



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área Temática: Producción y Salud Animal

Título de la Tesis:

**PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* Y MODIFICACIÓN CUALITATIVA
DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS DEL RUMEN POR EFECTO
DEL NOPAL (*Opuntia ficus-indica*) COMO COMPLEMENTO DE LA
DIETA DE VACAS HOLSTEIN**

Presenta.

MVZ José Luis Mendoza Ortiz

**Para obtener el título de
Maestro en Ciencias Biológicas**

Morelia, Michoacán. Agosto 2015





Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área Temática: Producción y Salud Animal

Título de la Tesis:

**PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* Y MODIFICACIÓN CUALITATIVA
DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS DEL RUMEN POR EFECTO
DEL NOPAL (*Opuntia ficus-indica*) COMO COMPLEMENTO DE LA
DIETA DE VACAS HOLSTEIN**

Presenta.

MVZ José Luis Mendoza Ortiz*

Para obtener el título

Maestro en Ciencias Biológicas

Asesor

Doctora en Ciencias Biológicas Rosa Elena Pérez Sánchez**

Co-asesor

Doctor en Ciencias Biológicas Dr. Juan José Valdez Alarcón

Sinodales

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

M.C. Ruy Ortiz Rodríguez

Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez

Morelia, Michoacán. Agosto 2015.



DEDICATORIA.

A mis padres José Francisco Mendoza Gutiérrez y María Guadalupe Ortiz García, por todo el amor y cariño que me han brindado, así como su apoyo incondicional, por darme todo lo que está a su alcance para el logro de mis aspiraciones, por su firmeza, para nunca perder la esperanza y porque son las personas que más quiero en la vida. Este trabajo y este esfuerzo es para ustedes. Los quiero.

A Emily Mendoza Gutiérrez, por ser mi mayor fortaleza en los momentos de adversidad.

A mis hermanos Miriam y Francisco, por ser mi fuente de inspiración para seguirme superando y por todo el apoyo incondicional que he recibido de ustedes para lograr mis metas. Gracias hermanos.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por darme la vida y poder disfrutar de una excelente familia, de la oportunidad de terminar un peldaño más en mi formación profesional; por darme Salud, fortaleza y paciencia para continuar.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, que me permitieron el inicio, desarrollo y culminación de los estudios de Maestría.

A CONACYT por la beca y el financiamiento otorgados para llevar a cabo el trabajo de tesis.

En especial a los profesores: Dra. Rosa Elena Pérez Sánchez, Dr. Juan José Valdez Alarcón, Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez, Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores y al M.C. Ruy Ortiz Rodríguez Pérez Sánchez, quienes con sus enseñanzas, apoyo, dedicación y paciencia, contribuyeron de manera fundamental para la realización de esta tesis.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la elaboración de este trabajo.

DATOS DE IDENTIFICACIÓN

NOMBRE JOSE LUIS MENDOZA ORTIZ
RFC MEOL880119IU5
SEXO MASCULINO.
CURP MEOL880119HMNRS01
NACIONALIDAD MEXICANA



DOMICILIO: JUAN DE LA CRUZ VELAZQUEZ NO. 132 COL. CENTRO, SANTA ANA MAYA, MICHOACAN.

TELÉFONO: 4432188564

E-mail: joseluis_19i@hotmail.com

ESCOLARIDAD.

- 2000 – 2003 ESCUELA SECUNDARIA TÉCNICA NO. 27 “MAESTRO MOISÉS SÁENZ GARZA”.
- 2003 – 2006 ESCUELA PREPARATORIA #2 “INGENIERO PASCUAL ORTIZ RUBIO” UMSNH.
- 2007 – 2012 LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO.

CURSOS, SEMINARIOS Y CONGRESOS.

Premio padre de la patria durante el ciclo escolar 2008/2009.

Constancia por colaborar en el taller “**CONOCIENDO EL SISTEMA OSEO DEL AVESTRUZ**” llevado a cabo en el **XIX TIANGUIS DE LA CIENCIA**, realizado el 27 de Abril del 2009 en ciudad universitaria, Morelia, Michoacán.

Constancia por asistencia al **3er Congreso de Buiatria Regional** en Morelia, Michoacán, celebrado durante los días 10 y 11 de Junio del 2010.

Constancia por asistencia al **XV Congreso Veterinario** de la ciudad de León, Guanajuato, del 1 al 4 de septiembre del año 2010.

Constancia por asistencia y participación en el **5to Simposium PEDIGREE** de gastroenterología y enfermedades infecciosas celebrado en el XV congreso veterinario de León, los días 1 y 2 de septiembre.

Servicio social en el programa de **estancias FIRA – UMSNH** durante el periodo del 1 de agosto del 2011 al 31 de enero del 2012.

Constancia por la participación en el **congreso CANIGEN**, abordando los temas de “Nutrición”, “Alternativas para crecer su negocio” y “Anestesia: abordaje de pacientes con patologías persistentes” llevado a cabo en el 22 de Febrero del 2012 en Morelia, Michoacán.

Constancia por asistencia al **curso de capacitación** “Reconocimiento de las principales enfermedades exóticas y emergentes de los animales, su vigilancia, prevención y control” en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo durante el mes de Junio del 2012, con una duración de 32 horas.

Reconocimiento al **3er lugar de aprovechamiento** de la generación 2007 – 2012

Realización del **examen EGEL (ceneval)** y aprobación del mismo bajo el **testimonio de “Desempeño sobresaliente”**, expedido el 14 de septiembre de 2012.

Constancia por la presentación de la **ponencia “Efecto de diferentes niveles de inclusión de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en la dieta de vacas Holstein sobre la producción de leche en época de estiaje”**, en el 2º Congreso de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo los días 5, 6, y 7 de Diciembre de 2012

Constancia por la **presentación del cartel “Dinámica poblacional microbiológica del rumen de vacas Holstein bajo dietas complementadas con nopal (*Opuntia ficus-indica*)**, en el Cuarto Foro Académico del Posgrado de Ciencias Biológicas y Agropecuarias – UMSNH, que se desarrollo del 4 a 6 de de Diciembre del 2013.

Reconocimiento por haber participado con la **ponencia “La diversificación de dietas y su impacto en las poblaciones microbianas del rumen, sobre la producción de leche”**, dentro del 1er. Seminario de tópicos selectos en la producción animal, de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, el día 4 de septiembre del 2014.

Reconocimiento por haber participado con la **ponencia “Identificación de poblaciones bacterianas por técnicas moleculares”**, dentro del 1er. Seminario de tópicos selectos en la producción animal, de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, el día 4 de septiembre del 2014.

Constancia por la **asistencia al Congreso de Buiatría y a la primer Expo Carne-Leche y Productos Orgánicos**, los días 26 y 27 de Septiembre del 2014, en la ciudad de Morelia, Michoacán.

Constancia por la **presentación oral de la ponencia denominada “Dinámica poblacional microbiológica del rumen de vacas Holstein bajo dietas complementadas con nopal (*Opuntia ficus-indica*) mediante DGGE”**, en el Quinto Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias – UMSNH, que se desarrollo del 9 al 11 de de Diciembre del 2014.

INDICE

	Pagina
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	9
2.1 Efecto de la época del año (Lluvias y estiaje) sobre la alimentación y productividad de los bovinos productores de leche	9
2.2 Utilización del nopal (<i>Opuntia spp</i>) en la alimentación del ganado en época de estiaje	12
2.3 Efecto de la complementación de la dieta de vacas Holstein con <i>Opuntia ficus-indica</i> en época de estiaje sobre la producción y calidad de la leche	14
2.4 Técnicas para predecir la fermentación de los alimentos en los rumiantes	18
2.5 Cambios en las poblaciones ruminales y su repercusión sobre la producción de gas <i>in vitro</i> .	21
2.6 Clasificación de los principales microorganismos y sus productos de fermentación en el rumen	24
2.7 Interacción de las poblaciones microbianas del rumen y la dieta de los bovinos	31
2.8 Técnicas para determinar la dinámica de poblaciones microbianas del rumen	33

2.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR)	34
2.8.2 Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)	35
2.8.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	36
3. Planteamiento del problema	37
4. Hipótesis	38
5. Objetivo General	39
5.1 Objetivos específicos	39
6. Material y Métodos	40
6.1 Producción de gas <i>in vitro</i>	40
6.2 Modificación cualitativa de las poblaciones bacterianas del rumen	44
6.2.1 Extracción de DNA de las poblaciones microbiológicas del rumen mediante lisis química con DNAzol®	46
6.2.2 Purificación del DNA de las poblaciones microbianas del rumen	47
6.2.3 Amplificación de los ARNr de diferentes grupos microbiológicos del rumen	48
6.2.4 Protocolo para el análisis de secuencias mediante	49

electroforesis en gel con gradiente de
desnaturalización (PCR-DGGE)

7. Resultados y discusión	53
7.1 Producción de gas <i>in vitro</i>	53
7.2 Modificación a las técnicas moleculares para determinar la dinámica poblacional microbiana del rumen	59
8. Conclusiones	73
9. Bibliografía	74

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen de acuerdo al tipo de substrato que fermentan	27
Tabla 2. Materia seca de los insumos de cada dieta utilizada para la determinación de producción de gas <i>in vitro</i>	40
Tabla 3. Composición química de las dietas evaluadas para la medición de la producción de gas <i>in vitro</i>	41

Tabla 4. Dietas para bovinos productores de leche con y sin inclusión de nopal forrajero (<i>O. ficus-indica</i>) en época de estiaje	45
Tabla 5. Concentración y volumen de los reactivos para PCR	49
Tabla 6. Agentes y cantidades para las soluciones “baja” y “alta” de desnaturalización para la DGGE	50
Tabla 7. Estimadores de la función de Orskov y McDonald (1979) para determinar la producción de gas <i>in vitro</i> de las dietas evaluadas	54
Tabla 8. Producción acumulado de gas (ml/400 mg de ms)	56

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Cambios en la densidad del forraje en las praderas, durante la época de estiaje	11
Figura 2. Conceptualización del efecto de <i>O. ficus-indica</i> como complemento de la dieta de vacas Holstein durante la época de estiaje	18
Figura 3. Total de gas acumulado durante el periodo de incubación <i>in vitro</i> de dos dietas	55
Figura 4. ADN extraído mediante la adaptación de la técnica de lisis química con DNAzol (Visualización del gel de agarosa al 2% mediante	60

luz ultravioleta)

- Figura 5. Resultado de la amplificación del DNA sin adaptaciones en la técnica de PCR 62
- Figura 6. Resultado de la amplificación del DNA mediante ajustes al protocolo de PCR 63
- Figura 7. Tinción del gel de acrilamida con Nitrato de plata al 2% y revelado con hidróxido de sodio al 3% visto en un transiluminador. 64
- Figura 8. Visualización de los geles de acrilamida en escáner sometido a dos diferentes protocolos de tinción: 1) 0.5% de nitrato de plata y 0.1% de hidróxido de sodio; 2) 0.5% de nitrato de plata y 1% de hidróxido de sodio. 66
- Figura 9. Visualización del gel de acrilamida en al 10%, con un gradiente desnaturizante del 40 – 65%. Carriles 1 – 9 tratamientos sin nopal (*in vivo*); carril 10 tratamiento con nopal (96 horas *in vitro*). 68
- Figura 10. Visualización del gel de acrilamida en al 10%, con un gradiente desnaturizante del 40 – 65% a 62°C. Carriles 1 – 8 tratamientos sin nopal (*in vivo*); carril 9 tratamiento con nopal (48 horas *in vitro*); carril 10 tratamiento con nopal (48 horas *in vitro*) 69

- Figura 11. Visualización del gel de acrilamida en al 10%, con un gradiente desnaturizante del 50 – 60%. Carriles: 1 y 2 tratamientos sin nopal *in vitro*; 3 con nopal (96 horas); 4 – 11 tratamientos sin nopal (*in vivo*) 70
- Figura 12. Abundancia relativa de tres poblaciones microbianas del rumen de bovinos Holstein cuando se modifica la dieta convencional por una complementada con *O. ficus-indica*. 72

Resumen

Se determinó el impacto de *Opuntia ficus-indica* sobre la producción de gas *in vitro* (PG), y se estandarizó la técnica DGGE para determinar el cambio cualitativo de las poblaciones microbianas del rumen de vacas Holstein. La investigación sobre PG, se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Se evaluó la PG de dos dietas (DTA) en materia seca (MS); DTA1: 1.8 kg de nopal + 4.5 kg de Concentrado + 1 kg de pasto estrella africana (PEA); DTA2: 4.5 kg de Concentrado + 1 kg de pasto estrella africana. Se utilizó un analizador de fibra ANKOM 2000® para determinar la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA). El contenido de Ceniza se determinó por incineración a 550 °C durante 6 h. Como donadoras del líquido ruminal se utilizaron 2 vacas Holstein. El líquido ruminal (LR) se recolectó prepandeo, mediante sonda esofágica (SE). En frascos de vidrio, se colocaron por triplicado 400 ± 10 mg de cada dieta y, se agregó 10 ml de líquido ruminal y 20 ml de solución buffer (Menke y Steingass, 1988), con un flujo continuo de CO₂ y se cerraron herméticamente. Los frascos se incubaron a 39° C y se registro la presión y volumen del gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96. La digestibilidad de MS se estimó mediante la filtración del residuo en crisoles Gooch (Goering y Van Soest, 1970). La estandarización de la DGGE utilizó muestras de LR, obtenidas de bovinos de la Facultad de Agrobiología-UMSNH. Alimentados con 4.5 kg d⁻¹ de concentrado y 1 kg d⁻¹ de PEA en MS como tratamiento testigo (T2). Después, cada vaca recibió: (T1) 1.8 Kg d⁻¹ de nopal MS + 4.5 kg de concentrado + 1 kg d⁻¹ de PEA en MS. Se colectó una muestra de 50 ml de LR/vaca mediante SE a -48, -24, 0, 24, 48, 72 y 96 h de haberse suministrado la dieta, y se congeló a -80°C. Las muestras testigo (T2) fueron las de -48, -24, 0 h. En el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-UMSNH, se extrajo el ADN de LR mediante lisis química con DNAzol. Donde se probó 0.5 ml de fluido ruminal y 1 ml de DNAzol; y 300 µl de LR y se adiciona 1200 µl de DNAzol; con y sin empastillado. Para precipitar el DNA se comparan: 1) un volumen de isopropanol y 2) dos volúmenes de etanol absoluto. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se probó la preparación de los reactivos juntos y separados, y la adición individual de la taq Polimerasa; y 2 condiciones de amplificación: 1) 30 ciclos a 96°C durante 5 minutos, 95°C durante 0.5 minutos, 50°C por 0.5 minutos, 65°C por 4 minutos, 65°C por 7 minutos y 15 minutos a 4°C; 2) 30 ciclos a 96°C durante 5 minutos, 95°C durante 0.5 minutos, 50°C por 0.5 minutos, 65°C por 4 minutos, 65°C por 7 minutos y 15 minutos a 4°C. Para la DGGE se preparó un gel en paralelo al 10%, con un gradiente de 40 a 60% desnaturalizante. Se corrió a 30 voltios y una temperatura de 60°C durante 12 h; y a una temperatura de 65°C y 180 voltios. La tinción fue con nitrato de plata: 1) solución fijadora (SF), solución con nitrato de plata (NP) al 2% y solución de revelado (SR) 3%; 2) SF, NP 0.5% y SR al 0.1%; 3) SF, NP 0.5%, SR 1% y solución de "paro". La PG para DTA2 a 48 h fue mayor ($P < 0.05$) con 53.2 ml/400 mg/MS en vs 51.7 ml/400 mg de MS de DTA1. El mismo comportamiento se encontró a 72 y 96 h; DTA2 fue mayor en PG: 54.7 y 54.9 ml/400 mg/ MS, que DTA1: 53.5 y 53.9 ml/400 mg de MS ($P < 0.05$) en ambos periodos. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la digestibilidad de la materia seca. La extracción de ADN con 1200 µl de DNAzol, sin empastillar, y utilizando cualquiera de los dos alcoholes, mostró ADN genómico de alto peso molecular. La aplicación individual de los componentes y la segunda condición de la PCR, generó productos de 200 PB de las muestras de DNA de LR. La DGGE, fue igual en ambos protocolos de corrida, se recomienda el de menor tiempo. El protocolo 3 de tinción fue el permitió una visualización óptima y con mayor número de bandas. En conclusión, 1 kg de MS de pasto y 4.5 kg de MS de concentrado, la presentó una mayor ($p < 0.05$) producción de gas con respecto a los demás tratamientos. Lo que evidencia la importancia entre el balance de Carbohidratos solubles y FDN. Se establecieron las condiciones para la extracción de ADN de LR y su análisis por PCR-DGGE. Existe un cambio de población bacteriana cuando se alimenta a los bovinos con nopal, y posiblemente está generando un efecto positivo sobre la producción de leche y la calidad de sus productos. Sin embargo, es necesario medir las densidades de las bandas, así como secuenciar dichas bandas, para determinar la población que está cambiando.

Palabras clave: Líquido Ruminal, Digestibilidad de la materia seca, Bovinos productores de leche, ADN, PCR-DGGE.

Abstract

The impact of *Opuntia ficus-indica* was determined on in vitro production (PG) gas, and the DGGE technique was standardized to determine the qualitative change of rumen microbial populations of Holstein cows. PG research was developed at the Institute of Agricultural and Forestry Research (FEIS) from the Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo (UMSNH). PG two diets (DTA) in dry matter (DM) was evaluated; DTA1: 1.8 kg + 4.5 kg of nopal Concentrate + 1 kg of African star grass (PEA); DTA2: 4.5 kg + 1 kg Concentrate African star grass. ANKOM fiber analyzer 2000® was used to determine the neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (FDA). Ash content was determined by ashing at 550 ° C for 6 h. As donors of rumen liquid 2 Holstein cows were used. The rumen fluid (LR) prepanadio collected by gavage (SE). In glass jars they were placed in triplicate 400 ± 10 mg of each diet and 10 ml of ruminal fluid and 20 ml of buffer solution (Menke and Steingass, 1988) was added, with a continuous flow of CO₂ and sealed. The bottles were incubated at 39 ° C and the pressure and volume of gas at 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 and 96. MS digestibility was estimated by log filtration residue Gooch crucibles (Goering and Van Soest, 1970). The standardization of samples used DGGE LR, obtained from bovine, Faculty of Agrobiología-UMSNH. Fed 4.5 kg d-1 concentrate and 1 kg d-1 PEA in MS as control treatment (T2). Then, each cow received: (T1) 1.8 kg d-1 nopal MS + 4.5 kg of concentrated + 1 kg d-1 PEA in MS. A sample of 50 ml of LR / cow was collected by SE -48, -24, 0, 24, 48, 72 and 96 h dietary been supplied, and frozen at -80 ° C. Control samples (T2) were -48, -24, 0 h. In the Multidisciplinary Center for Studies in Biotechnology-UMSNH LR DNA it was extracted by chemical lysis DNAzol. Where 0.5 ml of ruminal fluid and 1 ml of DNAzol I was tested; LR 300 ul and 1200 ul DNAzol is added; with and without pelletizing. To precipitate the DNA are compared: 1) a volume of isopropanol and 2) two volumes of absolute ethanol. For polymerase chain reaction (PCR), the reagent preparation together and apart, and individual addition of Taq polymerase was tested; and 2 amplification conditions: 1) 30 cycles at 96 ° C for 5 minutes, 95 ° C for 0.5 minutes, 50 ° C for 0.5 minutes, 65 ° C for 4 minutes, 65 ° C for 7 minutes and 15 minutes at 4 ° C; 2) 30 cycles at 96 ° C for 5 minutes, 95 ° C for 0.5 minutes, 50 ° C for 0.5 minutes, 65 ° C for 4 minutes, 65 ° C for 7 minutes and 15 minutes at 4 ° C. For DGGE gel prepared in parallel to 10%, with a gradient of 40 to 60% denaturing. It was run at 30 volts and a temperature of 60 ° C for 12 h; and at a temperature of 65 ° C and 180 volts. Staining was with silver nitrate 1) fixative solution (SF), with silver nitrate solution (NP) and 2% developing solution (SR) 3%; 2) SF, SR NP 0.5% and 0.1%; 3) SF, 0.5% NP, SR 1% solution of "unemployment". DTA2 PG for 48 h was higher (P <0.05) with 53.2 ml / 400 mg / MS vs. 51.7 ml / 400 mg of MS DTA1. The same behavior was found at 72 and 96 h; DTA2 PG was higher: 54.7 and 54.9 ml / 400 mg / MS, which DTA1: 53.5 and 53.9 ml / 400 mg of MS (P <0.05) in both periods. No differences (P > 0.05) on dry matter digestibility were found. DNA extraction with 1200 ul of DNAzol without empastillar, and using either alcohols, genomic DNA was high molecular weight. The individual application of the components and the second PCR condition, gender 200 PB products of DNA samples LR. DGGE was equal in both protocols run, we recommend the shorter time. Staining protocol 3 was allowed optimal and display as many bands. In conclusion, MS 1 kg of grass and 4.5 kg DM of concentrate, introduced greater (p <0.05) of gas production compared to other treatments. It demonstrates the importance of balance between the NDF and soluble carbohydrates. Conditions for DNA extraction and LR PCR-DGGE analysis established. There is a change of bacterial population when cattle are fed with cactus, and is possibly generating a positive effect on milk production and quality of their products. However, it is necessary to measure the densities of the bands as well as bands such sequencing to determine the population is changing.

Keywords: rumen fluid, dry matter digestibility, Bovine milk producers, DNA, PCR-DGGE

1. Introducción

La producción de leche en México creció 1.46% en los últimos años, lo que en términos monetarios equivale al 20.3% (\$60, 678,409.00 ^{M/N}) del valor total (\$324, 160,709.00 ^{M/N}) del sector pecuario (LACTODATA, 2014); en donde los sistemas especializados, semi-especializados y doble propósito aportan el 72% de la producción total de leche de bovino producida en México. Mientras que el 28% restante, lo aportan los sistemas familiares o de traspatio (Vilaboa y Díaz, 2009; Castelán *et al.*, 2008). No obstante, el 28% de la aportación productiva de los sistemas de producción familiar, está supeditada por las distintas regiones agroecológicas en donde se establecen (Toledo, 2002), mismas que determinan la calidad y cantidad de insumos para las dietas de los hatos productores de leche (González *et al.*, 1998); sobre todo, en las zonas áridas y semiáridas en las cuales la variedad, cantidad y calidad de los insumos oscilan durante el transcurso del año, acentuándose de forma negativa en la época de estiaje (Ortega *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2012).

En época de estiaje, el principal insumo disponible para la alimentación del ganado son esquilmos agrícolas, debido a la escases del pasto nativo (Espinosa *et al.*, 2007) y, esta alimentación incide negativamente en el comportamiento productivo de los hatos (Reveles *et al.*, 2010). Por lo que, ante esta problemática, los productores han recurrido a la utilización de forrajes autóctonos, como el nopal (*Opuntia spp*), como una fuente de alimentación para su ganado (Andrade *et al.*,

2011). Aunque si bien, dicha estrategia solo se utiliza en las zonas áridas y semiáridas del centro y norte del país (López *et al.*, 2003), mismas que abarcan cerca del 60% del territorio nacional (Echavarría *et al.*, 2006).

El uso del nopal en la alimentación del ganado lechero puede ser una estrategia viable, puesto que México es ubicado como centro de diversidad de esta planta: en el país se localizan 93 de las 191 especies de *Opuntia* que existen en América del Norte (Gallegos *et al.*, 2011) y, el 15.8% de la superficie total de la parte norte y centro de México, posee nopal forrajero, tanto en forma establecida como de forma silvestre; superficie que garantiza su uso en la alimentación animal, no solo durante la época de estiaje sino en cualquier época; por esta razón es susceptible de explotarse durante todo el año (Ramírez *et al.*, 2007).

Actualmente, las variedades de nopal preferidas para la producción de forraje son aquellas que no poseen espinas, debido a: a) facilidad de manejo y proceso, b) se evita el chamusque de la nopalera cuando se alimenta al ganado (López, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2008). El nopal (*Opuntia ficus-indica*) es una planta muy atractiva como alimento para el ganado, particularmente por su alta eficiencia al utilizar la luz solar en el proceso fotosintético y convertir agua en biomasa, y por su contenido de energía digestible (Ruiz *et al.* 2008; Medina *et al.* 2006). Este es útil no sólo porque sobrevive a las sequías, sino también porque es más eficiente que muchas gramíneas o pastos forrajeros de hoja ancha durante la época estiaje. La importancia forrajera del nopal para la alimentación del ganado radica en que

durante los períodos de sequía o invierno, este permanece verde (Santos *et al.*, 2010).

O. ficus-indica, se caracteriza por presentar una elevada concentración de carbohidratos solubles (30 – 50%) y calcio (2.25 – 2.88%) (Torres, 2010), digestibilidad *in situ* a 48 h de 68%, 47% de fibra detergente neutra y 16% de fibra detergente ácida (Medina *et al.*, 2006). No obstante, esta planta solo debe utilizarse como complemento de la dieta del ganado (Reveles *et al.*, 2010), especialmente cuando escasean o no son costeables otros forrajes con mayor contenido de proteína cruda (Vásquez *et al.*, 2007), debido a que los bovinos al consumir solamente nopal no logran cubrir sus requerimientos nutricionales; así por ejemplo, un consumo de entre 20 y 40 kg cabeza⁻¹ d⁻¹, solo cubren el 43% de la energía total requerida para la lactancia, 12.2% de las proteínas, 18% del fósforo y 100% del calcio (López, 2010; Torres, 2010), ello comparado con los requerimientos recomendados por el NRC (Nutrient Requirements of Dairy Cattle) para bovinos de 500 kg de peso vivo con producciones de 15 kg de leche d⁻¹: energía metabolizable, 29 Mcal d⁻¹; proteína, 1200 g d⁻¹; fosforo, 27.45 g d⁻¹; calcio, 47.33 d⁻¹ (NRC, 2000).

En investigaciones recientes, en torno al uso de nopal como complemento de la dieta de bovinos productores de leche, concluyen que, esta complementación incrementa la producción láctea (López *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2010; García *et al.*, 2013). Así, 12 kg de *O. ficus-indica* como complemento de la dieta vaca⁻¹ d⁻¹

incrementó la producción de leche de 7.084 a 10.864 kg d⁻¹ (Ortiz *et al.*, 2010). Además de este incremento en la producción, también observaron que mejoró las características organolépticas y la vida de anaquel de sus derivados; por lo que concluyen que el uso de nopal en la alimentación del ganado es una alternativa viable en época de estiaje (Ortiz *et al.*, 2012).

Los efectos de *O. ficus-indica* en la producción de leche (Moreno, 2013) y posiblemente sobre la calidad de los subproductos de esta (Ortiz *et al.*, 2012), son atribuidos al efecto de los componentes físico-químicos del nopal (carbohidratos, fibra detergente neutra y ácida, así como a los niveles altos de calcio, entre otros más) mismos que permiten una mayor eficiencia en los procesos fermentativos, del alimento consumido, a nivel ruminal por la flora microbiana. Aspecto que mejora la producción de ácidos grasos volátiles, energía y amoníaco, principalmente (Araujo y Vergara, 2007). No obstante, existe poca información sobre la degradación del nopal a nivel ruminal que permita determinar la eficiencia de este forraje como complemento en la alimentación de bovinos productores de leche (Lach y Podkówka, 2000). Ante dicho escenario, la técnica de producción de gas *in vitro* es una alternativa viable para evaluar la fermentación y digestibilidad de la materia seca de las dietas para bovinos (Rymer *et al.*, 2005).

La técnica de producción de gas *in vitro* -modificada por Theodorou *et al.* (1994)-, simula los procesos digestivos que se generan a partir de la población microbiana del rumen y por lo tanto, permite conocer: a) la fermentación y degradabilidad del

alimento en función de la calidad nutritiva y disponibilidad de nutrientes para las bacterias (Bruni y Chilbroste, 2001) y, b) posibilita establecer las características nutricionales de los forrajes y su utilización en la alimentación de rumiantes (Sallam *et al.*, 2009). Sin embargo, nuevas investigaciones sugieren que los productos finales de la fermentación ruminal dependen de las poblaciones microbiológicas y de las interacciones que se dan entre estas (Díaz *et al.*, 2008).

Es probable que la complementación de la dieta con nopal, cambie las poblaciones de microbianas ruminales y produzca efectos benéficos en la producción de gas, dando origen a una mayor producción y calidad de la leche. Si esto es así, es necesario establecer la tasa de producción de gas *in vitro* con dietas complementadas con dicha cactácea, y su relación con las poblaciones bacterianas ruminales, para lo cual se requiere establecer una técnica que permita determinar cualitativamente la dinámica microbiana ruminal.

Dentro de las técnicas que se utilizan para determinar microorganismos, la biología molecular ofrece una serie de herramientas que permiten la identificación de bacterias, hongos y protozoarios en diversos ecosistemas, y que es posible adecuarlas para el análisis de poblaciones ruminales, tal es el caso del análisis de secuencias genómicas, propias de cada especie microbiana (Palacios y Chassin, 2010). Para lo cual, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar regiones específicas del ADN ribosomal microbiano, y posteriormente, mediante la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

(DGGE), se separan dichas secuencias, y a través de este proceso es posible la identificación de la diferente microbiota en un muestra (Ercolini, 2004).

La determinación de la variación de los poblaciones mayoritarias del rumen bajo diversas dietas mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, posibilitan un mejor comprensión de las cualidades nutricionales de un sustrato o una dieta y, de sus efectos sobre la fisiología microbiana ruminal (Colombatto, 2004). Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la complementación de la dieta de vacas Holstein con 12 kg d⁻¹ de *O. ficus-indica* sobre la producción de gas *in vitro* y, la estandarización de la técnica PCR-DGGE para la identificación cualitativa de las poblaciones bacterianas del rumen.

2. ANTECEDENTES

2.1 Efecto de la época del año (lluvias y estiaje) sobre la alimentación y productividad de los bovinos productores de leche

El periodo de lluvias en México, se presenta de Julio a principios de Octubre (Páez y Medina, 2008), con precipitaciones de 91.8 a 190.9 mm y temperaturas entre los 25 y 26°C (Sistema Meteorológico Nacional, 2014). Estas condiciones ambientales, permiten el rebrote de los forrajes en los agostaderos utilizados para la alimentación del ganado durante el transcurso del año (Faria, 1994). Lo que permite que en dicha época, la disponibilidad forraje sea hasta del 80%, con respecto a la época de estiaje (Hernández *et al.*, 1987).

Para los sistemas ganaderos, que basan su alimentación en el pastoreo tradicional, la época de lluvia permite la reposición del forraje en las praderas y con ello, los bovinos mantienen condiciones productivas optimas (Velasco *et al.*, 2002). Puesto que, el efecto de la temporada sobre la densidad del pasto y en consecuencia de contenido proteico y energético, permiten a los animales satisfacer su demanda nutricional, ya que solo para que los bovinos Holstein llenen sus requerimientos de mantenimiento se requiere dietas con un 11% de proteína cruda y los pastos, en estado de rebrote en verano, como *Cynodon nlemfluensis* y *Panicum maximum*, Proveen 11 y 10.6% de proteína cruda,

respectivamente, valores que satisfacen los requerimientos proteicos de los bovinos bajo pastoreo en dicha época (Maya *et al.*, 2005; Verdecia, 2008).

Al finalizar el periodo de lluvia, por lo general, el pasto se encuentra en plena madurez y, en consecuencia, la lignificación de la pared celular de este lo hace menos digestible para el rumiante. También, la ausencia de lluvia, limita el rebrote de las plantas y los agostaderos comienzan a disminuir su biomasa, dando inicio el periodo de estiaje (Gutiérrez *et al.*, 2012). Durante la época de estiaje, hay menor disponibilidad de forraje para la alimentación animal, condición que influye primordialmente en el costo de producción de los sistemas de explotación de bovinos (Macedo, *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2012). Pero esto se acentúa en las zonas áridas y semiáridas del país; mismas que representan en su conjunto el 66.2% de la superficie total del territorio nacional (Flores y Reveles, 2010). El estiaje se presenta generalmente durante los meses de Enero a Junio, periodo en el que las temperaturas medias pueden alcanzar 26.6°C y las precipitaciones pluviales apenas alcanzan los 69.6 mm (Servicio Meteorológico Nacional, 2014), lo cual deriva en un déficit en la cantidad y calidad de forraje para la alimentación del ganado durante esta época del año (Figura 1) (Rayas, *et al.*, 2012)

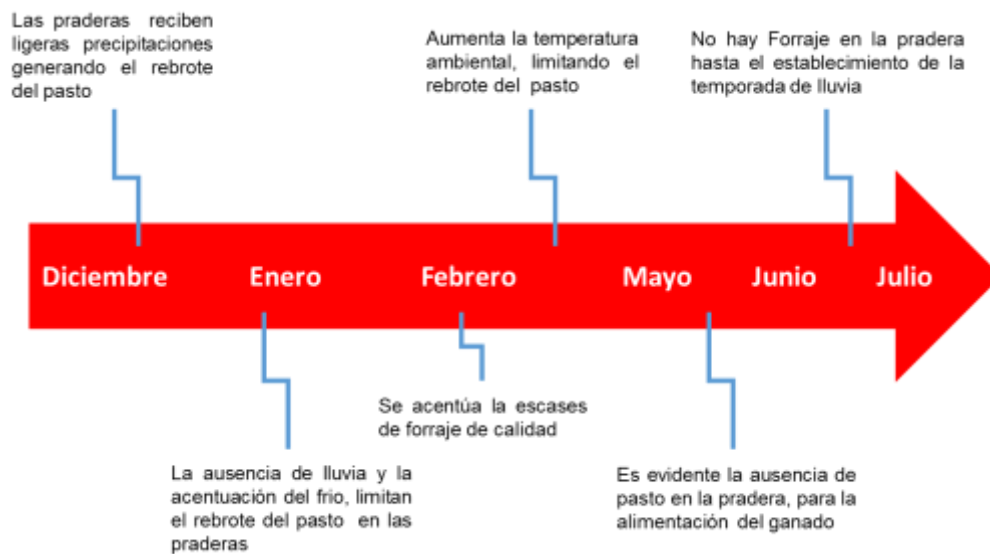


Figura 1. Cambios de la densidad del forraje en las praderas, durante la época de estiaje.

El fenómeno del estiaje impide cubrir los requerimientos nutricionales de animales en producción e incluso, los requerimientos de mantenimiento (Bacab y Solorio, 2011); puesto que, las condiciones ambientales en este periodo del año, disminuyen la densidad de forraje en las praderas, y con ello, la carga animal se ve limitada (López, 2010). El estiaje implica, para el ganado de los sistemas a escala familiar, un pobre aporte de materia seca y disminución de nutrientes (proteína y energía) con su consecuente disminución productiva (Solorio y Solorio, 2002). Ante esta situación, el ganadero opta por trasladar sus animales a otras zonas de pastoreo, vender ganado a bajo precio (previo al estiaje), utilizar el sobrepastoreo de praderas nativas, comprar pacas de esquilmos agrícolas a precios elevados, rentar praderas inducidas o simplemente, no hacer nada; esperando que sus animales sobrevivan de la mejor manera, durante la época de estiaje (FUPROCAM, 2009).

Ante la insuficiencia de recursos forrajeros durante la época de estiaje, los productores de las zonas rurales áridas y semiáridas del país han optado por una serie de estrategias alimenticias basadas en el uso de plantas autóctonas resistentes a la sequía (Urrutia *et al.*, 2014). Dentro de estas estrategias, se encuentra el uso del nopal (*Opuntia spp*).

2.2 Utilización de nopal (*Opuntia spp*) en la alimentación del ganado en época de estiaje.

De acuerdo con las características climáticas de las regiones áridas, y su efecto negativo sobre la producción de forrajes, surge la necesidad de incorporar especies forrajeras, eficientes bajo condiciones de sequía, a la dieta del ganado (Reveles *et al.*, 2010) y, el nopal, dentro de otras especies forrajeras nativas, es una alternativa, para complementar la alimentación de los animales en esas regiones (Ortiz *et al.*, 2012), debido, entre otras características, a su capacidad de adaptación bajo condiciones adversas de humedad (Flores, 2001).

Opuntia spp ha sido comúnmente utilizada como alimento de emergencia para el ganado durante épocas de extrema sequía (Le Houérou, 1994). Debido, en esencia, a su disponibilidad en las zonas áridas y semiáridas bajo condiciones de estiaje. Lo que convierte a esta planta en un recurso valioso que puede ser consumido por el ganado de forma directa (fresco) o procesado (ensilado) (López, 2015; Reveles *et al.*, 2010). Además, dicha planta posee 85% de agua, recurso de

mayor demanda en condiciones de sequía. Mientras que el resto del nopal (15%) está compuesto de materia seca: celulosa, hemicelulosa, vitaminas y minerales (Becerra *et al.*, 2002). Debido a ello, el nopal se ha convertido en un forraje importante en muchas partes del mundo, tanto en poblaciones cultivadas como silvestres (Torres, 2010; Kiesling, 1998).

En la actualidad, el nopal empieza a ser no solo un alimento emergencia, sino un complemento de la dieta del ganado que ha demostrado un impacto positivo sobre los costos de alimentación (López, 2010). En los ovinos, se ha demostrado que puede adicionarse hasta un 25% de harina de dicha cactácea a la ración, sin que se modifique la ganancia diaria de peso (Muciño *et al.*, 2014). En el caso concreto de investigaciones del efecto del nopal como parte de la dieta del ganado lechero sobre la producción de leche, estas fueron inicialmente reportadas por Santana *et al.* (1972), quienes no encontraron diferencia ($P>0.05$) en producción de leche y contenido grasa entre los grupos de vacas alimentadas con: a) silo de maíz, b) *Opuntia spp* y, c) *Opuntia spp* más silo de maíz. Sin embargo, la ganancia diaria de peso fue diferente ($P<0.05$) con cada tratamiento: 437, -465 y -230 g d⁻¹, respectivamente.

Opuntia spp se utiliza, de manera general en forma de harina en sustitución parcial de maíz, en la dieta de finalización para Ovinos en corral, con proporciones de 0, 33, 67 y 100% de nopal. Como resultado, no se observó diferencias ($P>0.05$) en el consumo de materia seca y rendimiento de la canal de los ovinos alimentados con

las diferentes proporciones de nopal; No obstante, el consumo de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido aumentaron ($P < 0.05$) de manera lineal, mientras la ganancia de peso fue menor ($P < 0.05$) conforme se sustituyó el maíz por *Opuntia spp.* Por ello, se sugiere que el uso de harina de nopal como sustituto de maíz en la engorda de ovinos no es recomendable (Liberal *et al.*, 2005)

Investigaciones referentes al uso del nopal como único alimento en la dieta de los bovinos, bajo condiciones de trópico, demostraron que bovinos raza Girolando en lactación con consumos de 7 kg de *Opuntia spp* d^{-1} vaca $^{-1}$, presentaron producciones de 10 kg de leche d^{-1} vaca $^{-1}$. Sin embargo, se observó una pérdida de peso corporal de hasta 640 g d^{-1} debido principalmente al bajo contenido proteico (4 a 5%) de dicha cactácea (Cordeiro y Gonzaga, 2003).

2.3 Efecto de la complementación de la dieta de vacas Holstein con *O. ficus-indica* en época de estiaje sobre la producción y calidad de la leche

En el proceso de producción animal, la complementación de la dieta de los bovinos es una práctica de ajuste que se ha utilizado para optimizar la productividad de los animales en circunstancias biológicas y económicas particulares, que afectan negativamente a las explotaciones ganaderas y que ponen en riesgo la rentabilidad del sistema (Pordomingo, 2003). Por ello, cuando los sistemas de bovinos a escala familiar son afectados por escases de recursos

forrajeros (época de estiaje) y la compra de insumos no es costeable, complementan la dieta del ganado bovino con diversos forrajes autóctonos de cada región (Reveles *et al.*, 2010). Para el caso de dietas complementadas con nopal para bovinos Holstein se ha corroborado que, en época seca tiene efecto positivo sobre la producción y calidad de la leche (Ortiz *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013)

O. ficus-indica se considera como un forraje succulento, rico en agua y mucílago, con niveles significativos de calcio (1.8 a 2.5 %), potasio (1.5 %) y magnesio (0.7 a 1.1 %) (Wanderley, 2001). Además, presenta hasta un 70% de carbohidratos no estructurales (fructooligosacáridos, inulina, mucilagos, pectinas y almidones) y una aceptable digestibilidad (65 a 80%) de materia seca y materia orgánica: 78 a 81% (Bezerra *et al.*, 2002; Torres, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010). No obstante, posee un bajo contenido de materia seca (10 a 14 %), fibra detergente neutra (26,8%) y proteína cruda: 4.0 a 6.0%) (Vázquez *et al.*, 2007).

López (2010), estableció que el valor de la proteína del nopal solo permite utilizarlo como complemento de la dieta para rumiantes domésticos con el fin de mantener su productividad durante la época de estiaje. No obstante, investigaciones referentes a la utilización del nopal como complemento de la dieta de vacas lecheras sugieren que esta planta es una alternativa para incrementar la producción de leche en época de estiaje, además de que mejora la calidad de la misma (Ortiz *et al.*, 2012)

Gonzales *et al.* (1998), sustituyeron parcialmente alfalfa por cuatro niveles de *O. ficus-indica*: 0, 10, 20 y 30% del total de materia seca, en la dieta de bovinos productores de leche, y observaron que al aumentar el porcentaje de nopal en la dieta, disminuye ($p < 0.01$) la producción de leche en 24.1, 23.3, 22.5 y 20.9 kg d⁻¹, y el consumo de materia seca (MS) en 22.9, 21.6, 19.9 y 18.3 kg d⁻¹, respectivamente; en cambio la producción de leche por kg de MS, se incrementó en forma lineal ($P < 0.01$) 1.05, 1.08, 1.13 y 1.15. Por lo que, concluyen que el nivel de 20% de nopal en la dieta parece ser la más adecuado.

Investigaciones recientes, han demostrado el efecto de la inclusión de *O. ficus-indica* (10, 20 y 30 kg d⁻¹) a las dietas de vacas Holstein, y reportan que al complementar la dieta con 10 y 20 kg d⁻¹ de nopal aumenta ($P < 0.05$) la producción láctea a 13.394 y 13.103 kg de leche d⁻¹, respectivamente, siendo ambos tratamientos estadísticamente iguales entre sí ($P > 0.05$) y diferentes ($P < 0.05$) a la adición de 30 kg d⁻¹ (12.294 kg de leche d⁻¹). Por lo tanto, concluyen que la inclusión de 10 y 20 kg d⁻¹ de nopal a la dieta de las vacas fue el nivel de complementación que mejor se desempeñó sobre la producción láctea (García *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2012).

Ortiz *et al.* (2010), establecieron que, al complementar la dieta de los bovinos con *O. ficus-indica*, se incrementa no solo la producción de leche, sino que mejora la calidad y vida de almacén de los subproductos lácteos, por ello sugieren que el

nopal es una alternativa viable para mejorar la productividad de dichos animales, puesto que con niveles de inclusión de $12 \text{ kg d}^{-1} \text{ vaca}^{-1}$, se incrementó el volumen de producción láctea a 10.864 kg d^{-1} con respecto a 7.084 kg d^{-1} de leche de vacas sin complementar. Así mismo, se demostró que al administrar $12 \text{ kg d}^{-1} \text{ vaca}^{-1}$ como complemento de dietas para bovinos productores de leche, la producción láctea y sus derivados (queso fresco) son de mayor calidad organoléptica: consistencia, olor, textura y rendimiento. Además, la vida de almacenamiento de los derivados de la leche se incrementa, debido a que los efectos del nopal sobre dichos productos, pudieran atribuirse a la disminución de la tasa de reproducción de los microorganismos que causan la descomposición (Ortiz *et al.*, 2012).

Se ha demostrado el efecto positivo de *O. ficus-indica* sobre la producción de leche (Moreno *et al.*, 2013) y posiblemente sobre la calidad de los subproductos de esta (Ortiz *et al.*, 2012). Por lo que es probable que tales cambios en los productos lácteos, sean atribuidos al efecto de los componentes del nopal (carbohidratos, fibra detergente neutra y ácida, así como los niveles altos de calcio, entre otros más) mismos que son transformados a nivel ruminal, por la flora microbiana, e incrementan las proporciones de los productos finales de dicho proceso entre los cuales se encuentran los ácidos grasos volátiles (AGV), energía (ATP) y amoníaco (NH_3) (Figura 2) (Araujo y Vergara, 2007). No obstante, se debe tener en cuenta que, los productos finales de la fermentación ruminal

dependen de las poblaciones microbiológicas y de las interacciones que se dan entre estas (Díaz *et al.*, 2008).

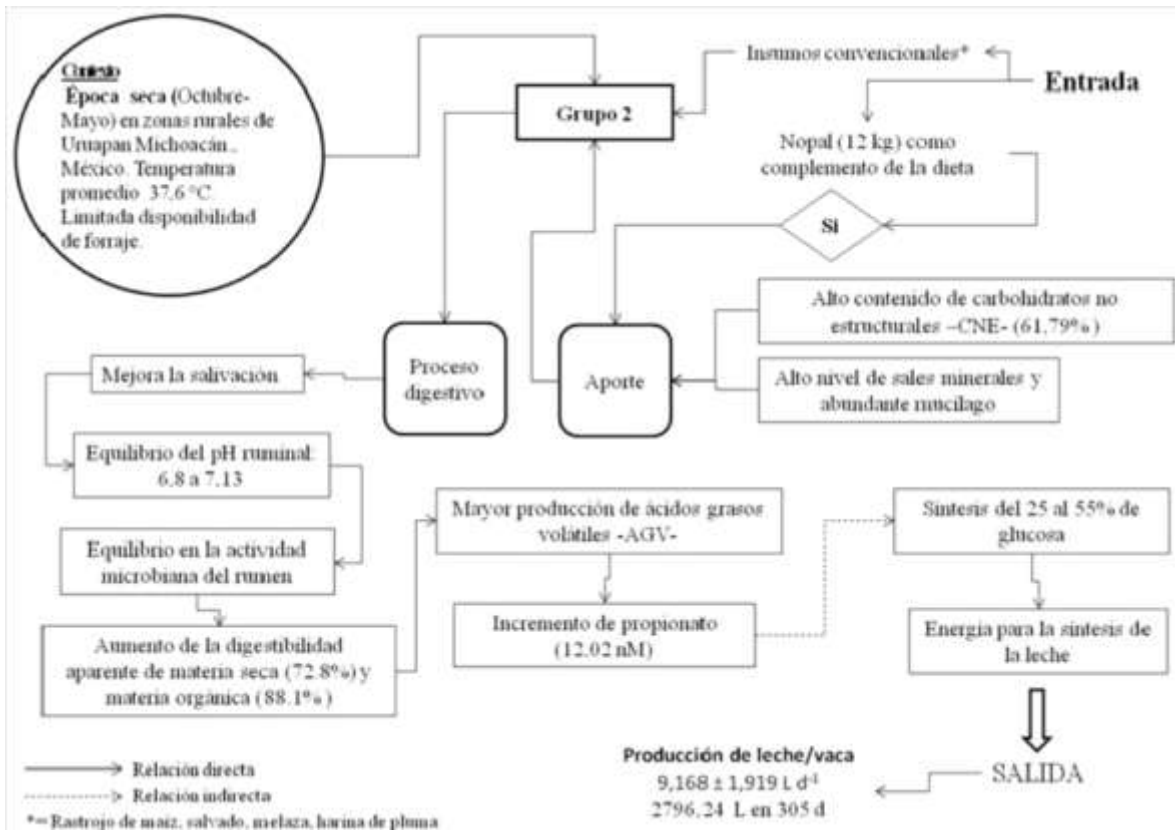


Figura 2. Conceptualización del efecto de *O. ficus-indica* como complemento de la dieta de vacas Holstein durante la época de estiaje, Grupo 2=bovinos que se alimentaron con nopal.

Fuente: Gracia *et al.* (2013)

2.4 Técnicas para predecir la fermentación de los forrajes en los rumiantes

El desempeño productivo de los rumiantes está determinado principalmente por el valor nutricional de los componentes de la dieta que consumen (Posada y Noguera, 2005). Básicamente, las cualidades que hacen nutricionalmente atractivo

un alimento para los bovinos se basan en su composición intrínseca, su digestibilidad a nivel ruminal, la producción de ácidos grasos de cadena corta y su efecto sobre las poblaciones microbiológicas ruminales (Colombatto, 2004).

La evaluación del valor nutricional del alimento para bovinos, ha sido realizado por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* (Givens *et al.*, 2000). Los métodos *in vivo*, se basan en la alimentación controlada de una serie de animales, donde se determina el consumo de materia seca y, se compara con la proporción excretada. Como resultado, es posible suponer la cantidad de la dieta que han sido absorbidas por el animal, lo que se define como digestibilidad aparente de la alimentación. No obstante, lo que se observa con esta metodología no es la digestibilidad verdadera, ya que en el proceso de digestión de los carbohidratos también se obtiene gases como el metano, el cual se pierde como eructos y no se absorbe. Además de los residuos de alimento sin digerir, las heces contienen enzimas y otras sustancias secretadas en el intestino, que no son reabsorbidos, así como fragmentos de la mucosa intestinal, que se desprenden como la alimentación pasa a través del intestino, lo que lo convierte en un método poco preciso (McDonald *et al.*, 1995).

La estimación nutritiva de los alimentos mediante técnicas *in situ* o *in sacco*, se han clasificado entre las metodologías más precisas. Dicho proceso requiere de animales canulados, a los cuales se les ajusta una serie de bolsas de nylon con una muestra de la dieta, previamente pesada y deshidratada. Posteriormente, se

retiran los sacos a diversos lapsos de tiempos, se secan y pesan; la degradación de la dieta se observa de acuerdo a las horas de incubación ruminal (Edmunds *et al.*, 2012). Sin embargo, este es un proceso laborioso y costoso que requiere el empleo de altas cantidades de alimento, uso de mano de obra especializada, disposición de animales canulados e instalaciones para su cuidado (Giraldo *et al.*, 2007).

La técnica de producción de gas *in vitro*, a diferencia de las técnicas *in vivo* e *in situ*, no sólo determina la extensión, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado, directamente como un producto de la fermentación (Orskov y McDonald, 1979). Dicha técnica, simula las condiciones del ambiente ruminal (temperatura, Ph, capacidad buffer, anaerobiosis, fuentes de nitrógeno) y, mediante la incubación de pequeñas cantidades de la dieta, en frascos de vidrio, es posible predecir la producción de gas. Lo que indirectamente determina la degradación de la materia seca por parte de los microorganismos ruminales (Blümmel *et al.* 1999; Liu *et al.* 2002). En la actualidad, dicha técnica se complementa con la metodología descrita por Goering y Van Soest (1970), con la cual se analiza la digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutro (FDN) y de la materia seca, permitiendo un panorama extenso de la fermentación de los carbohidratos en el rumen. De aquí que la medición de la tasa de producción de gas *in vitro* pueda utilizarse para evaluar la extensión de la digestión de los ingredientes de la dieta (Stern *et al.* 1997)

Las técnicas para la evaluación nutricional de los forrajes, han sido desarrolladas con el objetivo de predecir la fermentación de los carbohidratos a nivel ruminal. Sin embargo, en la actualidad un adecuado estudio para determinar las cualidades nutricionales de un sustrato contempla la producción de gas *in vitro*, el análisis de las poblaciones microbianas del rumen bajo dicha dieta, la digestibilidad de los componentes de la dieta a nivel ruminal y los efectos de la ración sobre la productividad de los bovinos (Bruni y chilibroste, 2001).

2.5 Cambios en las poblaciones ruminales y su repercusión sobre la producción de gas *in vitro*.

La implementación de nuevas estrategias de alimentación animal, se han basado en la utilización de insumos forrajeros como suplementos o complementos a la dieta, que han permitido optimizar la producción animal bajo determinadas condiciones ambientales (Calsamiglia *et al.*, 2005). No obstante, algunas de las técnicas de alimentación que se han utilizado modifican las poblaciones ruminales y en consecuencia la producción de gas (Marrero *et al.*, 2010; Galindo *et al.*, 2007).

Generalmente las estrategias alimenticias implementadas en rumiantes, tienen como objetivos disminuir los costos y mejorar la producción animal. Una de las estrategias alimenticias que se han implementado, ha sido el uso de plantas

proteicas (*Samanea saman*, *Tithonia diversifolia* y *Albizia lebbek*) para la alimentación de bovinos en el trópico, y han reportado que la planta *Samanea saman* mejora la población de Bacterias Viables Totales de 7.66 UFC/ml para la dieta control vs 34.22×10^{11} UFC/ml, además de que la producción acumulada de gas fue de 8.1 ml menor ($P < 0.05$) que el tratamiento control, quien produjo 20.41 ml de gas. No obstante, al evaluar la producción de gas metano, el control es superior ($P < 0.05$) al tratamiento con *Samanea saman* (65.3 vs 4.3 μ l de CH₄, respectivamente), por lo que concluyen que el tratamiento con dicha planta no solo mejora las poblaciones microbianas del rumen y el aporte de proteína, sino que disminuye la síntesis de metano ruminal (Zabala, 2012).

Para la disminución de la emisión de gas metano por parte de los bovinos, la modificación de la dieta ha sido una de las estrategias más utilizadas, se probaron tratamientos a base de alfalfa molida y se suplementaron con ácido bromoetano sulfónico (0.5 mM), se identificaron y se cuantificaron bacterias totales, metanogénicas, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y hongos a las 0, 12 y 24 h de fermentación. Como resultado se demostró la disminución ($P < 0.001$) de la producción de metano, la cual se redujo cuatro veces con respecto al tratamiento control. Además, no se alteró la concentración de las poblaciones microbianas ruminales estudiadas, aunque las bacterias metanogénicas disminuyeron 1.5 veces su concentración en el rumen cuando este compuesto químico estuvo presente. Por lo que se recomienda el uso de dicho tratamiento en

la dieta de los bovinos, puesto que no solo disminuye la producción de metano sino que no altera las poblaciones fibrolíticas del rumen (Gonzales, *et al.*, 2006).

Villegas *et al.*, (2010), fermentan paja de sorgo durante 20 días con los hongos *Pleurotus sapidus* y *Fomes fomentarius*, y adicionan hidróxido de calcio Ca(OH)_2 al forraje. Mediante la técnica de producción de gas *in vitro* determinan la producción de acumulada de gas y de ácidos grasos volátiles, además determinan el crecimiento de la masa microbiana del rumen. Ellos establecen, que el tratamiento con Ca(OH)_2 mostró la mejor producción de gas fraccional ($P \leq 0.05$) de 0 a 40 h de fermentación y el volumen máximo de producción de gas (382.10 ml/g ms), mientras que *F. fomentarius* mejoró la producción de ácido acético, 24 h y la formación de masa microbiana ($P < 0.01$) con respecto a los demás tratamientos. Por lo que concluyen que el tratamiento con Ca(OH)_2 mejoró las características fermentativas de la paja y el tratamiento con hongos influyó en la formación de masa microbiana.

Mata *et al.*, (2006) comprobaron el efecto de la suplementación con harina de tres arbustivas forrajeras tropicales (*Gliricidia sepium*, *Morus alba* y *Hibiscus rosa-sinensis*) en el comportamiento productivo y la fermentación ruminal de corderos en crecimiento. Ellos determinan que la producción de ácidos grasos volátiles no se afectó por las dietas ($p > 0.05$), mientras que la dieta con harina de *Hibiscus rosa-sinensis* mostró ($P < 0.05$) la mejor ganancia de peso en los corderos con 78.4 g d^{-1} , con respecto *Gliricidia sepium* y *Morus alba* (50 y 53 g d^{-1} , respectivamente).

Además, la suplementación con harina de *Morus alba*, disminuyó el conteo de protozoarios y bacterias totales (Espinosa *et al.*, 2003).

La fermentación de los componentes de la dieta por parte de los microorganismos ruminales, tienden a generar una diferente proporción en los gases en función de la dieta que consume el rumiante y cuyo efecto repercute en la producción animal (Wattiaux y Terry, 2003). Además, no solo la producción y balance en los ácidos grasos de cadena corta determinan la eficiencia productiva en los animales, ya que la modificación negativa en las poblaciones ruminales, pueden disminuir la digestibilidad de los compuestos de la dieta y a su vez deprimir el aporte proteico microbiano al rumiante (Juárez *et al.*, 2012).

2.6 Clasificación de los principales microorganismos y sus productos de fermentación en el rumen.

El rumen es una porción del tracto digestivo de los rumiantes, que es altamente especializado, el cual facilita el almacenamiento y fermentación del forraje consumido (Gasque, 2008). La degradación y utilización del material ingerido por el rumiante están reguladas por la planta, el animal y las características de las poblaciones microbianas (Russell y Rychlik, 2001). Este órgano aporta un ambiente adecuado para el crecimiento de diversas poblaciones de microorganismos anaerobios, las cuales son responsables de la degradación de la

dieta que el animal ingiere (Wattiaux y Terry, 2003). Así mismo, dichos grupos de microbios se constituyen en función de los componentes que la dieta aporta (Krause, *et al.*, 2003).

Entre las condiciones ambientales del rumen se encuentran: la temperatura que se mantiene entre los 38 a 41°C, el potencial redox de -250 a -450 mV, pH entre 5.8 a 6.8, capacidad buffer hasta 150 l de saliva, y una presión osmótica entre 260 y 340 mOsM (Araujo y Vergara, 2007). Ello permite el crecimiento y reproducción de la microbiota que fermenta la dieta y, en consecuencia, produce una serie de gases relativamente útiles para el bovino. De tal manera que, la fermentación de la dieta por los microorganismos del rumen resulta en la producción de varios ácidos grasos de cadenas corta (ácidos grasos volátiles), CO₂ y CH₄ (Velez *et al.*, 2014). Para ello, el ambiente ruminal debe mantenerse estable; aspecto que se logra a través de la presencia de ácidos orgánicos, tales como: propionato, butirato y acetato, principalmente. Mismos que son producidos por la fermentación de los alimentos y el flujo constante de saliva, que actúan como solución amortiguadora en el órgano (Coria *et al.*, 2007).

La estabilidad del ambiente ruminal puede alterarse a consecuencia de cambios repentinos en la relación forraje-concentrado o en la composición de la dieta. Cambios que propician patologías ruminales, como el Meteorismo o la Acidosis ruminal, que alteran bruscamente las poblaciones microbiológicas del rumen, modifican los patrones de fermentación de los alimentos, limitan los mecanismos

de eliminación de gases del animal, afectan negativamente los patrones de pH y pueden llegar a causar la muerte del animal (Bach, 2007; Gasque, 2008; Guevara *et al.*, 2012).

Bajo condiciones normales o estabilidad ambiental ruminal, la mayoría de microorganismos ruminales son anaeróbicos estrictos y, estos pueden ser bacterias, protozoos y hongos. El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos (Carmona *et al.*, 2009; Galindo *et al.*, 2008). Por lo tanto, para su clasificación más general se ha tomado como referencia los sustratos que utilizan; algunos grupos microbianos degradan la celulosa, otros utilizan el almidón o la maltosa, la hemicelulosa y azúcares simples, entre otros (Carreño y Leguizamón, 2013).

En el rumen se encuentran entre 10^{10} y 10^{11} bacterias/g de contenido ruminal (Russell y Rychlik, 2001). Mismas que pueden agruparse en 32 géneros y 63 especies; de las cuales, 16 géneros y 28 especies se consideran funcionalmente importantes en términos de número y metabolismo (Rotger, 2005). Las bacterias son el grupo de microorganismos más abundante en el rumen, debido a que representan aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal y generan, proporcionalmente, la mayor actividad metabólica ruminal (Relling y Mattioli, 2003).

Las bacterias se pueden clasificar en función del sustrato que utilizan, de los productos formados o de sus requerimientos nutricionales. En función de su principal sustrato de fermentación, se pueden clasificar en microorganismos que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o lípidos (Montalbetti, 2009). En una clasificación más extensa, se puede incluir el grupo de bacterias productoras de metano, de amoníaco y bacterias con actividad ureasa (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen de acuerdo al tipo de sustrato que fermentan.

Sustrato que degradan	Especies de bacterias	Productos finales
Celulolíticas (celulosa)	<i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus flavefaciens</i> ; <i>Ruminococcus albus</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	AGV (Acetato y propionato principalmente)
Proteolíticas (proteínas)	<i>Ruminobacter amylophilus</i> ; <i>Prevotella ruminicola</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Streptococcus bovis</i>	Amoníaco (NH ₃)
Hemicelulolíticas (hemicelulosa)	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Prevotella ruminicola</i> ; <i>Ruminococcus</i> sp	AGV (Acetato y propionato principalmente)
Utilizadoras de lípidos	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Treponema bryantii</i> ; <i>Eubacterium</i> sp; <i>Fusocillus</i> sp; <i>Micrococcus</i> sp	Ácidos grasos libres y propionato
Pectinolíticas (pectina)	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Prevotella ruminicola</i> ; <i>Lachnospira multiparus</i> ; <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> ; <i>Treponema bryantii</i> ; <i>Streptococcus bovis</i>	AGV (especialmente butirato)
Productoras de metano	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> ; <i>Methanobacterium formicicum</i> ; <i>Methanomicrobium mobile</i>	Metano (CH ₄)
Amilolíticas (almidón)	<i>Ruminobacter amylophilus</i> ; <i>Streptococcus bovis</i> ; <i>Succinomonas amylolytica</i> ; <i>Prevotella ruminicola</i>	AGV (especialmente propionato)

Productoras de amoniaco	<i>Prevotella ruminicola</i> ; <i>Megasphaera elsdenii</i> ; <i>Selenomonas ruminantium</i>	Amoniaco (NH ₃)
Utilizadoras de azúcares	<i>Treponema bryantii</i> ; <i>Lactobacillus vitulinus</i> ; <i>Lactobacillus ruminus</i>	AGV (Butirato)
Ureolíticas (urea)	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> ; <i>Selenomonas</i> sp; <i>Prevotella ruminicola</i> ; <i>Ruminococcus bromii</i> ; <i>Butyrivibrio</i> sp.	CO ₂ y NH ₃
Utilizadoras de ácidos	<i>Treponema</i> sp; <i>Megasphaera elsdenii</i> ; <i>Selenomonas ruminantium</i>	Lactato, propionato, acetato, formiato

Fuente: Yokohama y Johnson, 1988; Relling y Mattioli (2003)

La clasificación de las bacterias no es absoluta, pudiendo ser o no especializadas en cuanto al tipo de sustrato que fermentan y la mayoría de ellas son capaces de fermentar varios sustratos (Kanra 2005; Krause *et al.*, 2003); tal es el caso de la actividad proteolítica, esta se ha descrito en el 38% de las bacterias ruminales, por lo que bacterias pertenecientes a otros grupos, pueden degradar la proteína. Al haber especies que se superponen en la utilización de un determinado sustrato, aumenta la eficacia de utilización de dicho componente y al ser ésta una población diversa, la fermentación será más estable, evitándose grandes fluctuaciones en las cantidades y proporciones de los productos finales formados (Yokohama y Johnson, 1988).

Otra clasificación bacteriana, es la que se hace en función de la fase física a la que se encuentran asociadas dentro del rumen (Adams *et al.*, .2006). Aproximadamente el 70% de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimento y son las responsables, en mayor parte, de la degradación ruminal. Un segundo grupo bacteriano más inespecífico, se encuentra asociado a

la fase líquida y está formado por las bacterias que se han desprendido de las partículas y poblaciones con altos ritmos de división que subsisten a partir de nutrientes solubles en el líquido ruminal. Finalmente, un tercer grupo de bacterias anaeróbicas facultativas adheridas al epitelio ruminal. Estas bacterias asociadas al epitelio ruminal consumen rápidamente el oxígeno que entra con el alimento y el agua, y están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir activamente en la degradación del substrato (Almaraz, 2011). También tienen gran actividad de proteasa y ureasa, mediante la cual intervienen en el reciclaje de urea proveniente del torrente sanguíneo (Carreño y Leguizamón, 2013).

En relación a la cantidad de protozoarios en el rumen, estos oscilan de unas 10^5 a 10^6 células/g de contenido ruminal y en su mayoría son ciliados y flagelados (Zapata *et al.*, 2011), mismo que están influenciados por las prácticas de alimentación: incremento de protozoarios con dietas de alta digestibilidad o con dietas con grandes cantidades de azúcares solubles (Bach, 2005). Se considera que los protozoarios ruminales tienen la capacidad de digerir la fibra, aunque esto no se encuentra particularmente bien definido. No obstante, se ha demostrado que los protozoarios ingieren bacterias activamente, lo que en consecuencia es utilizado por el animal como un aporte de proteína microbiana, ya que en el proceso de vaciado ruminal lleva consigo gran parte de la microbiota. Así mismo, es posible que actúe como un factor de estabilización para la fermentación de los productos finales (Calsamiglia *et al.*, 2005).

En lo que respecta a los hongos, estos representan aproximadamente hasta un 8% de la biomasa microbiana total del rumen cuando se alimentan con dietas forrajeras y se especializan en colonizar la pared celular de las plantas (Benavides y Adriana, 2011). Puesto que, estos poseen un complejo enzimático (celulosoma) que hidrolizan los enlaces β -1-6, β -1-3 y β -1-2, presentes en los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa); como *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces* y *Orpinomyces*, quienes poseen actividad celulolítica tan eficiente como gran parte de las bacterias ruminales.

Los hongos ruminales, aportan la mayoría de xilosas disponibles para los bovinos (Montalbetti, 2009). Sin embargo, la proliferación de hongos se ve afectada negativamente cuando: a) se suministran dietas ricas en concentrado o en forrajes de alta calidad con tiempos de retención más cortos; y b) incrementa el número de bacterias en el rumen (Stewardt *et al.*, 1992). Dehority y Tirabasso (2000), establecen que dicho efecto, también llamado antibiosis es caracterizada por una disminución en las proporciones de hongos conforme aumenta la cantidad de bacterias. Posiblemente, este efecto es debido a: i) al proliferar las bacterias existe una disminución de la energía disponible para el enquistamiento de las zoosporas; ii) las bacterias producen un compuesto inhibitorio (factor S) que impide la unión de los hongos a los sustratos, limitando su nutrición y su multiplicación.

La diversidad en los microorganismos ruminales, proporcionan al hospedero la habilidad de degradar y adaptarse a las fluctuaciones de los componentes de la

dieta. Puesto que, las poblaciones microbianas, se especializan en degradar compuestos específicos de la alimentación de los bovinos y en efecto la producción de ácidos grasos de cadena corta tendrá un diferente patrón correspondiente al sustrato que se degrade. De tal manera que, la alimentación de las poblaciones microbianas, permite al bovino obtener el combustible metabólico que se traducirá en las cualidades productivas del hospedero.

2.7 Interacción de las poblaciones microbianas del rumen y la dieta de los bovinos.

La dieta es el factor determinante sobre el tipo y las proporciones de poblaciones microbianas, por lo que determina el perfil de fermentación ruminal (Relling y Mattioli, 2003). Las diferencias son máximas entre dietas forrajeras y dietas ricas en concentrado; las dietas forrajeras favorecen el establecimiento de una flora fibrolítica, donde predominan bacterias del género *Butyrivibrio* spp. Mientras que en dietas concentradas con bajos niveles de fibra, la concentración bacteriana es mayor, con poblaciones amilolíticas donde predominan bacterias del tipo *Selenomonas*, *Peptostreptococos* y *Lactobacilos*. Estas dietas suelen tener altas velocidades de digestión y de producción de ácidos, por lo que el medio se acidifica y se reducen las poblaciones celulolíticas y metanogénicas que son más sensibles al pH ácido (Wattiaux, y Terry, 2003).

El mayor riesgo para las poblaciones celulolíticas y hemicelulolíticas del rumen, se produce al introducir grandes cantidades de concentrado en animales que reciben una dieta forrajera, por su efecto sobre las bacterias que producen y utilizan lactato (Vidal, 2011). En un primer momento, por efecto de un descenso en el pH, desaparecen las bacterias utilizadoras de lactato y las amilolíticas son sustituidas por otras bacterias productoras de lactato, llevando a un descenso de pH más grave, y una acidosis láctica. Pero al adaptarse las poblaciones formadoras de lactato y las utilizadoras se equilibran (Salcedo *et al.*, 2012). Puesto que, ante un cambio de dieta, la población tiene que adaptarse hacia un nuevo equilibrio (Mendoza *et al.* 2008).

Belanche *et al.* (2012), demostraron que al disminuir las proporciones de nitrógeno de la dieta (de 110 a 80% de las necesidades de la vaca) y cambiar los carbohidratos que consume (fibra detergente neutro a almidón) se presentó un cambio de las poblaciones microbiológicas del rumen. De tal manera que, cuando se alimentó con fibra detergente neutro a los bovinos aumentaron las poblaciones de bacterias en general y, se incrementaron las proporciones de protozoos (38%), hongos anaerobios (59%) y los organismos metanógenos (27%). Así mismo, aumentaron las concentraciones totales de ácidos grasos volátiles, en comparación al proporcionar almidón en la dieta.

Por su parte, Shingfield *et al.* (2012), al utilizar cuatro vacas con cánula insertada en el rumen y sometidas a cuatro niveles de adición vaca⁻¹ de aceite de pescado

(0, 75, 150, o 300 g d⁻¹) y una dieta a base de ensilaje de pasto, encontraron que, las poblaciones correspondientes a *Butyrivibrio* spp disminuyeron linealmente en respuesta de las dosis de aceite de pescado, así mismo aumentaron las concentraciones de AGV's, principalmente un aumento de butirato y propionato. Con respecto a la proteína, cuando se alimentó con bajos niveles de proteína (80% del requerimiento de N), se encontró que los microorganismos ruminales disminuyeron: bacterias totales (13%), hongos anaeróbicos (28%), organismos metanógenos (27%) y protozoarios (19%), así como también las bacterias celulolíticas y la diversidad microbiana en general, esto en comparación a cuando se proveen dietas altas en proteínas (Belanche *et al.* 2012). Estos hallazgos permitieron establecer que, el ecosistema microbiano del rumen está directamente relacionado con el patrón de fermentación ruminal.

2.8 Técnicas para determinar la dinámica de poblaciones microbianas del rumen

Para poder determinar los cambios de las poblaciones microbianas, se han utilizado técnicas como el cultivo bajo condiciones propias de dichos organismos o el conteo individual de algunos de estos en un ml de líquido ruminal (Nystrom, 2003). No obstante, la necesidad de establecer cultivos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales, no pueden ser cultivados usando técnicas tradicionales (Amann y Kuhl, 1998). Así mismo, se dificulta obtener

cultivos puros de ciertos microorganismos por que dependen de las actividades de otros microorganismos o porque no se conocen las condiciones para su cultivo (Díaz y Wancher, 2003). Por lo que, una de las técnicas que se han descrito para identificar el dinamismo de las comunidades microbiológicas del rumen es a través de métodos moleculares, los cuales analizan polimorfismos de fragmentos de genes de ARN ribosomal (ADNr) -secuencias que se han mantenido uniformes a lo largo de la evolución y cuya composición es única dependiendo cada microorganismo- al utilizar el ADN de los diferentes grupos microbiológicos para su clasificación (Krause, *et al.*, 2003). Sin embargo, para articular dichas técnicas en la identificación de microorganismos, es de suma importancia contar con ADN libre de contaminantes y en cantidad suficiente para su utilización (Krause *et al.*, 2001).

2.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR)

La PCR-TR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizada para amplificar y cuantificar regiones específicas de ADN. Para ello, se adiciona un fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN a amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente -un fluorocromo-, con el cual cada vez que una secuencia génica se duplica, es registrada por una serie de sensores propios del termociclador, permitiendo la cuantificación del ADN producido por ciclo. Sin embargo, esta técnica requiere la

especificación de los microorganismos que se van a analizar (González *et al.*, 2006)

2.8.2 Polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP)

El análisis mediante SSCP, es una técnica de rastreo de mutaciones basada en el distinto comportamiento electroforético que presentan las moléculas monocatenarias de ADN de acuerdo con su secuencia, en un gel de poliacrilamida no desnaturizante (The DCode™ Universal Mutation Detection System, 1996). De tal forma que, una molécula de ADN monocatenaria tiende siempre a formar estructuras secundarias debido a apareamientos internos entre sus bases. En consecuencia de dichos apareamientos, se forman estructuras tridimensionales de diferente conformación - dependiendo de la secuencia concreta de la hebra-, las cuales reciben el nombre de "conformomeros". De acuerdo con la forma adquirida por la molécula, ésta migrará con mayor o menor facilidad a través de un gel de electroforesis, pudiendo llegar a distinguirse de esta manera dos hebras de ADN cuyas secuencias sean muy parecidas. El método tiene una gran especificidad (>90%), pues la sustitución de una única base es capaz de hacer que la molécula adquiera una conformación tridimensional totalmente distinta. Por ello, la PCR-SSCP se ha utilizado para estudiar fluctuaciones de las poblaciones microbianas (Peters *et al.*, 2000), la identificación de bacterias patógenas en sangre (Turenne *et al.*, 2000), además de la identificación de mutaciones genéticas, principalmente

(Moreno *et al.*, 2009) y el estudio de comunidades microbianas en el líquido ruminal (Villegas *et al.*, 2013).

2.8.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, es una técnica molecular que logra detectar el cambio de hasta una base en una secuencia de ADN con una alta sensibilidad (aproximadamente 100%), por lo que su aplicación ha llevado a la detección de mutaciones en segmentos de ADN, así mismo se ha utilizado para determinar la presencia y el cambio de poblaciones microbianas en diversos ecosistemas (Boon *et al.*, 2002). Puesto que, la DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes del ADN (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de acrilamida (Palacios y Chassin, 2010). Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante (50-65 °C), y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (componentes desnaturalizantes) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe – Menor contenido de citosina-guanina limita el avance de la secuencia en el polímero-. Por lo tanto, fragmentos de ADN con diferentes secuencias tendrán diferentes posiciones en el gel (Cocolin, 2010).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos sobre el incremento de la producción láctea y la calidad de la leche, de los bovinos alimentados con dietas complementadas con *O. ficus-indica*, durante la época seca puede atribuirse a la diferente producción de ácidos grasos volátiles consecuencia del cambio de la diversidad de la flora microbiana presentes en el sistema ruminal, debido a la composición de la dieta en donde el nopal funge como complemento de la misma. Sin embargo, los estudios sobre la digestibilidad del nopal por parte de los microorganismos ruminales han sido limitados, ya que solamente se basan en las tasas de producción de gas que representa la degradación de este a nivel ruminal y analizan bajo cultivos específicos, grupos generales de microorganismos ruminales, lo que limita la comprensión de la ecología bacteriana cuando se complementa la dieta con nopal. Por lo que, es necesario determinar la producción de gas *in vitro* y su relación con las poblaciones microbianas del rumen cuando se complementa la dieta de los bovinos con *O. ficus-indica* con el objeto de comprender mejor su participación en los procesos de fermentación. Así mismo, es preciso estandarizar una técnica que permita determinar la dinámica y diversidad de las poblaciones microbianas del rumen.

4. HIPÓTESIS

La inclusión de *O. ficus-indica* en la dieta de los bovinos Holstein aumenta la producción de gas a *in vitro* al existir una relación directa entre la de inclusión de nopal (*O. ficus-indica*) en la dieta de bovinos productores de leche y el cambio de las poblaciones Microbiológicas del rumen.

La estandarización de la técnica DGGE permite identificar y determinar el cambio de las poblaciones microbianas del rumen cuando se complementa la dieta de bovinos productores de leche con *O. ficus-indica*.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el impacto del nopal (*O. ficus-indica*) sobre la producción de gas *in vitro* y determinar el cambio cualitativo de las poblaciones microbianas en rumen, durante la época de estiaje, en vacas Holstein a través de la estandarización de la técnica DGGE.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la producción de gas *in vitro* con una dieta complementada con 12 kg de *O. ficus-indica*
- Estandarizar la técnica DGGE para Identificar el cambio cualitativo de las poblaciones microbianas del rumen cuando se complementa la dieta de vacas Holstein con 12 kg d⁻¹ de *O. ficus-indica*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Producción de gas *in vitro*

La presente investigación se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), ubicado en el kilómetro 9.5 de la carretera Morelia-Zinapecuaro, municipio de Tarimbaro, Michoacán, México. Se evaluó la producción de gas y digestibilidad de la materia seca (MS) de dos dietas (DTA); una complementada con 12 kg -en materia fresca- de nopal (*O. ficus-indica*) o 1.8 kg de MS, y una control -sin nopal- (Tabla 1); mediante la técnica de producción de gas *in vitro* reportada por Menke y Steingass (1998).

Los ingredientes que conformaron cada DTA fueron secados a temperatura de 100 ± 5 °C durante 24 h, proceso seguido del molido (1 mm de diámetro) de los insumos; posteriormente, se realizó la mezcla correspondiente a cada DTA (Tabla 2).

Tabla 2 Materia seca de los insumos de cada dieta utilizada para la determinación de producción de gas *in vitro*.

Insumos	DTA1	DTA2
<i>O. ficus-indica</i>	1.8	0.0
Concentrado	4.5	4.5
Pasto estrella	1.0	1.0
Total	7.3	5.5

Se determinó el contenido de Fibra detergente Neutro (FDN), Fibra ácido detergente (FDA) y Cenizas en las cuatro dietas. Se utilizó la técnica de Van Soest *et al.* (1991) y un analizador de fibra ANKOM 2000® para determinar la FDN y FDA. Mientras que el contenido de Ceniza se determinó por incineración a 550 °C durante 6 h (Tabla 3).

Tabla 3. Composición química de las dietas evaluadas para la medición de la producción de gas *in vitro*

Componente	DTA1	DTA2
Proteína (g)	1164.30	1052
Energía (mcal)	20.82	16.32
Cenizas (%)	24.60	20.70
Fibra detergente Neutro (%)	66.50	67.70
Fibra ácido detergente (%)	25.80	33.90

Para la técnica de producción de gas *in vitro* se utilizaron 2 vacas Holstein como donadoras del líquido ruminal y alimentadas con silo de maíz. El líquido ruminal se recolectó a las 08:30 h, prepano, mediante la técnica de sonda esofágica descrita por Martin *et al.* (2005). El líquido ruminal se mantuvo en un termo a 39 °C hasta que se trasladó al laboratorio donde se filtró a través de cuatro capas de gasa. Al sobrenadante sólido se le añadió 100 ml de solución buffer (Menke y Steingass, 1988) y se agitó por 10 seg en una batidora (Oster ®) para separar los microorganismos de la fibra. Posteriormente, el filtrado de esta porción se incorporó a la fracción líquida, la cual se saturó con dióxido de carbono (CO₂).

El medio de cultivo para la producción de gas *in vitro* se preparó de acuerdo con la técnica de Menke y Steingass (1988). Se utilizaron frascos de cristal de 125 ml, previamente lavados y esterilizados, en los cuales -por triplicado- se colocaron 400 ± 10 mg de cada dieta; posteriormente, se les agregó 30 ml de medio de cultivo: 10 ml de líquido ruminal y 20 ml de solución buffer (Menke y Steingass, 1988), con un flujo continuo de CO₂ y se cerraron herméticamente. Inmediatamente después, los frascos se introdujeron en una estufa bacteriológica a 39° C y se inició el registro de la presión del gas a través de un transductor de presión (LT_{Lutron}, Manometer, PS-9302). Tanto la presión como el volumen de gas producido se midieron a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Para corregir la posible contaminación del contenido ruminal, por partículas de alimento del animal donante, se utilizaron dos frascos sin sustrato como blancos. La cinética de producción de gas se evaluó mediante el modelo, propuesto por Orskov y McDonald (1979):

$$PG = a + b * (1 - \exp^{-c*t}) \quad [1]$$

Donde:

PG= producción de gas (ml).

t = tiempo de incubación.

a = Representa el sustrato soluble y completamente degradable.

b = representa la fracción insoluble pero potencialmente degradable del sustrato el cual es degradado por los microorganismos de acuerdo con un proceso cinético de primer orden.

c = tasa constante de la función *b*.

Para estimar los parámetros del modelo (a, b y c) se utilizó la metodología de los modelos no lineales (NLIN, siglas en inglés) (Freund y Littell, 2000). Los efectos del tratamiento y tiempo de incubación en la producción de gas fueron analizados mediante la metodología de Efectos Fijos (Littell *et al.*, 2006). Las diferencias entre grupos se obtuvieron mediante la metodología de medias ajustadas por mínimos cuadrados (Littell *et al.*, 1996), de acuerdo con el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + DTA_i + Tiempo_j + (DTA * Tiempo)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = volumen de gas observado.

μ = media general.

DTA_i = efecto fijo de la i ésima DTA con $i = 1$ y 2 dietas, con y sin inclusión de nopal.

$Tiempo_j$ = efecto fijo del j ésima hora con $j = 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72$ y 96 h de incubación.

$(trat * tiempo)_{ij}$ = efecto de la interacción de la i ésima DTA * el j ésimo tiempo.

ξ_{ijk} = Error (NID $\sim 0, \delta^2$)

La digestibilidad *in vitro* del porcentaje de MS se estimó mediante la filtración del residuo en crisoles Gooch previamente digeridos en solución neutro detergente de acuerdo a lo señalado por Goering y Van Soest (1970); el secado de las muestras se efectuó en una estufa de convección a 100 ± 5 °C durante 24 h. La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DMS) se estimó utilizando la siguiente fórmula (Correa, 2007):

$$DMS (\%) = (PMS - (PR - PB)) * 100 / PMS.$$

Donde:

PMS= Peso de la muestra seca

PB= Peso del blanco

Los datos de digestibilidad se analizaron mediante Modelos Lineales Generalizados y las diferencias entre grupos se obtuvieron mediante la metodología de medias ajustadas por mínimos cuadrados (Littell *et al.*, 2002).

6.2 Modificación cualitativa de las poblaciones bacterianas del rumen.

La investigación se realizó en el sector de bovinos productores de leche, ubicado en el Rancho Experimental de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, localizada en Uruapan, Michoacán, México. Esta cuenta con climas cálido sub-húmedo, semicálido y templado húmedo; con temperaturas que oscilan entre 12.2 y 27.0°C; la precipitación pluvial anual de esta localidad es de 1,479 mm (Servicio Meteorológico Nacional, 2000).

El Rancho Experimental de la Facultad de Agrobiología-UMSNH cuenta con 18 vacas Holstein en producción, de 1 a 7 partos y con un peso promedio de 481.275 ± 53.976 kg de peso vivo, las cuales son alimentadas dos veces al día (8:00 y 13:00 hrs). Del total de las vacas en producción se seleccionaron tres vacas Holstein de cuatro partos, con un peso de 450 a 550 kg y 60 días de producción láctea en promedio. Las vacas fueron alimentadas durante 30 días con 4.5 kg d⁻¹

de concentrado y 1 kg d⁻¹ de pasto estrella africana (PEA) en materia seca (MS) como dieta base (T1). Posteriormente cada vaca recibió una dieta complementada con nopal (*O. ficus-indica*) durante cuatro días: (T2) 1.8 Kg d⁻¹ de nopal MS + 4.5 kg de concentrado + 1 kg d⁻¹ de PEA en MS (Tabla 4). De cada vaca, se obtuvo una muestra de 50 ml de líquido ruminal – se agregó 5% de glicerol estéril a la muestra- mediante la técnica oro-ruminal (Martin *et al.*, 2005), utilizando previa sedación con Xilacina, a una dosis de 0.05 mg/kg vía intramuscular (Sumano y Ocampo, 2006), a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de haberse suministrado la dieta y se congeló la muestra a -80°C hasta el inicio del trabajo de laboratorio (extracción del ADN).

El nopal se ofreció fresco y junto con el resto de la dieta. Para su mejor aprovechamiento, el nopal suministroo en trozos de 5 x 5 cm aproximadamente y con no más de 7 días de haberse cosechado.

Tabla 4. Dietas para bovinos productores de leche con y sin inclusión de nopal forrajero (*O. ficus-indica*) en época de estiaje

Dieta convencional para la época de estiaje (T1).				
Insumos.	MS	PC	EM	BH
Estrella Africana	1	100	1.8	3.3
Concentrado	4.5	900	11	5
Total	5.5	1000	12.8	8.3
Dieta con 12 kg de inclusión de nopal para la época de estiaje (T2)				
Insumos.	MS	PC	EM	BH
Estrella Africana	1	100	1.8	3.3
Nopal	1.8	112.3	4.5	12
Concentrado	4.5	900	11	5
Total	7.3	1112.3	18	20

Para determinar la dinámica poblacional del líquido ruminal tuvieron que ser estandarizadas las siguientes técnicas del protocolo: **a)** extracción de ADN de las poblaciones ruminales, **b)** amplificación de secuencias de interés de los diversos grupos microbiológicos del rumen, mediante la técnica de PCR y **c)** separación de secuencias mediante la electroforesis en gel con gradiente desnaturante.

6.2.1 Extracción de DNA de las poblaciones microbiológicas del rumen mediante lisis química con DNAzol®

El primer protocolo que se probó para la extracción de ADN de líquido ruminal mediante lisis química con DNAzol, consistió en utilizar de 4 ml de detergente DNAzol y 1 ml de líquido ruminal. Sin embargo, por cuestiones de equipo y material se probó con tubos de 1.5 ml donde se depositó 0.5 ml de fluido ruminal y 1 ml de detergente.

Como segundo protocolo para la extracción de DNA de los microorganismos ruminales, se ajustaron las proporciones de líquido ruminal a 300 μ l y se adiciona 1200 μ l de DNAzol® (Invitrogen) (proporción 1:4), se colocan en un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 ml (Villegas *et al.*, 2013).

En el segundo proceso de la extracción de DNA de líquido ruminal, la técnica establece el previo empestillado de las células ruminales y posterior aplicación del detergente, proceso seguido por la aplicación de vortex hasta disolver la pastilla y posteriormente se centrifuga (Chomczynski, 1993). No obstante, se probó la

aplicación directa del detergente al líquido ruminal, sin previo empastillado, se aplicó Vortex durante 1 minuto y se llevó a centrifugar a 10,000 RPM durante 10 minutos en una centrifuga Avanti J-25.

El sobrenadante fue recobrado, y se dividió en partes iguales en dos tubos eppendorf de 1.5 ml cada uno, después se prueban dos métodos para precipitar el DNA: **1)** agrega un volumen de isopropanol a cada tubo (1:1); **2)** se agregó dos volúmenes de etanol absoluto (2:1) (Luque y Herráez, 2002). Se mezcla manualmente, para después incubarse en hielo durante 15 minutos. Después, se centrifuga a 10,000 RPM por 10 minutos y se decanta los alcoholes. Se lava tres veces la pastilla con etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se resuspende en 100 µl de una solución búfer TE (Tris-HCl 10 mmol l-1, EDTA 1 mmol l-1, pH 8,0)

6.2.2 Purificación del ADN de las poblaciones microbianas del rumen

Se midió la absorbencia de cada muestra con un espectrómetro Cary® 50 UV-Vis, las proporciones de DNA y proteína deben de ser 2:1 respectivamente, si las proporciones de proteína son superiores se purifica el DNA. Para ello, se utiliza una solución fenol: cloroformo: alcohol isoámilico (25:24:1). En un tubo eppendorf de 1.5 ml, se coloca 200 µl de DNA de tubos que contengan la misma muestra y 200 µl de dicha solución (proporción 1:1), se agito en Vortex por 20 segundos y se

centrifuga a 10,000 RPM durante 10 minutos. Finalmente, se observa tres fases en el tubo, la superior o acuosa contiene el DNA, la intermedia muestra la proteína y la que se encuentra al fondo es la orgánica. La fase acuosa se extrae y se deposita en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril. Posteriormente, para eliminar los residuos de fenol, se mide el volumen de cada tubo y de ser necesario se agrega un volumen de Buffer T hasta completar 250µl. Se agrega 1 volumen de una solución cloroformo: alcohol isoámilico (24:1). Se recupera el sobrenadante y se cambia a otro tubo estéril, se agrega una solución de cloruro de sodio 5 M (concentración final de 0.3 M), se agrega 1 volumen de isopropanol, el DNA se empastilla en una centrifuga a 10,000 RPM durante 5 minutos, el sobrenadante se decanta y se lava 2 veces la pastilla con etanol al 70%, se resuspende el DNA con 100 µl de buffer T. Se mantiene a 4°C hasta su amplificación.

6.2.3 Amplificación de los ARNr de diferentes grupos microbiológicos del rumen

Las secuencias de ADN de las comunidades microbiológicas del rumen se amplifican mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés). Utilizando los oligonucleótidos generales para diferentes grupos microbiológicos (Whitford *et al.*, 2001). Para ello, se utiliza una proporción de 5 µl de DNA y se mezcla con 45 µl de solución maestra (Tabla 5). Y se probaron dos diferentes condiciones para su amplificación:

1.- Para esta reacción se utilizó el DNA purificado; los reactivos se mezclaron en un solo tubo eppendorf de 1.5 ml para formar una solución “maestra”, de la cual se utilizó 45 µl y se mezclaron 5 µl de ADN. Las condiciones de la reacción son: 30 ciclos a 96°C durante 5 minutos, 95°C durante 0.5 minutos, 50°C por 0.5 minutos, 65°C por 4 minutos, 65°C por 7 minutos y 15 minutos a 4°C (Villegas, 2007).

2.- El cambio al protocolo de la amplificación consistió en la separación de la taq polimerasa de la solución maestra y los reactivos, que establece el protocolo, se depositaron individualmente en tubos eppendorf. Para posteriormente replantear las condiciones de reacción 1 ciclo por 5 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos a 3 temperaturas (T1: 94°C 1.50 minutos, T2: 62°C 1.50 minutos y T3: 72°C 2 minutos), un ciclo a 72°C 20 minutos y un último ciclo a 10°C durante 15 minutos (Lee y Kim, 1996).

Tabla 5. Concentración y volumen de los reactivos para la PCR.

Reactivo	Concentración final	Stock	Adicionar
ADN	100 ng	Calcular	5 µl
DNTP´s	200nM	2.5 mM	10 µl
Búfer 5x	1x	5x	10 µl
Mgcl ₂	1.5mM	25 Mm	3 µl
Oligo srv31	500 nm	10 mM	1 µl
Oligo srv32	500 nm	10 mM	1 µl
Taq DNA polimerasa	5 U	300 U	0.2 µl
H ₂ O	c.b.p. 50µl		19.8 µl

6.2.4 Protocolo para el análisis de secuencias mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE)

Para la aplicación del protocolo de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, se siguieron las pautas descrita en el The DCode™ Universal Mutation Detection System (1996), se preparó un gel con un 10% de concentración, sugerido para productos de PCR de aproximadamente 100 a 300 pares de bases (pb), y se utilizó un gradiente desnaturizante de 40 a 60% (Sadet et al., 2007) en un gel de acrilamida en paralelo. Para ello, se prepara una solución “madre” al 40% de acrilamida/bisacrilamida (37.5:1), la cual se utilizó para la preparación soluciones desnaturizantes al 40% y al 65%, además se adiciono a estas soluciones: buffer TAE 50x, formamida y urea (Tabla 6).

Tabla 6. Agentes y cantidades para las soluciones “baja” y “alta” de desnaturización para la DGGE.

Agente	Cantidad	
	40% desnaturizante	65% desnaturizante
40% Acrylamide/Bis	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50x	2 ml	2 ml
Formamida	16 ml	26 ml
UREA	17.6 g	27.2 g
H2O destilada	Para 100 ml	Para 100 ml
Total	100 ml	100 ml

Para la preparación del gel, se utilizó un sistema de control de inyección de las soluciones “alta” y “baja” estructurado por 2 jeringas de 10 y 20 ml, el cual se conectó a 2 vidrios en paralelo unidos o en forma de “sándwich” con una separación de 1 milímetro. En la parte superior de los cristales, se colocó un peine para marcar los pozos donde se depositó. Posteriormente, en dos vasos de

precipitado se colocan 10 ml de la solución de baja concentración (40%) y 15 ml de la alta (60%), en cada recipiente se agregó 0.09% de persulfato de amonio y TEMED, enseguida se cargó en la jeringa de 10 ml la solución al 65% y en la jeringa de 20 ml la solución con 40% de agentes desnaturalizantes.

Para depositar las soluciones “alta” y “baja” concentración a los cristales, se inyecta en mayor proporción el contenido de la jeringa de 10 ml y en menor la de 20 ml, para después invertir dicho proceso (menor inyección de la concentración alta y mayor la concentración baja) y se dejó polimerizar el gel durante 10 minutos y se extrajo el peine. Posteriormente, el “sándwich” se ensambló en el núcleo y se instaló en la cámara de electroforesis, se cargaron los productos de la PCR en cada pozo (2 mcg de DNA) y se mezcló con un volumen de un buffer 2x de carga. Se precalentó a 60°C y se agregaron 7 litros de buffer TAE 1x como conducto de corriente. Las condiciones de corrida fueron a 30 voltios y una temperatura constante de 60°C durante 12 horas. Una vez terminada la electroforesis, se retiraron los vidrios y se extrajo el gel de acrilamida.

En el segundo protocolo que se probó, la electroforesis se ajustó de acuerdo a lo establecido por Green *et al.* (2010), manteniendo una temperatura constante de 65°C y una corriente eléctrica de 180 voltios, para disminuir el tiempo de corrida a 3 horas y se probaron diferentes protocolos de tinción con nitrato de plata:

1). El gel se sumergió en una solución fijadora (5% de ácido acético glacial; 10% de alcohol absoluto y agua para 200 ml); manteniéndola en agitación suave y constante por 15 minutos sobre un agitador orbital (Daigger, modelo 3422406A) posteriormente se enjuagaron dos veces con agua desionizada. Enseguida se sumergió en una solución de tinción con nitrato de plata al 2% por 15 minutos en agitación suave y constante en un cuarto oscuro, se enjuagaron nuevamente dos veces con agua desionizada y por último se sumergieron en una solución de revelado (3% de hidróxido de sodio, 0.09% de formadehído) hasta lograr ver la definición de las bandas del marcador de tamaño molecular (1 Kb landder plus, Invitrogen) como control en la tinción (Villegas, 2007). Al final se lavó con agua destilada desionizada -2 minutos- y se colocó sobre una hoja de acetato para su mejor manipulación y se observaron las bandas en un transiluminador.

2) El gel se cubrió con solución fijadora (5% de ácido acético glacial; 10% de alcohol absoluto y agua para 200 ml); manteniéndola en agitación suave y constante por 15 minutos sobre un agitador orbital, se enjuagaron tres veces con agua desionizada. Enseguida se sumergió en una solución de tinción con nitrato de plata al 0.5% por 15 minutos en agitación suave en un cuarto oscuro, se enjuagó tres veces con agua desionizada, y se sumergió en una solución de revelado al 0.1% de hidróxido de sodio y 0.09% de formadehído hasta lograr ver la definición de las bandas del marcador molecular, se agrego la solución de “paro” (5% de acido acético glacial y agua desionizada para 200 ml) (Cid, 2012) y se enjuagó con agua destilada desionizada por 2 minutos;

3) solución fijadora (5% de ácido acético glacial; 10% de alcohol absoluto y agua para 200 ml), en agitación constante por 15 minutos, se enjuagaron tres veces con agua desionizada. Se sumergió en una solución de tinción con nitrato de plata al 0.5% por 15 minutos en agitación suave en un cuarto oscuro, se enjuagó tres veces con agua desionizada, y se sumergió en una solución de revelado al 1% de hidróxido de sodio y 0.09% de formaldehído hasta lograr ver la definición de las bandas del marcador, se agregó la solución de “paro” (5% de ácido acético glacial y agua desionizada para 200 ml) y se enjuagó con agua desionizada por 2 minutos. Finalmente, ambos geles se colocaron en un acetato y se llevaron a escanear para la visualización de las bandas. Para la conservación de los geles, se depositaron en un recipiente con 200 ml de agua destilada y el 5% de glicerol como humectante.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Producción de gas in vitro

La función de Orskov y McDonald permitió el ajuste de la PG *in vitro* y estimar la PG de las dietas analizadas (Tabla 3).

Se encontró que, la degradación de la fracción soluble del sustrato (a) de DTA1 fue igual ($P > 0.05$) a DTA2, produciendo 6.01 ml/400 mg de MS y 2.97 ml/400 mg

de MS respectivamente, de gas *in vitro*. Con respecto a la tasa degradable de la fracción insoluble del sustrato (b), las dietas presentaron valores promedio iguales ($P > 0.05$); cuyos valores oscilaron de 48 y 52 ml/400 mg de MS. En relación a la degradación de la fracción potencialmente degradable (c), no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre dietas y cuyos valores promedio fueron de 0.06 y 0.07 ml/400 mg de MS (Tabla 7). Para el caso de la fracción indigestible (a + b), esta obtuvo valores de 54.0 y 55.0 %, para DTA1 y DTA2, respectivamente. Así mismo, la degradabilidad potencial del sustrato a 96 h de incubación ruminal (100- a + b) fue de 45.9 y 44.9%, para DTA1 y DTA2, respectivamente.

Tabla 7. Estimadores de la función de Orskov y McDonald (1979) para determinar la producción de gas *in vitro* de las dietas evaluadas

Dieta (DTA)	Estimadores promedio					
	A	EE	B	EE	C	EE
Insumos (MS)						
DTA1						
Nopal*+concentrado ^{&} +1.0 kg pasto	6.0 _b	2.2	48.0 ^a	2.3	0.06 ^a	0.007
DTA2						
Concentrado ^{&} +1.0 kg pasto	3.0 ^{ab}	1.9	52.0 ^a	1.9	0.07 ^a	0.006

*=1.8 kg; [&]=4.5 kg

a= sustrato soluble y completamente degradable; **b**= fracción insoluble del sustrato; **c**= fracción potencialmente degradable

^{a,b}= diferencias estadísticas dentro de columna ($P < 0.05$)

El elevado contenido de carbohidratos no estructurales (CNE) que conforman al nopal (50-71%), lo convierten en un alimento que se fermenta rápidamente (Torres, 2010); factor que, posiblemente determina la mayor degradabilidad de la dieta DTA1 en comparación con DTA2. Andrade *et al.*, (2002), determinaron que el alto contenido de CNE por parte del nopal provoca un aumento de la actividad microbiana lo cual incrementa fermentación ruminal y la degradación del sustrato.

Con los parámetros determinados mediante la función de Orskov y McDonald (Tabla 3) se ajustaron las curvas acumuladas de producción de gas (ml/400 mg) para las dietas evaluadas (Figura 3). Se encontró que a partir de las 24 h comienzo a observarse una diferenciación de la PG: la DTA1 produce menos gas (43.5 ml/400 mg de MS) en comparación con DTA2; misma que produce 45.2 ml/400 mg de MS de gas *in vitro*.

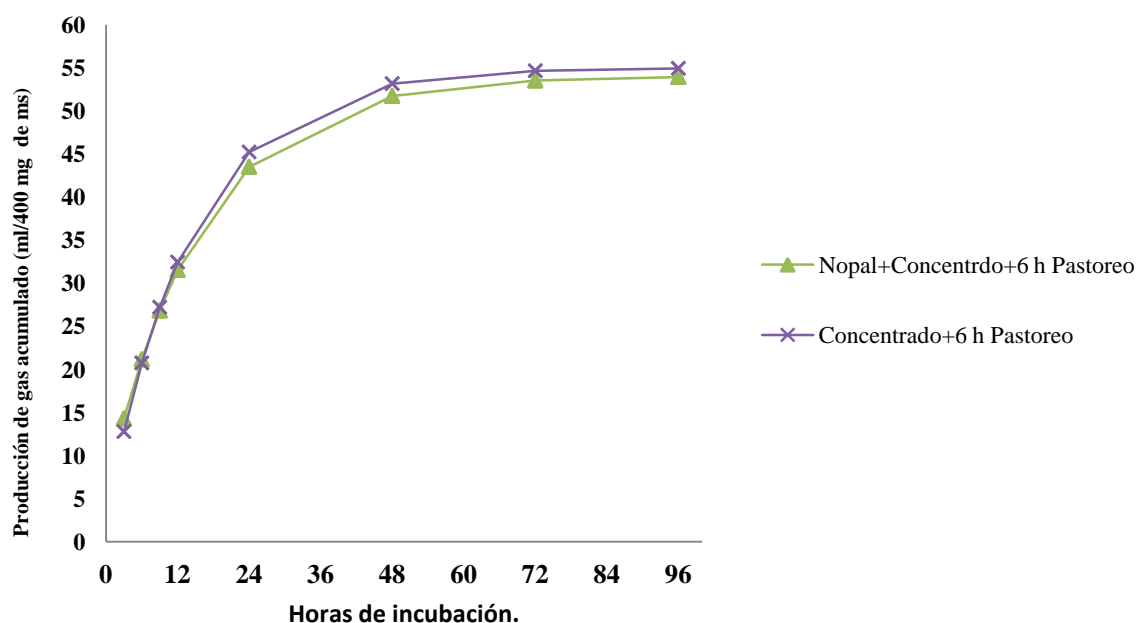


Figura 3. Total de gas acumulado durante el periodo de incubación *in vitro* de dos dietas: DTA1= nopal + concentrado + 6 horas de pastoreo y, DTA2= concentrado + 6 horas de pastoreo.

En la Figura 1, se puede observar que, la DTA2 a 48 h presenta mayor producción acumulada de gas ($P < 0.05$) con 53.2 ml/400 mg de MS en comparación con 51.7 ml/400 mg de MS de DTA1 (Tabla 4). El mismo comportamiento se encontró a 72

y 96 h; la DTA2 presentó mayor producción de gas: 54.7 y 54.9 ml/400 mg de MS, que DTA1, quien mostró 53.5 y 53.9 ml/400 mg de MS ($P < 0.05$) en ambos periodos (72 y 96 h) (Figura 1 y Tabla 4).

Tabla 8. Producción acumulado de gas (ml/400 mg de ms)

Dieta (DTA) Insumos (MS)	Producción de gas/horas de incubación		
	48	72	96
Nopal*+concentrado [§] + 1.0 kg pasto (DTA1)	51.7 ^a	53.5 ^a	53.9 ^a
Concentrado [§] + 1.0 kg pasto (DTA2)	53.2 ^b	54.7 ^b	54.9 ^b

*=1.8 kg; [§]=4.5 kg

^{a, b} =diferencias estadísticas ($p < 0.05$) dentro de columna.

La producción de gas resulta de la fermentación de los componentes solubles después de comenzar la incubación; subsecuentemente, un cambio gradual ocurre hacia la fermentación de las partes insolubles (carbohidratos estructurales o FDN), las cuales necesitan ser hidratadas y colonizadas por los microorganismos ruminales antes de ser fermentadas (Lara, *et al.* 2009). Sin embargo, la producción de gas que resulta de la fermentación de proteína y lípidos es escasa (Villegas *et al.*, 2010). Omed *et al.*, (2000) establecen que la concentración de FDN y nitrógeno en la MS presentan una elevada correlación entre la desaparición *in situ* de la MS y los parámetros de producción de gas *in vitro*. Por lo que, el aumento de la producción de gas *in vitro* en el periodo correspondiente a 48, 72 y 96 horas, posiblemente puede estar relacionado con el aporte de FDN.

Con respecto al volumen de gas de los tratamientos, presentaron una producción de gas diferente ($P < 0.05$) a 48, 72 y 96 h (Tabla 4). Ello posiblemente porque la producción de gas está determinada por el balance de carbohidratos estructurales y azúcares simples de cada dieta (Colombatto, 2004). Así mismo, Posada y Noguera (2005) establecen que existe una correlación lineal entre la producción de gas y la desaparición de la FDN. Sin embargo, cuando se establecen dietas con un alto contenido de CNE, estos son fermentados rápidamente y utilizados por las poblaciones microbiológicas ruminales para su crecimiento y metabolismo, causando un efecto negativo sobre el PH ruminal, lo que evidencia la importancia del equilibrio entre las concentraciones de CNE y FDN en la dieta (Magalhães *et al.*, 2004).

No obstante, la producción de gas no solo involucra a los ácidos grasos volátiles (AGV's), sino que dentro de los procesos de fermentación también se genera metano (CH_4), trazas de hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2), principalmente (Calsamiglia *et al.* 2005). Por lo que, la PG de un sustrato que supera a otro, no es un indicativo de que este es nutricionalmente mejor; igualmente, algunos gases pueden tener un efecto anti-nutricional (Posada y Noguera, 2004). Además, el rumiante utiliza como principal combustible metabólico a los AGV's, acentuando su importancia en las proporciones de cada uno de estos gases (propionato, butirato y acetato), mismos que se relacionan con los sustratos fermentados (Wattiaux y Terry, 2003). De este modo, posiblemente

la inclusión de 12 kg de nopal a las dietas, afecta positivamente la proporción de estos gases. De tal manera que, Ortiz *et al.* (2010), complementaron dietas de bovinos con 12 kilogramos de *O. ficus-indica*, y demostraron un aumento de producción de leche (10.86 vs 7.08 kg d⁻¹; p<0.05), lo que sugiere un aumento en la producción y balance de las proporciones de AGV's. Así mismo, Nefsaoui *et al.* (2003), establece que al adicionar nopal a la alimentación de ovinos, existe un incremento en la producción de ácido propiónico y un decremento de acético ruminal.

Con respecto a la producción de gas acumulada durante las 96 h, se encontró efecto de dieta ($P < 0.05$) y de interacción dieta*tiempo ($P < 0.05$) sobre producción de gas *in vitro*. En relación a la dieta, estas fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), siendo la dieta a base de concentrado + pasto la que presentó una PG acumulada a 96 h superior a la dieta adicionada con nopal: 54.9 vs 53.9 ml/400 mg de MS de producción de gas. Así mismo, en la interacción dieta*tiempo, la DTA2 presentó una producción de gas superior ($P < 0.05$) al tratamiento restantes, a 48, 72 y 96 h con 53.2, 54.7 y 54.9 ml/400 mg respectivamente, en comparación con DTA1 quien presentó en el mismo lapso - 48, 72 y 96 h-, 51.7, 53.5 y 53.9 ml/400 gr de MS. Efecto que posiblemente está relacionado a las proporciones de azúcares simples y FDN, ya que las poblaciones ruminales fermentan rápidamente los primeros y a menor velocidad los segundos.

Di Marco (2011), señala que un forraje altamente fermentable debe contener aproximadamente 70% de digestibilidad *in vitro* de MS, menos de 50% de FDN y más de 15% de proteína bruta (PB). De tal manera que, en lo que respecta a la degradabilidad de MS (DivMS) de las dietas a 96 h, no se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las dietas evaluadas, cuyos valores fueron 90.5 y 86.8% de DivMS, para DTA1 y DTA2, respectivamente. Resultados similares a los reportados por Medina *et al.* (2006); estos investigadores encontraron degradabilidad *in situ* de MS (DisMS) en dietas con harina de nopal deshidratado, valores de 87.2 y 94.5 %. Así mismo, Andrade *et al.* (2002) encontraron que para dietas con porcentajes de inclusión de nopal a la dieta de 12.0, 24.0 y 36.0%; la DisMS fue de 77.6, 79.9 y 73.0%, respectivamente. Valores menores a los resultados en la presente investigación. Es posible que, la cinética de degradación de dietas complementadas con *O. ficus-indica* derivados de estudios realizados *in situ* produzcan valores menores a los obtenidos *in vitro*. Sin embargo, los parámetros de digestión de la MS no pueden compararse directamente con las tasas de PG y DivMS, ya que los estudios *in situ* miden la tasa de digestión para la fracción lentamente degradable, mientras que las tasas de producción de gas y DivMS se derivan de la degradación de todas las fracciones (Lanzas *et al.* 2007).

7.2 Modificación a las técnicas moleculares para determinar la dinámica poblacional microbiana del rumen

La extracción de ADN mediante lisis química con DNAzol, con una proporción 2:1 de detergente y líquido ruminal respectivamente, no mostraron los resultados esperados al no presentar DNA de alto peso molecular cuando se visualizó. Por lo que, al realizar el ajuste al protocolo a la proporción de DNAzol y fluido ruminal (4:1), y probar Etanol absoluto (2 volúmenes) e isopropanol (1 volumen). Así mismo, se comparó el empastillado o no de la muestra, el resultado muestra la presencia de ADN genómico de las poblaciones ruminales (Figura 4).

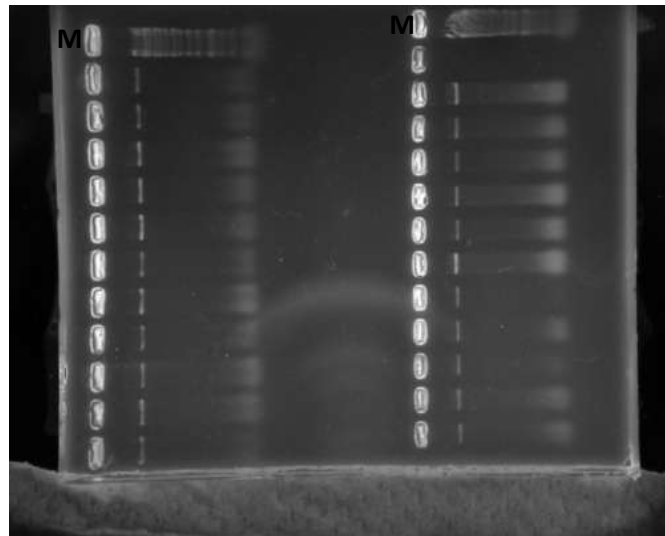


Figura 4. ADN extraído mediante la adaptación de la técnica de lisis química con DNAzol (Visualización del gel de agarosa al 2% mediante luz ultravioleta)

De acuerdo a la modificación de la proporción del DNAzol, parece ser que, para que dicho proceso tenga éxito debe mantenerse la proporción de líquido ruminal y detergente independientemente del tamaño del tubo eppendorf. Puesto que, posiblemente cuando se utilizó una proporción menor de detergente, esto limitó la exposición de las membranas de los microorganismos al detergente y provocó una

menor lisis de las membranas celulares y en consecuencia existió escasa liberación de ADN al medio.

Cuando las muestras de líquido ruminal se someten al previo empastillado, no se observa diferencia con respecto a no empastillar el líquido ruminal, ya que las muestras analizadas por ambos métodos mostraron la visualización del DNA en gel de agarosa al 2%. Este ajuste al método, no presentó inconvenientes y permitió obtener el DNA con las mismas características que el método establecido. Puesto que, en el previo empastillado del líquido ruminal las células se sedimentan en el fondo del tubo y el sobrenadante, que contiene contaminantes, se elimina. Mientras que con el ajuste a la técnica, las membranas celulares se rompen, liberando el DNA en el medio y, al centrifugar, se sedimentan los restos celulares y contaminantes. Por lo que, al evitar el empastillado se reduce el tiempo por una disminución en la manipulación de equipo y reactivos. En síntesis, posiblemente el no empastillar no altera los resultados; puesto que finalmente, los contaminantes quedan sedimentados en el fondo del tubo y eso es lo que se requiere de acuerdo a la técnica.

Con respecto al uso de isopropanol o etanol absoluto, no se observó diferencia al utilizar ambos alcoholes y posiblemente, éste efecto es debido a la masa molar que posee cada uno de estos compuestos; ya que para el etanol absoluto corresponde 46.07 vs 60.1 g/mol del isopropanol y cuando se utilizó dos volúmenes de etanol se aproxima a la cantidad de moles que aporta el

isopropanol. Por ello es probable que no se observó diferencia en la utilización de cualquiera de los dos alcoholes (Luque y Herráez, 2002).

El siguiente paso en la determinación de la dinámica poblacional microbiana del rumen fue la amplificación de regiones específicas del genoma bacteriano mediante PCR para su posterior análisis. Este proceso, requirió la estandarización de la técnica, puesto que al utilizar el protocolo establecido (todos los componentes mezclados en una solución maestra y bajo un primer esquema de ciclos) los resultados mostraron una ausencia total de productos de PCR en todas las muestras (Figura 5).

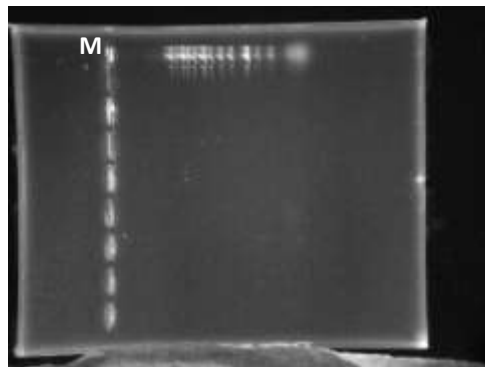


Figura 5. Resultado de la amplificación del DNA sin adaptaciones en la técnica de PCR

De acuerdo con lo anterior, es posible que el mezclado de los reactivos no fuera completamente homogéneo y al depositar la cantidad correspondiente a cada tubo, las concentraciones de la polimerasa no fueran suficientes para llevar a cabo

la reacción. Por otro lado, los ciclos que se utilizaron para la amplificación no dieron los resultados esperados, posiblemente debido a que los tiempos y temperaturas eran insuficientes para lograr la completa desnaturalización del ADN y su posterior amplificación mediante la taq Polimerasa. Lo que implicó, realizar los ajustes mencionados al protocolo de PCR dando resultados satisfactorios: amplificación de los productos en todas las muestras (Figura 6).

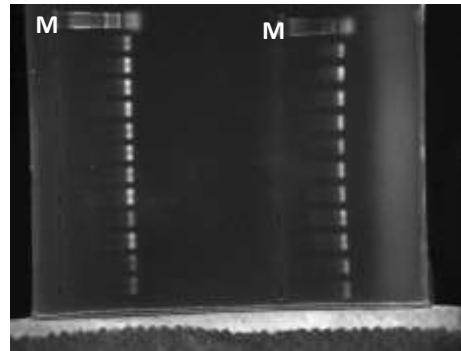


Figura 6. Resultado de la amplificación del DNA mediante ajustes al protocolo de PCR

Con estas adecuaciones al protocolo, se observó amplificación en todas las muestras a través de un gel de agarosa al 2% y luz ultra violeta; apareciendo bandas en cada carril de tamaño aproximado fue de 200 pares de bases. Posiblemente, el efecto positivo de estos cambios al protocolo de la PCR, se debió, en primera instancia, a la mayor homogeneidad de los componentes de la solución. Además, cada uno de los tubos contenía en su composición, la cantidad necesaria de taq Polimerasa para llevar a cabo la reacción. Así mismo, parece ser que con las nuevas condiciones, para la reacción, permitieron la correcta

desnaturalización de la doble cadena de ADN y la posterior amplificación de algunos fragmentos de ésta.

El protocolo de tinción de la PCR-DGGE, mostró un gel de acrilamida con una superficie en su totalidad teñida con plata, lo que dificultó la observación de las secuencias de DNA de las muestras y del marcador molecular (1 Kb ladder plus, Invitrogen) (Figura 7).



Figura 7. Tinción del gel de acrilamida con Nitrato de plata al 2% y revelado con hidróxido de sodio al 3% visto en un transiluminador.

La tinción de la totalidad de la superficie del gel de acrilamida posiblemente estuvo relacionada con la concentración del nitrato de plata, ya que la concentración al ser elevada sobre tiñe la superficie y le da al gel la apariencia oscura. Además, el proceso de revelado con el hidróxido de sodio, oxidó rápidamente el polímero de tal manera que el gel se opacó en tan solo 5 segundos, lo que impidió retirar la

solución de revelado en cuanto se mostró dicho efecto, cuyo resultado fue la aparición de manchas oscuras en la mayoría de la superficie y la nula visualización de las bandas de ADN. Así mismo, la reacción de revelado no se detuvo después de aplicar la solución de hidróxido de sodio y de lavar el gel 2 veces con agua destilada, lo que generó un gel cada vez más oscuro conforme transcurrió el tiempo. Ante estos resultados, se procedió a ajustar las condiciones para la electroforesis, el protocolo de tinción y se formuló una solución de “paro” manteniendo el gradiente desnaturalizante en el gel de acrilamida (40-60%)

Los ajustes al protocolo de tinción permitieron comprobar el efecto de la concentración de las soluciones y como resultado de los dos protocolos, se observó con cada técnica una serie de bandas en todos los carriles donde se depositó las muestras; bandas que representan una población específica de microorganismos ruminales (Figura 8).

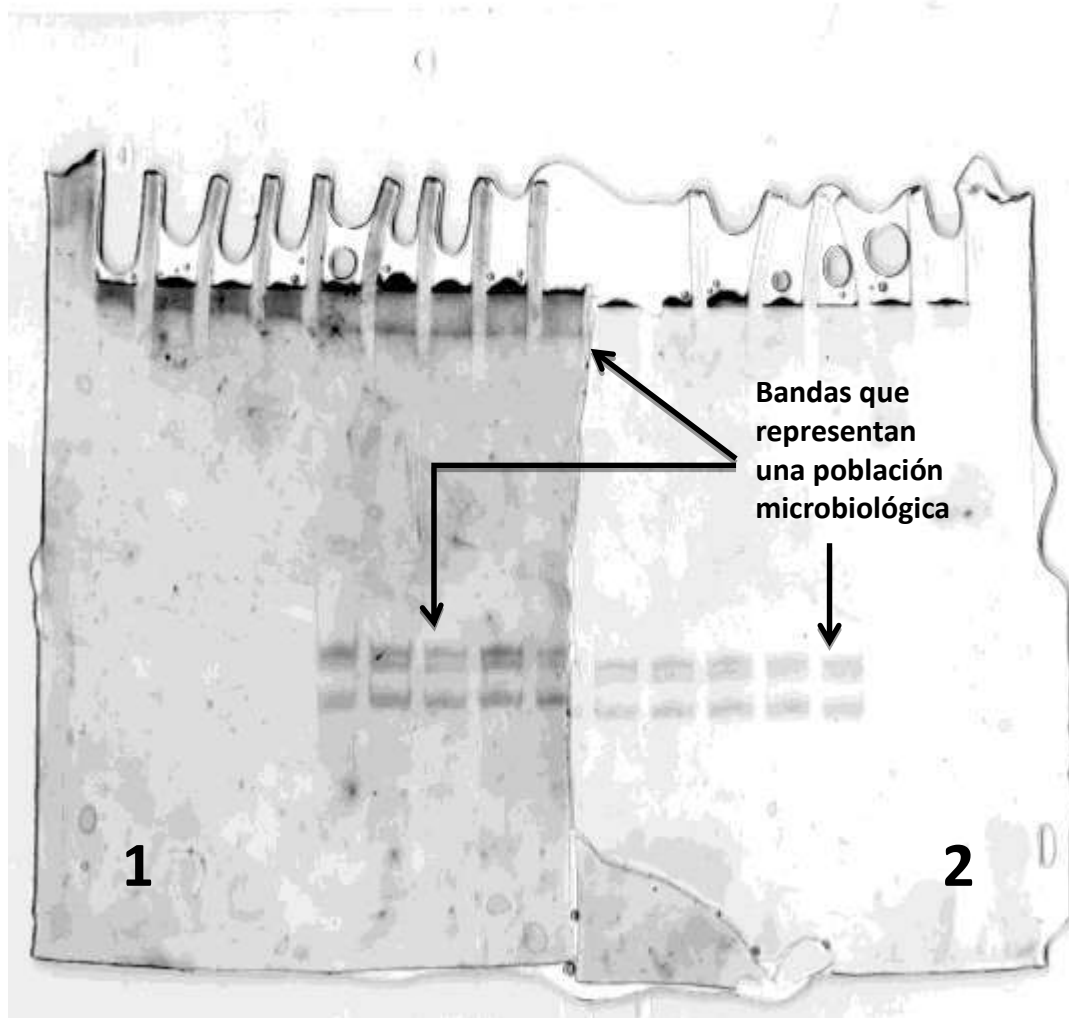


Figura 8. Visualización de los geles de acrilamida en escáner sometido a dos diferentes protocolos de tinción: 1) 0.5% de nitrato de plata y 0.1% de hidróxido de sodio; 2) 0.5% de nitrato de plata y 1% de hidróxido de sodio.

El mejor efecto de visualización de los geles, posiblemente se debió al ajuste de las concentraciones de las soluciones. Así, cuando el nitrato de plata se disminuyó a una concentración de 0.5% y se mantiene en contacto con el gel, es posible que la tinción sea suficiente solo para adherirse a las secuencias de DNAr. Del mismo modo, cuando el hidróxido de sodio (solución de revelado) disminuye a 1 y 0.1% la oxidación de la plata se lleva en un lapso de tiempo más largo, permitiendo determinar el momento para detener la reacción. Finalmente, al agregar la

solución de paro, se inhibe por completo la acción de la de revelado, ya que el PH se acidifica y con ello permite que el gel se conserve en el estado que se requiere.

Ambos protocolos permitieron visualizar adecuadamente una serie de bandas en el gel que representan secuencias propias de diversas bacterias. No obstante, el contraste del fondo con la intensidad de las bandas de cada protocolo, permitió seleccionar el protocolo uno, como la técnica a utilizar para la determinación de la dinámica poblacional microbiológica del rumen de vacas Holstein alimentadas con nopal (*O. ficus-indica*), ya que la identificación de las secuencias y de sus proporciones es de mayor precisión y esto, de acuerdo a la relación fondo-señal del gel.

La presencia reducida bandas fue insuficiente para comprobar un cambio de especies bacterianas por lo que se ajustó el gradiente desnaturizante del gel de acrilamida/bis acrilamida al 10%, estableciendo un gradiente del 40 al 65% de agentes desnaturizantes a una temperatura de 62°C, manteniendo las condiciones de tinción. Con ello, se logró observar un mayor número de bandas (Figura 9).

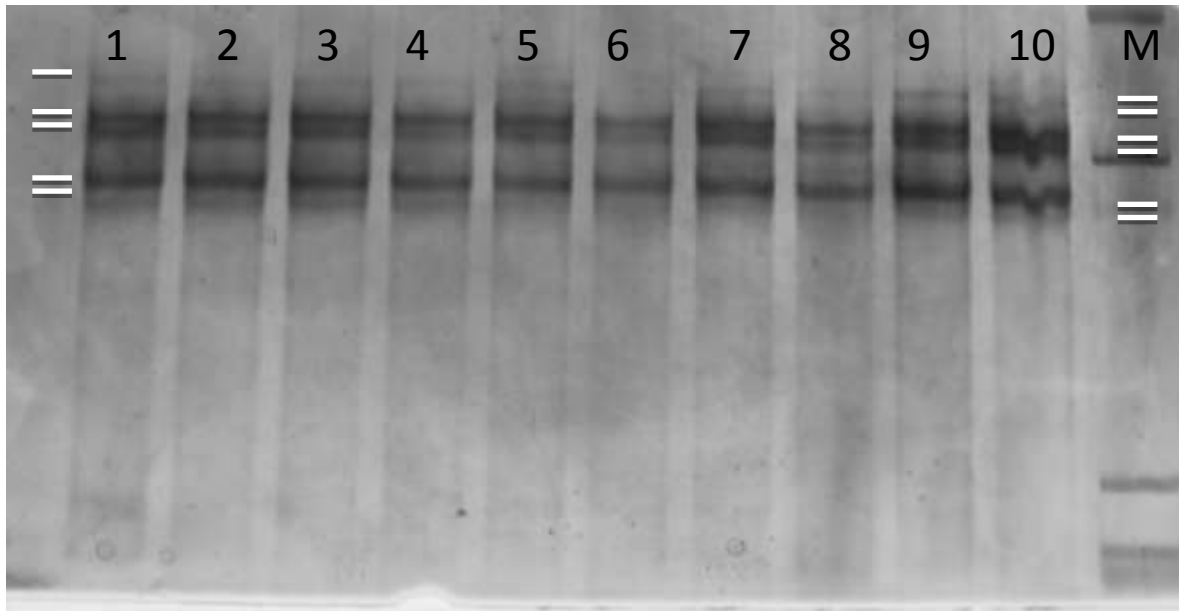


Figura 9. Visualización del gel de acrilamida en al 10%, con un gradiente desnaturalizante del 40 – 65%. Carriles 1 – 9 tratamientos sin nopal (*in vivo*); carril 10 tratamiento con nopal (96 horas *in vitro*).

Los ajustes al gradiente desnaturalizante mostraron un mejor patrón de bandas con respecto al anterior gradiente. Pudiéndose observar entre cinco y seis diferentes bandas bien definidas, las cuales representan poblaciones bacterianas diferentes. No obstante, se consideró el efecto de la temperatura sobre la separación de las bandas, por lo que se estableció un gel bajo las mismas condiciones de corrida pero a una temperatura de 60°C (Figura 10).

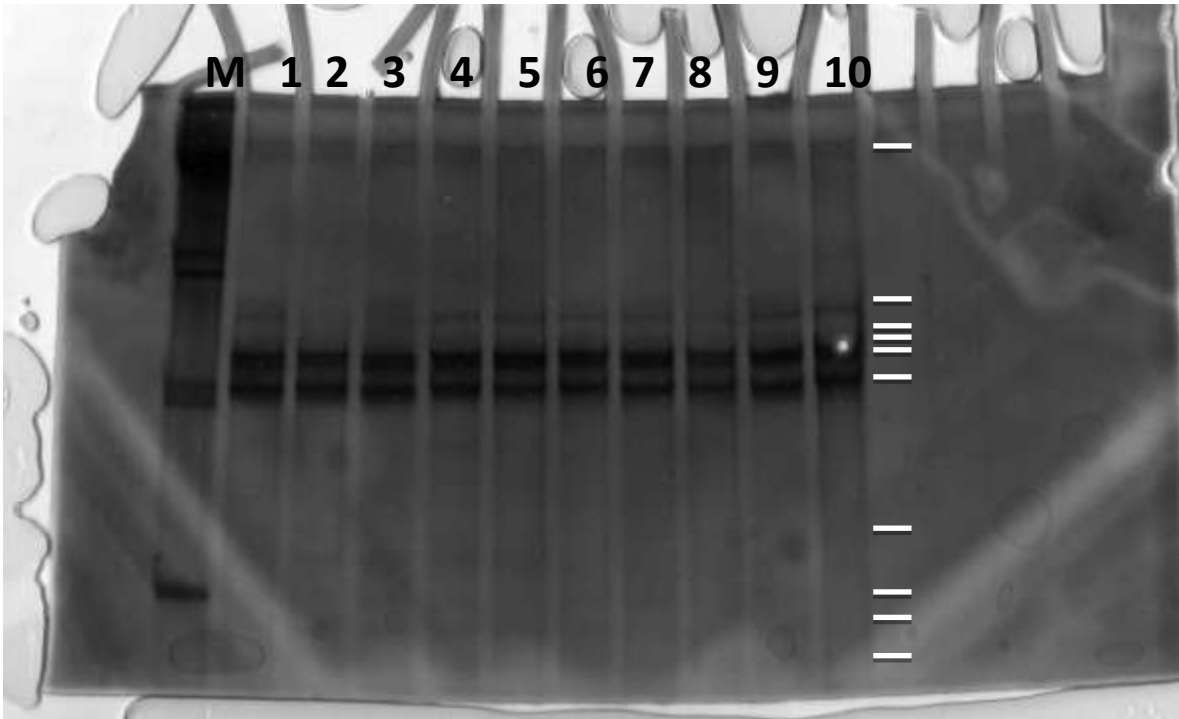


Figura 10. Visualización del gel de acrilamida en al 10%, con un gradiente desnaturizante del 40 – 65% a 62°C. Carriles 1 – 8 tratamientos sin nopal (*in vivo*); carril 9 tratamiento con nopal (48 horas *in vitro*); carril 10 tratamiento con nopal (48 horas *in vitro*).

Con el ajuste a la temperatura, se observaron más de nueve bandas que indicaban cada una población bacteriana diferente. No obstante, especialmente las secuencias se ubicaban en la parte media del gel, lo cual indicó la desnaturización del DNA a un intermedio, y se logró observar una mejor separación con diferente concentración de soluciones. Por ello, se ajustó las soluciones desnaturizantes del 50 al 60% y se corrió a 60°C (Figura 11)

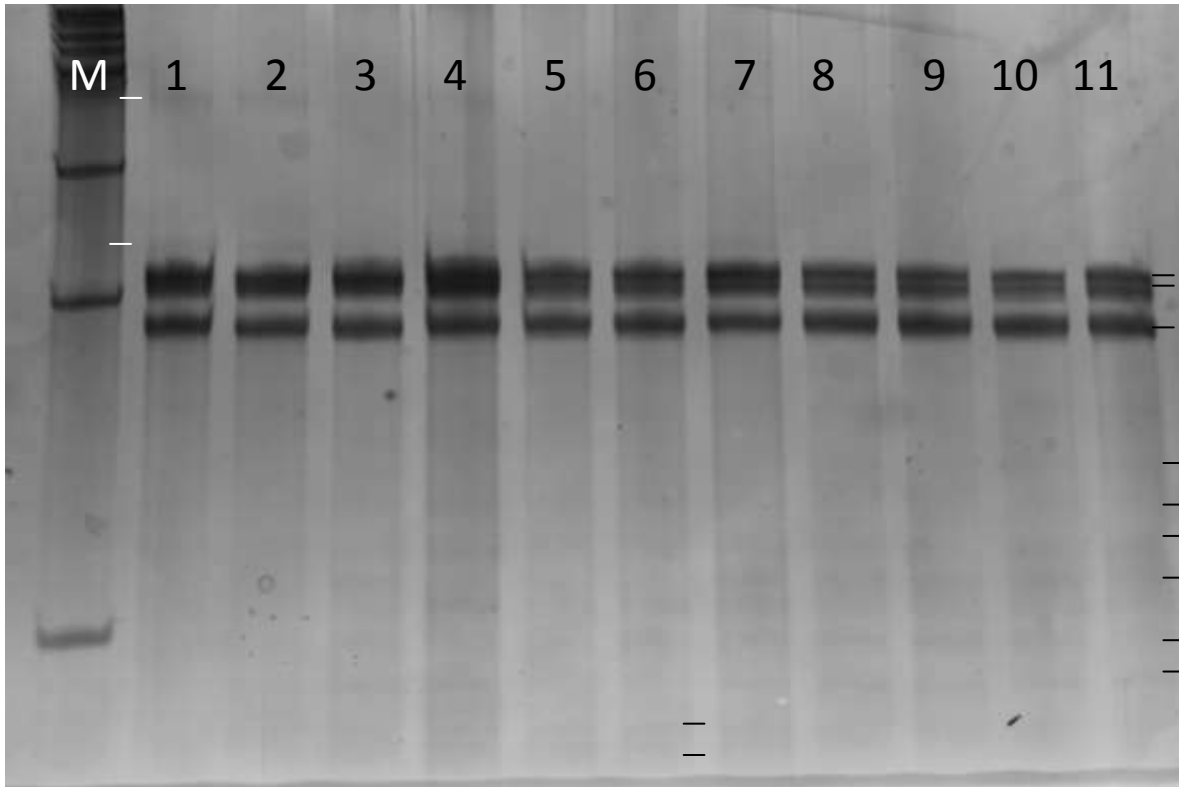


Figura 11. Visualización del gel de acrilamida en al 10%, con un gradiente desnaturalizante del 50 – 60%. Carriles: 1 y 2 tratamientos sin nopal *in vitro*; 3 con nopal (96 horas); 4 – 11 tratamientos sin nopal (*in vivo*).

El cambio de gradiente mostro un mayor número de bandas (>11) en cada carril del gel, además permitió observar algunas diferencias con la presencia o ausencia de bandas cuando se comparan tratamientos *in vivo* vs *in vitro* adicionado con *O. ficus- indica*, lo que a grandes rasgos indica una diferente población. Por ello, el cambio de gradiente podría determinar y cuantificar una población bacteriana en diversos tiempos y con diferentes condiciones.

La presencia de diferentes bandas y de diferente tamaño, cuando se comparan los tratamientos con y sin nopal, *in vitro* e *in vivo*, posiblemente indican una diferente población bacteria. Dicho efecto, es debido a la alta sensibilidad de la

PCR-DGGE, de detectar hasta un cambio de una sola base de una secuencia de ADN (The DCode™ Universal Mutation Detection System, 1996). Dicho efecto es posible, ya que la estructura molecular de la urea y la formamida genera enlaces débiles de puentes de hidrogeno con las bases nitrogenadas adenina – timina (dos puentes de hidrogeno), lo que modifica la estructura de la secuencia pero las bases citocina- guanina se mantienen unidas por un enlace a base de tres puentes de hidrogeno, manteniendo una de estas bases intactas, por lo que una secuencia con un mayor contenido de estas bases formaran diferentes conformomeros y en consecuencia diferente posición en el gel (Green y Neufeld, 2010).

Cuando se hizo el comparativo entre las densidades (Gelalyzer, 2010) de las bandas que aparecen en la misma posición del gel, fue posible apreciar la diferente proporción de ADN en estas, cuando el tratamiento se modifica, lo que significa que las proporciones de un grupo de microorganismos cambió (Figura 12). Sin embargo, es posible que debido a la limitada separación de las secuencias génicas, dichas bandas involucren a más de una población bacteriana ruminal.

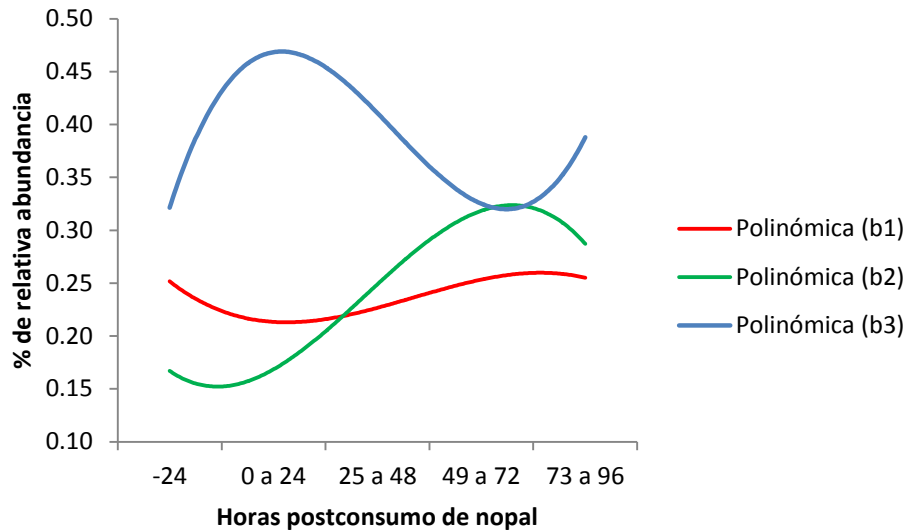


Figura 12. Abundancia relativa de tres poblaciones microbianas del rumen de bovinos Holstein cuando se modifica la dieta convencional por una complementada con *O. ficus-indica*.

El comportamiento de los grupos mayoritarios de bacterias, que se observaron al aplicar la técnica DGGE, es similar al reportado por otros autores (Villegas *et al.*, 2013), quienes determinaron la dinámica de poblaciones de protozoarios ruminales y cuyo patrón de comportamiento fue análogo al observado. Dicho efecto, posiblemente está relacionado a la interacción entre los grupos bacterianos y protozoos, ya que se ha señalado que la proliferación del primer grupo microbiano genera el mismo efecto sobre el segundo.

8. Conclusiones.

1. El tratamiento con 1 kg de MS de pasto y 4.5 kg de MS de concentrado es el que presentó una mayor ($p < 0.05$) producción de gas con respecto a los demás tratamientos. Lo que evidencia la importancia entre el balance de CNE y FDN. Por otro lado, no se encontró diferencia en la DIVMS de todos los tratamientos.
 2. Se establecieron las condiciones para la extracción de ADN de contenido ruminal y su análisis por DGGE
- 2.1 Existe un cambio de población bacteriana cuando se alimenta a los bovinos con nopal, lo que posiblemente está generando un efecto positivo sobre la producción de leche y la calidad de sus productos. Sin embargo, es necesario medir las densidades de las bandas, así como secuenciar dichas bandas, para determinar la población que está cambiando. Por otro lado, la construcción de un árbol filogenético permitirá determinar la variación molecular entre los microorganismos ruminales con tratamientos específicos.

9. Bibliografía

- Adams, J. J., Pal, G., Jia, Z., and Smith, S. P. 2006. Mechanism of bacterial cell-surface attachment revealed by the structure of cellulosomal type II cohesin-dockerin complex. *Proceed Nation Acad Scienc USA*, 103(2): 305-310.
- Almaraz, B. I. 2011. Degradación *in vitro* de la pared celular, variables ruminales y actividad enzimática de microorganismos adheridos a sólidos del complejo *Lolium-Festuca*. Tesis doctoral. [En línea]. http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/383/Almaraz_Buendia_I_DC_Ganaderia_2011.pdf?sequence=1 (consulta 12/12/2014)
- Amann, R. y Kuhl, M. 1998. *In situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr.Opin. Microbiol.* 1:352-358
- Andrade, M. H. M., Córdova, T. A. V., García, G. T., y Kawas, J. R. 2011. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp). *Small Ruminant Research*, 98(1): 83-92.
- Araujo F. O. y Vergara, L. J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. *Sitio Argentino de Producción Animal. Arch. Latinoam. Prod. Anim* 15(1): 133-140
- Asocras. 2000. Digestive Anatomy in Ruminants. [En línea] <http://www.calfnotes.com> (Consulta 2/12/2014).
- Bacab, P. H. M. y Solorio, S. F. J. 2011. Oferta y consumo de forraje y producción de leche en ganado de doble propósito manejado en sistemas silvopastoriles en Tepalcatepec, Michoacán. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3): 271-278.
- Bach, A. 2005. Trastornos ruminales en el vacuno lechero: un enfoque práctico. XVIII Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, España. pp. 119-139.
- Bach, A. y Calsamiglia, S. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿química o física?. XXII Curso de especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA).
- Bach, Á. 2007. Modificaciones de la fermentación ruminal y sus repercusiones a medio y largo plazo sobre la patología de la producción y la calidad de leche. *Producción Animal*, 22(230): 69-87.
- Belanche A., Doreau M., Edwards J. E., Moorby J. M., Pinloche E. and Newbold C. J. 2012. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. *Journ nutrit*, 142(9): 1684-1692.
- Benavides, A. y Adriana, K. 2011. Caracterización microbiológica de lixiviados de materias primas para la fabricación de un compostaje de material ruminal. Tesis Doctoral. [En línea]. <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/10839/74/1/Karen%20Adriana%20Benavides.pdf> (consulta 14/12/2014)
- Bezerra, A.D., Andrade F.M., Chaves V. A., Lima W.W., Evandro S.L., Ramos F.deC., Souza A.K. y Samay, M.W. 2002. Digestibilidade e bsorção Aparentes em Vacas da Raça Holandesa Alimentadas com Palma

- Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em Substituição à Silagem de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). R. Bras. Zootec., 31(5): 2088-2097
- Boon N., Windt W., Verstraete W. y Top E. M. 2002. Evaluation of nested PCR–DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol., 39(2): 101-112.
- Bruni M.deA. y Chilbroste P. 2001. Artículo invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Arch Latinoam Prod Anim, 9: 43-51.
- Calsamiglia S., Castillejos L. y Busquet M. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI Curso de Especialización FEDNA. Madrid. España, Pp. 161-185
- Castelán, O. O. A., Estrada, F. J., Espinoza, O. A., Sánchez, V. E., Ambriz, V. V. and Hernández, O. M. 2008. Strategies for the management of agroecosystem resources in temperates zones of Mexico: the case of campesino milk farmers in the central highlands. Opportunities and challenges for smallholder ruminant systems in Latin America, resource management, food safety, quality and market access. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. pp: 133-160
- Carmona, J., Bolívar, D. y Giraldo, L. 2009. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 18(1): 49-63.
- Carreño, D. F. P. y Leguizamon, M. L. J. 2013. Defaunacion ruminal un mecanismo favorable en la eficiencia nutricional de bovinos. [En línea] <http://66.165.175.249/bitstream/10596/1479/1/40316969.pdf> (consulta 09/01/2015)
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques 15:532–537
- Cid, R. U. 2012. Dinámica poblacional de una biopelícula asociada a la reducción de sulfato a sulfuro y la oxidación parcial del sulfuro a azufre elemental bajo condiciones limitadas de oxígeno disuelto. Tesis de maestría UAM.
- Cocolin, L. S. 2010. Métodos independientes y dependientes de cultivo para estudiar y caracterizar la ecología microbiana en la fermentación vínica. ACE: Revista de enología, 120:1.
- Colombatto, D. 2004. Conservacion de forrajes, lecturas seleccionadas: Uso de la técnica de producción de gas para evaluar forrajes conservados. Catedra de alimentación y nutrición animal, universidad de buenos aires, Pp 29.
- Cordeiro, D. S. D. y Gonzaga, D. A. S. 2003. *Opuntia* como forraje en el Noreste Semiárido de Brasil. El Nopal (*Opuntia spp*) como forrage, 1ª edición, Roma Italia: FAO. Pp 45-63.
- Coria, M. L., Fay, J. P., Cseh, S. B. y Brizuela, M. A. 2007. Efecto de concentraciones elevadas de sales totales y sulfatos en agua de bebida

- sobre la degradabilidad ruminal *in vitro* de *Thinopyrum ponticum*. Archivos de Medicina Veterinaria, 39(3): 261-267.
- Dehority, B. A. and Tirabasso, P. A. 2000. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. Applied and environmental microbiology, 66(7): 2921-2927
- Díaz, R., Galindo, J., Bocourt, R., Laurencio, M. y Pérez, M. 2008. Los microorganismos del rumen y su papel en la fisiología digestiva del rumiante (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral] Cuba: Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Facultad de Agronomía).
- Díaz, R. G. y Wancher, R.C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Artículo de revisión. Revista latinoamericana de microbiología. 45 (1-2): 30-40
- Echavarría, Ch.F.G., Gutiérrez, L.R., Ledesma, R.R., Bañuelos, V.R., Aguilar, S.J. and Serna, P.A. 2006. Influence of small ruminant grazing systems in a semiarid range in the state of Zacatecas México. I Native vegetation. Tec. Pecu. Mex. 44 (2): 203–217.
- Edmunds, B., Südekum, K. H., Spiekens, H. and Schwarz, F. J. 2012. Estimating ruminal crude protein degradation of forages using in situ and in vitro techniques. Anim feed sci and technol, 175(3): 95-105.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journ. Microbiol. Meth., 56(3): 297-314.
- Espinosa, M. M., Sánchez, D. H., Peralta, M. C., Cerrilla, M. E. O., Martínez, G. M. y García, J. L. A. 2006. Comportamiento productivo y fermentación ruminal de corderos suplementados con harina de cocoíte (*Gliricidia sepium*), morera (*Morus alba*) y tulipán (*Hibiscus rosa-sinensis*). Rev Cient FCV-LUZ, 16(3):249-256 .
- Espinosa, V., Rivera, G., y García, L. 2007. Utilidades económicas generadas por la lechería familiar. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, 7(14): 19-41.
- Faria, J. M. 1994. Consideraciones para la selección y manejo de especies tolerantes a la sequía. Rev de la Fac de Agron, 11(2):164-174.
- Flores, O. M. y Reveles, H. M. 2010. Producción de nopal forrajero de diferentes variedades y densidades de plantación. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial No. 5 (ISSN 1870-0160). [En línea] www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/.../17.pdf (consulta 1/12/2014)
- Flores, V. C. A. 2001. El uso del nopal como forraje en el mundo. Memorias del curso-taller El nopal forrajero, una alternativa alimentaria para el ganado. Guadalupe, N.L.
- FUPROCAM. 2009. Conservación de forraje como estrategia de alimentación de bovinos productores de leche en el estado de Campeche. [En línea] www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Campeche/2campeche.pdf (consulta 11/01/2015).
- Galindo, J., García, C., Marrero, Y., Castillo, E., Aldana, A. I., Torres, V. y Sarduy, L. 2007. Efecto de la composición del pastizal de *Leucaena leucocephala* con gramíneas en la población microbiana ruminal de toros. Rev. cubana Cienc. agríc, 41:145.

- Galindo, J., González, N., Delgado, D., Sosa, A., Marrero, Y., González, R., y Moreira, O. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootec trop*, 26(3): 249-252.
- Gallegos, V. C., Scheinvar, L., Olalde, P.G., Sánchez, C. V., Linaje, M. Ángel Gaytán, A., Matías H. H., Mena, M. M. y Rivera, F. B.R. 2011. Estado del conocimiento de las especies del nopal (*Opuntia spp.*) productoras de xocostles silvestres y cultivadas. Instituto de Biología, UNAM.
- García, G. R. A., Román, B. R., Val, A. D., Pérez, S. R. E. y Ortiz, R. R. 2013. Caracterización y modelación de la curva de lactancia de vacas Holstein complementadas con nopal (*Opuntia ficus-indica*) durante la época seca. *Revista Científica*, 23 (005).
- Gasque, R. 2008. Enciclopedia bovina. UNAM-FMVZ. Primera edición. ISBN 978-970-32-4359-4.
- Giraldo, L. A., Gutiérrez L. A., y Rúa, C. 2007. Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Rev Colomb de Cienc Pec*, 20(3): 269-279.
- Givens, D. I., Owen, E., Omed, H. M. and Axford, R. F. E. 2000. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI, Pp. 492.
- González, C.F. G., Llamas I. y Bonilla, J. A. 1998. Utilización del nopal como sustituto parcial de alfalfa en dietas para vacas lecheras. *Tec. Pecuaria en México*.
- González, N., Galindo, J., González, R., Sosa, A., Moreira, O., Delgado, D. y Sanabria, C. 2006. Utilización de la técnica de PCR en tiempo real y de la producción de gas in vitro para determinar el efecto del ácido bromoetano sulfónico en la metanogénesis y la población microbiana ruminal. *Rev Cub de Cienc Agríc*, 40(2): 183-189.
- Green S. J., Leigh M. B. and Neufeld J. D. 2010. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Pp. 4137-4158
- Guevara, G. L. A., Gómez, B J. C. y Ávila, L. L. E. 2012. Frecuencia de suplementación y pH ruminal en bovinos. *Universidad de Caldas, Veterinaria y zootecnia.* ; 6(2): 125-133.
- Gutiérrez, E., Elías, A., Bernal H. y Morales H. 2008. Usos alternativos del nopal forrajero. *Revista de salud pública veterinaria. VI simposium taller, producción y aprovechamiento del nopal en el noroeste de México*, 14.
- Gutiérrez, L. R., Rodríguez, T. D., Martínez, T. G., Aguirre, C. C. E., y Sánchez, G. R. A. 2012. Bancos de proteína para rumiantes en el Semiárido Mexicano. Folleto Técnico Número 47. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC–INIFAP, Pp 32.
- Juárez, J. A. R., Martínez, G. D. M., Bojalil, C. G. y Gama, R. B. 2012. Caracterización del nitrógeno del pasto estrella con dos sistemas: proteína metabolizable y proteína cruda digestible. *Rev Fac Agronom*, 12(2): 209-220.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89(1), 124-135.

- Kiesling, R. 1998. Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. Journ Profess Assoc Cacts Develop, 3: 50-59.
- Krause D.O., Bunch R.J., Conlan L.L, Kennedy P.M., Smith W.J., Mackie R.I. and McSweeney, C.S. 2001. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus spp.* does not result in persistence, but changes in other microbial populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. Microbiol.147:1719–1729
- Krause D. O., Denman S. E., Mackie R. I., Morrison M., Rae A. L., Attwood G. T., and McSweeney, C. S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS microbiology reviews, 27(5): 663-693.
- Lactodata. 2014. Información sobre el sector lechero. Comité nacional del sistema bovinos leche. [En línea] www.lechemexico.org.mx (consulta 12/12/2014)
- Lach, Z. y Podkówka, W. 2000. La productividad y la composición química de la leche de vacas alimentadas con sistema de PMR. Documentos Científicos.Panorámica de cría , 51
- Lee D. H., Zo Y.G. and Kim S. J. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by pcr–single-strand-conformation polymorphism. Applied and environmental microbiology. 62(9): 3112–3120
- Le Houérou, H.N. 1994. Drought tolerant and water-efficient fodder shrubs (DTFS), their role as a “drought insurance” in the agricultural development of arid and semi-arid zones in southern Africa. Report to the Water Research Commission of South Africa. Pretoria, South Africa. Pp 139.
- Liberal, V. R. M., Andrade, F. M. D., Araujo, C. C. D., Chaves, V. A. S., Ramos, C. F. F., Arruda, S. G. R., Souza, A.K., y S Maior,, J. R. J.S. 2005. Substituição do milho por farelo de palma forrageira em dietas de ovinos em crescimento. Desempenho. Rev bras de Zoot, 34(1): 249-256.
- López, G. J. 2010. Uso Y Manejo Del Nopal Forrajero En El Noreste De México. IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey” Campus de Ciencias Agropecuarias, UANL. Escobedo, Nuevo León, México
- López, J.J., Fuentes, J.M. y Rodríguez A. 2003. Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México. Estudio de la FAO.
- López. H. P. 2015. Suplementación con ensilado de nopal (*Opuntia spp*) en caprinos. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma agraria. Pp 59.
- Luhmann, N. 1998. Sociología del riesgo. Editorial Triana. Primera edición.
- Luna, R. G., Tenorio, D. R., Trejo, G. M., Calderón, C. A. y Gutiérrez, R. A. S. 2012. Bancos de proteína para rumiantes en el semiárido mexicano. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC–INIFAP, 47: 32.
- Luque, C.J. y Herráez, S.A. 2002. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier science. Pp.473
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. and Morgan, C.A. 1995. Animal Nutrition, 5th edn. Long Scient and Techn, Harl, Essex, UK.

- Macedo, R., Galina, M. A., y Zorrilla, J. M. 2008. Balance forrajero, energético y proteico de un sistema de producción tradicional de doble propósito en México Forage, energy and protein balance in a traditional dual purpose livestock production system in Mexico. *Zootec Trop*, 26(4): 455-463.
- Maya, G., Durán, C. y Enrique, J. 2005. Valor nutritivo del pasto estrella solo y en asociación con leucaena a diferentes edades de corte durante el año. *Acta Agronómica*, 54(2):38-40
- Marrero, Y., Martín, E., Rodríguez, D. y Galindo, J. 2010. Efecto de la inclusión de fracciones del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal in vitro de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). *Rev cub de cienc agríc*, 44(2): 161-167.
- Martín, E., Pérez, E., Cañón, S., Rodríguez, J. y Rodríguez, F. 2005. Ruminant anaerobic microorganism recovery using an experimental oro-ruminal probe. *CORPOICA*, 6(1)
- Medina, M.R., Tirado G.E., Mejía H. I., Camarillo S.I. y Cruz, V.C. 2006. Digestibilidad *in situ* de dietas con harina de nopal deshidratado conteniendo un preparado de enzimas fibrolíticas exógenas. *Pesq. Agropec. Bras, Brasíla*. 41(7): 1173-1177.
- Mendoza, M. G. D., Plata, P. F. X., Espinosa, C. R. y Lara, B. A. 2008. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. *Universidad y Ciencia*, 24(1): 75-87.
- Montalbetti, A. 2009. Microbiología del rumen. El Cid Editor. [En Línea] <http://www.ilustrados.com/tema/3999/Microbiologia-Rumen.html> (consulta 10/01/2015)
- Moreno G. A. 2013. Efecto del nopal (*Opuntia-ficus-indica*) en la dieta de ganado lechero sobre la producción y calidad de leche cruda en la región ciénega de chapala (Doctoral dissertation).
- Moreno, M.V.R., Sifuentes, R. A.M., Pereyra A. B. 2009. Herramientas para el análisis de la variación genético-molecular. *Ciencia UANL*. 12(2):201-205
- Nefzaoui, A. y Ben Salem, H. 2003 forraje estratégico y herramienta eficiente para combatir la desertificación en la región wana. Estudio de la FAO. [En línea] <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s0c.htm#TopOfPage> [consulta 21/12/2014]
- NRC, National Research Council. 2000. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington DC, USA, Pp 131-132.
- Nystrom T. 2003. Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *BioEssays* 25:204-211
- Ortega, P.R., Murillo, A.B., Espinoza, V.J.L., Palacios, E.A., Carreón, P.L., Palacios, M.E. and Plascencia, J.A. 2010. Chemical composition and proportion of precursors of rumenic and vaccenic acids in alternative forages for the feeding of ruminants in arid ecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 33 – 45. Universidad Autónoma de Yucatán. México.
- Ortiz, R.R., Pérez, S. R.E., García, S. P.A., Gómez, R. B. y Valdez A. J.J 2010. Producción y calidad microbiológica de la leche cruda y del queso fresco

- provenientes de vacas Holstein bajo una dieta complementada con nopal (*Opuntia ficus-indica*). [En línea]. <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/nutricion/articulos/produccion-leche-provenientes-vacas-t3072/141-p0.htm> (consulta 15/12/2014)
- Ortiz, R. R., Valdez, A. J. J., Gomez, R. B., López, M. J., Chávez, M. M. P., Garcia, S. P. A y Perez, S. R. E. 2012. Yield and microbiological quality of raw milk and fresh cheese obtained from holstein cows receiving a diet supplemented with nopal (*Opuntia ficus-indica*). African Journal of Microbiology Research 6: 3409-3414.
- Páez, F. G., y Medina, I. R. C. 2008. Fechas de inicios y terminación de la temporada de lluvias en la región Pacífico Norte. *Tec y Cien del Agua*, 23(3): 179-188.
- Palacios M. D.J. y Chassin N. O. 2010. Simulación de la capacidad de DGGE y PCR-RFLP para detectar variación genética en secuencias de ADN. Revista de la DES Ciencias Biológico agropecuarias-UMICH, 12(1): 33-39.
- Pérez, S.R.E.; García, S.P.A.; Ángel, P.M.E.; Valdez, J.J.; Ramos, B.; Ortiz, R.R.; Ramirez, G.M. 2010. Producción de la leche provenientes de vacas Holstein bajo una dieta complementada con nopal (*Opuntia ficus-indica*). [En línea] <<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/nutricion/articulos/produccion-leche-provenientes-vacas-t3072/141-p0.htm>> (12 de Marzo del 2011).
- Peters S., Koschinsky S., Schwieger F. and Tebbe C. C. 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand- Conformation Polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3):930-936
- Pordomingo, A. J. 2003. Suplementación con granos a bovinos en pastoreo. EEA INTA Anguil-La Pampa. Argentina. [En línea] http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/67-suplementacion_con_granos_en_pastoreo.pdf (consulta 03/03/2015).
- Posada, S. L. y Noguera, R. R. 2005. Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livest Resear for Rural Develop*, 17(4).
- Ramírez T., H. M.; J. A. Reyes A., J.M. Pinos R. y J. R. Aguirre R. 2007. Efecto de la especie y madurez sobre el contenido de nutrientes en cladodios de nopal. *Agrociencia*. 41(6):619-626.
- Rayas, A. A. A., Estrada, F. J. G., Mould, F. L., y Castelán, O. O. A. 2012. Nutritional value of forage species from the Central Highlands Region of Mexico at different stages of maturity. *Ciência Rural*, 42(4), 705-712.
- Relling A. y Mattioli G. 2003. Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P.
- Reveles, H.M., Flores, O. M., Blanco, M. F. y Valdez, C. R. 2010. El Manejo Del Nopal Forrajero En La Producción Del Ganado Bovino. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal". RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 5. ISSN 1870-0160

- Ribeiro, E. M. D. O., Silva, N. H. D., Lima Filho, J. L. D., Brito, J. Z. D., y Silva, M. D. P. C. D. 2010. Study of carbohydrates present in the cladodes of *Opuntia ficus-indica* (fodder palm), according to age and season. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(4): 933-939.
- Rotger, D. 2005. Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España. 196 p.
- Ruiz, E. F. H., Alvarado, M. J. F., Murillo, A. B., García, H J. L., Pargas, L. R., Duarte, O. D. O. y Fenech, L. L. 2008. Rendimiento y Crecimiento de Nopalitos de Cultivares de Nopal (*Opuntia ficus-indica*) bajo Diferentes Densidades de Plantación. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 10: 22-35.
- Russell, J. B. y Rychlik, J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292(5519): 1119-1122.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B. and Morgavi, D. P. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *The Animal Consortium* 1:7, pp 939–944
- Salcedo, Y. T. G., Junior, C. S. R., Gomez, D. J. T., Calderón, L. G. R., Machado, M. y Ardila, A. M. 2012. Acidosis ruminal en bovinos lecheros: implicaciones sobre la producción y la salud animal. *REDVET*, 13(4): 1-10.
- Sallam, S., Bueno I. C. D. S., Godoy P. B., Nozella E. F., Vitti D. M. and Abdalla A. L. 2009. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(1): 1-10.
- Santana, O.P., Estirna, A.L. y Farias, I. 1972. Palma versus silagem na alimentação de vacas leiteiras. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, 1(1): 31-40
- Santos, H. A., Vázquez, A. R. E., Ornelas, E. G. y Treviño, H. M. 2010. Evaluación de la productividad y caracterización de tres variedades de nopal mejorado y tres criollos. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal”. RESPYN edición especial no. 5-201 (ISSN 1870-0160).
- Servicio Meteorológico Nacional. 2000. SEMARNAT. CONAGUA. [En línea] <http://smn.conagua.gob.mx/> (consulta 10/12/2014)
- Servicio Meteorológico Nacional. 2014. SEMARNAT. CONAGUA. [En línea] http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=77 (consulta 10/01/2015).
- Shingfield, K.J., Kairenius P., Arola A., Paillard D., Muetzel S., Ahvenjärvi S. and Wallace R.J. 2012. Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the Ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* 142 (8): 1437-1448.
- Solorio, S. F. J. y Solorio, S. B. 2002. Integrating fodder trees into animal production systems in the tropics. *Trop and Subtrop Agroeco*, 1(1): 1-11.
- Spivak, E. 2006. Árbol de la vida. *Ciencia Hoy*, 16(91): 10-24.

- Stewart, C. S., Duncan, S. H., Richardson, A. J., Backwell, C., y Begbie, R. 1992. The inhibition of fungal cellulolysis by cell-free preparations from ruminococci. *FEMS microbiol lett*, 97(1-2): 83-87.
- Sumano, H. y Ocampo, L. 2006. *Farmacología Veterinaria*. Tercera edición McGraw-hill Interamericana Editores.
- The DCode™ Universal Mutation Detection System. 1996. Bio-Rad Laboratories
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. and Francia, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. *Animal Feed and Technology*, 48 (3): 185-197
- Toledo, V. M. 2002. Agroecología, sustentabilidad y reforma agraria: la superioridad de la pequeña producción familiar. *Agroecología e Desarrollo Rural Sustentável*, 3(2).
- Torres, S. A. 2010. Composición química del nopal y sus implicaciones en la nutrición de rumiantes (experiencias de Brasil). *Revi Sald Públ y Nutr. Edición Especial*, 5: 143-151
- Turenne C. Y., Witwicki E., Hoban D. J., Karlowsky J. A. and Kabani A. M. 2000. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR–single50 strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 38:513-520
- Urrutia, M. J., Gámez, V. H. G., Beltrán, L. S., y Díaz, G. M. O. 2014. Utilización de *Atriplex canescens* y *Opuntia ficus indica* en la alimentación de cabras lactantes durante la sequía. *Agron. Mesoam.* 25(2):287-296
- Van der Lier, E., y Regueiro, M. 2008. Digestión en retículo - rumen. Departamento de producción animal y pasturas curso de anatomía y fisiología animal., editorial. Montevideo: Facultad de agronomía, Universidad de la Republica.
- Vásquez, A., R.E., R.D. Valdez C., E. Gutiérrez O. y F. Blanco M. 2007. Caracterización e identificación del nopal forrajero en el norte de México. Memorias del VI simposium taller producción y aprovechamiento del nopal en el noroeste de México. 7 y 8 de Diciembre del 2007. Marin, N.L. México.
- Velasco, Z. M. E., Hernández, G. A., Gonzales, H. V. A., Pérez, P. J., y Vaquera, H. H. 2002. Curvas estacionales de crecimiento del ballico perenne. *Rev Fitotec Mex*, 25(1): 97-106.
- Velez, T. O. M., Campos, G., R., and Sánchez, G. H. 2014. Use of plant secondary metabolites to reduce ruminal methanogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3).
- Verdecia, D. M. 2008. Rendimiento y componentes del valor nutritivo del *Panicum maximum* cv. Tanzania. *Rev electr de Vet*, 1695: 7504.
- Vidal, R. 2011. Efecto de la suplementación energética con maíz grano húmedo o trigo partido sobre la producción y composición de leche de vacas lecheras en pastoreo primaveral alimentadas con alta y baja oferta de pradera. Memoria de Titulación.

- Vilaboa, A.J. y Díaz, R.P. 2009. Caracterización socioeconómica y tecnológica de los sistemas ganaderos en siete municipios del estado de Veracruz, México. *Zootecnia Trop.*, 27(4): 427-436
- Villegas, C. M., Meneses, M. M., Miranda, R. L. A. y Loera, C. O. 2010. Producción de gas in vitro y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrocienc.*, 44(8): 917-929.
- Villegas, R.G. 2007. Extracción con DNAzol® como una alternativa para la obtención de ADN de fluido ruminal para análisis PCR-SSCP. Tesis de licenciatura, facultad de químico farmacología-UMSNH.
- Villegas R. G., Vargas C. Y., González S. N., Aguilera G. F., Gutiérrez V. E., Bravo P. A. y Valdez A. J.J. 2013. Evaluación de los métodos de extracción de ADN de las poblaciones microbianas del rumen. *World Journal of Microbiology y Biotecnología.* 29 (2): 301-307
- Wanderley, W. L. 2001. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na ração de vacas holandesas em lactação. Recife: UFRPE. Tese Mestrado. 41 p.
- Wattiaux, M. A. H. y Terry, W. 2003. Digestión de la vaca lechera. Instituto Babcock para el Desarrollo y la Investigación Internacional de la Lechería. The University of Winsconsin, Madison.
- Whitford M.F., Ronald MT. and Forster J.R. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen, *BMC Microbiology*: 1-5
- Yokohama, M. T., y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino, en: El rumiante, fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España. Pp.137-158
- Zapata R. S. , Gutiérrez B. L. y Polanco E.D. 2011. Role of rumen ciliated protozoa in the synthesis of conjugated linoleic acid. A Review. Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia
- Zabala, M. D. A. 2012. Evaluación de Plantas Proteicas y su Efecto en la Población Microbiana de Mitanógenos yMetanogénesis Ruminal in Vitro. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Pp 99.

