Falta	8 minutos
pH	6.8- 7.2	3.8- 4.5	5-6	7.3- 8	7.5- 8.5	6- 7
AGV	Bajos	Muy bajos	bajos	bajos	Muy bajos	80-120 m mol/L
Ac. Red	> 8	Falta	> 8	> 8	> 8	3-6 minutos

Fuente: Kouva, 1994. Sherwin-williams, 2011

2A.Tinción de Gram (Aquahual, MDLA; Perez, MDL, 2004).

- Se seleccionó las colonias que crecieron en las placas, con base a características morfológicas de la colonia.
- Antes de realizar la prueba se enumeraron los portaobjetos según el número de las colonias seleccionadas.
- Posteriormente se colocó una gota de solución salina en los portaobjetos.
- Con un asa de punta se tomó una mínima parte de la colonia seleccionada y se diluyó en solución salina. Los portaobjetos permanecieron en la cámara de flujo laminar hasta que la solución salina se secó.
- Luego cada portaobjetos se flameó en un mechero para sellar la muestra.
- Se agregó gota a gota de Cristal Violeta al portaobjeto a manera de cubrir la muestra, durante dos minutos. Posteriormente se lavó la preparación con una piceta que contiene agua destilada.
- Luego se agregó dos gotas de Lugol a la muestra, y se dejó actuar durante dos minutos, después se lavó el portaobjetos.
- Se agregará alcohol-acetona gota a gota dejando que escurra hasta que no fluya más excedente de la tintura se lavó inmediatamente.
- Finalmente se agregó gota a gota la Fushina, luego de dos minutos se lavó la muestra. Se dejaron secar los portaobjetos.
- Posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión sobre cada portaobjeto para poder observar en el microscopio y se realizó la lectura.

3A. Clasificación de los grupos de Lactobacilos (Sorgensen, 1959).

		Homofermentativos					Heterofermentativos			
		Termófilos					Mesófilos		Termófilo	Mesófilo
		Helveticus	Jugurti	Bulgaricus	Lactis	ÁcidoPhilus	casei	Plantarum	Fermentis	Brevis
Cultivo a	15°	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	45°	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Resistencia a	60° / 90 min	+		-	+	-	-	-	-	-
	65° / 30 min	-		-	+	-	-	-	-	-
Ácido (%) en la leche		2,7	2,7	1,7	1,7	0,8	1,2	0,3 1,2	0,5	0,5
							1,5			
Tipo de ácido láctico		DL	DI	D	D	DL	L	DL	DL	DL
Producción de CO ₂ (azúcares)		-	-	-	-	-	-	-	+	+
Exigencias nutritivas a)		RP	RP	R	RC	RFC	PF	-	T	TF
Fermentación de pentosas b)		-	-	-	-	-	-	+/-	-	+
Fermentación de otros azúcares c)		1 (4)	(4)	-	1,2,3,4	1,2,3,4	1,2,3,4,	1,2,3,4	1, (4,5),8	1,5
					(5), 6, 7		6,7,9,0	5,6,7,8,9,0		
Hidrólisis de la esculina		-	-	-	-	-	+	+	-	+/-
Grupo Serológico (Sharpe)		A	A	E	E	¿	B, C	D	F	E

Fuente Sorgensen, 1959.

Los factores de crecimiento: R, riboflavina; P, piridoxal; C, cianocobalmina (B12); F, ácido fólico; T, tiamina. Todas estas especies fermentan la glucosa, la galactosa y la lactosa. Los otros azúcares fermentados se designan mediante una cifra: 1, maltosa; 2, salicina; 3, sacarosa; 4, trealosa; 5, melibiosa; 6, amigdalina; 7, celobiosa; 8, rafinosa; 9, manitol; 0, sorbitol. Las cifras entre paréntesis indican un resultado variable según las cepas.