



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  
COBRE EN UN CULTIVO *IN VITRO* CON BACTERIAS RUMINALES DE  
OVINO, CAPRINO Y BOVINO**

**JULIO CÉSAR AYALA FIGUEROA**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2014

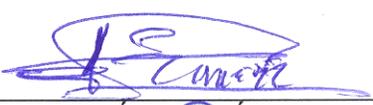
---

---

La presente tesis titulada: **Producción de biogás a diferentes concentraciones de cobre en un cultivo *in vitro* con bacterias ruminales de ovino, caprino y bovino**, realizada por el alumno: **Julio César Ayala Figueroa**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, fue aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ
ASESOR	 DR. EFREN RAMÍREZ BRIBIESCA
ASESOR	 DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO
ASESOR	 DR. ALEJANDRO LEY DE COSS
ASESOR	 DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2014.

# **PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE EN UN CULTIVO *IN VITRO* CON BACTERIAS RUMINALES DE OVINO, CAPRINO Y BOVINO**

Julio César Ayala Figueroa, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

## **RESUMEN**

El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cobre en el pH, nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), ácidos grasos volátiles (AGV), digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIMS), contenido de purinas y biogás total en medios de cultivo *in vitro* usando inóculos ruminales de ovinos, caprinos y bovinos. Los animales donantes de los inóculos fueron canulados en rumen y alimentados a libre acceso con alfalfa achicalada. Se elaboraron medios de cultivo, usando como sustrato 0.5 g de alfalfa molida a un tamaño de partícula de 1 mm, a los cuales se adicionó su respectivo tratamiento de cobre (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 ppm), en tres series con base al inóculo ruminal (ovino, caprino o bovino), y nueve repeticiones por tratamiento. La producción de biogás total se analizó a las 12, 24, 48 y 72 h, mediante un modelo no lineal con el Software SigmaPlot y el resto de las variables se analizaron mediante un diseño completamente al azar y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. La adición de niveles de 10 ppm de Cu, incrementaron ( $p < 0.05$ ) la producción de biogás total al usar inóculos ruminales de ovinos y caprinos, relacionándose con mayor actividad bacteriana y mayor ( $p < 0.05$ ) degradación de la materia seca. Pero al incrementar la concentración de cobre por arriba de 20 ppm disminuyó ( $p < 0.05$ ) la producción de biogás total en sistemas *in vitro*, independientemente de la fuente de inóculo ruminal, y de manera específica, el líquido ruminal de bovinos presenta la menor actividad microbiana reflejándose en una producción de biogás más baja ( $p < 0.05$ ). El pH de los medios de cultivo no cambia ( $p > 0.05$ ) al adicionar niveles de 0 a 20 ppm de cobre o al inocular con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos. Sin embargo la concentración de nitrógeno amoniacal es alta ( $p < 0.05$ ) cuando se adiciona a los medios de cultivo 5 ppm de cobre y entre los inóculos evaluados, el de caprinos mostró la mayor ( $p < 0.05$ ) producción de este metabolito. Asimismo, la mayor ( $p < 0.05$ ) producción de ácidos grasos volátiles se registró al adicionar entre 5 y 10 ppm de cobre cuando se usaron inóculos de ovinos o bovinos, pero cuando el inóculo fue de caprino no existió diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los niveles de cobre evaluados (0 a 20 ppm). Niveles crecientes de cobre en los medios de cultivo se relacionaron con una disminución ( $p < 0.05$ ) de acético e incremento de propiónico y butírico. La fuente de inóculo no fue consistente en los cambios observados en la fermentación en el sistema *in vitro* evaluado con diferentes niveles de Cu. Niveles entre 5 y 10 ppm de cobre son sugeridos para producir mejoras metabólicas en la fermentación ruminal.

**Palabras clave:** Biogás, cobre, inóculos, ovino, caprino, bovino.

# **BIOGAS PRODUCTION AT DIFFERENT COPPER CONCENTRATIONS ON *IN VITRO* CULTURE WITH SHEEP, GOATS AND CATTLE RUMINAL BACTERIA**

Julio César Ayala Figueroa, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2014

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the effect of different copper concentrations on pH, ammonia (N-NH<sub>3</sub>), volatile fatty acids (VFA), *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), purines, total biogas on *in vitro* culture, using rumen liquid from sheep, goats and cattle. Animal donors of the inoculants were cannulated in the rumen and fed *ad libitum* with hay alfalfa. Culture media was prepared using 0.5 g of hay alfalfa as substrate, ground to a particle size of 1 mm, with its respective treatment of copper (0, 5, 10, 20, 40, 60 and 80 ppm) was added, into three series based on the ruminal inoculum (sheep, goats or cattle), and nine replicates per treatment. The biogas production was analyzed at 12, 24, 48 and 72 h, using a nonlinear model with the SigmaPlot Software and the other variables were analyzed using a completely randomized design and the treatment means were compared with Tukey test. Addition of 10 ppm of Cu, increased ( $p < 0.05$ ) total biogas production using rumen inoculum from sheep and goats, and this was related to increased bacterial activity and increased ( $p < 0.05$ ) dry matter degradation. Also when copper concentration increasing above 20 ppm biogas production *in vitro* decreased ( $p < 0.05$ ) regardless of the source of ruminal inoculum, and, specifically bovine rumen fluid has the lowest activity microbial reflected in a lower biogas production ( $p < 0.05$ ). Culture media pH no changes ( $p > 0.05$ ) by adding copper levels of 0 to 20 ppm or inoculated with rumen fluid of sheep, goats or cattle. However, nitrogen concentration is high ( $p < 0.05$ ) when added to the culture media 5 ppm of copper, and goats inoculum showed higher ( $p < 0.05$ ) production of this metabolite. Also, the higher ( $p < 0.05$ ) production of volatile fatty acids was recorded by adding 5 to 10 ppm of copper when inoculum from sheep and cattle were used, but when the goats inoculum was used there was no difference ( $p > 0.05$ ) between 0 to 20 ppm of copper treatments. Increasing levels of copper in the culture media were associated with a decrease ( $p < 0.05$ ) of acetic and increased of propionic and butyric. The source of inoculum was not consistent in the changes observed on *in vitro* fermentation evaluated with different copper levels. Levels between 5 and 10 ppm of copper are suggested to produce metabolic improvements in rumen fermentation.

**Key words:** Biogas, copper, inoculants, sheep, goats, cattle.

## **DEDICATORIA**

A ti padre Julio Ayala Beltrán, siempre he admirado tu honradez, la entereza, el amor que siempre me has brindado, se me vuelve idolatría el cariño que le tengo, no necesito decírselo usted sabes lo mucho que lo quiero, me siento muy ufano el llevar su sangre.

A ella, amor del bueno desde el primer momento que la vi, a ti mamá Guillermina Figueroa Martínez, que bendición tenerte en mi vida, usted que le dio vida a mi corazón.

A ti hermano Cándido Ayala Figueroa, por todo el apoyo directo e indirecto brindado.

A ustedes mis queridos abuelos Reynaldo y María fascinado por su profunda fe e inmensa ternura.

A usted abuelito Toño, a usted abuelita Hermelinda, escápanse un momento del cielo y vengan a regalarme un abrazo.

Yo ya tenía un espacio en mi tesis, para estampar sus nombres y presumir...

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme una beca para realizar mis estudios de posgrado a nivel de maestría en una institución académica de excelencia como lo es el Colegio de Postgraduados, al mismo que agradezco el privilegio de formar parte como estudiante.

El autor expresa sincero agradecimiento a la LPI 11, Sistemas de Producción Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola y Pesquera del Colegio de Postgraduados, por el apoyo para realizar esta investigación.

Dr. David Hernández Sánchez, Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, Dr. Omar Hernández Mendo les agradezco por brindarme las herramientas para solucionar problemas de la producción pecuaria, al optimizar los aspectos productivos, ambientales y del entorno socioeconómico, utilizando el conocimiento científico. Por hacerme ver que la ganadería y la agronomía no son una simple profesión, ahora sé que es mi vocación y me entrego a ella con entusiasmo y placer para servir a México.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTOS .....	VI
CONTENIDO .....	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Ambiente ruminal.....	3
2.2 Microbiología del rumen .....	4
2.3 Características generales de los microorganismos ruminales .....	4
2.3.1 Bacterias ruminales .....	4
2.3.2 Bacterias ruminales metanogénicas .....	5
2.3.3 Protozoarios ruminales.....	6
2.3.4 Hongos ruminales .....	6
2.4 Metabolismo ruminal en la producción de metano .....	7
2.5 Minerales y la respuesta microbiana ruminal .....	9

2.5.1	Macrominerales.....	9
2.5.2	Microminerales .....	10
2.6	Suplementación de cobre a los rumiantes .....	12
2.7	Emisiones de gases de efecto invernadero .....	13
2.8	Producción de biogás por la fermentación ruminal y su impacto en el ambiente .....	15
2.9	Microbiología ruminal y su efecto en la metanogénesis .....	16
2.10	Manipulación de la fermentación ruminal para disminuir la producción de biogás .....	18
2.11	Estrategias en el sector pecuario para contrarrestar el cambio climático .....	19
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo general .....	21
3.1.1	Objetivos específicos .....	21
4.	HIPÓTESIS.....	22
5.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
5.1	Animales.....	23
5.2	Fermentación <i>in vitro</i> .....	24
5.2.1	Obtención del líquido del rumen.....	24
5.3	Búfer, tratamientos y fermentación <i>in vitro</i> .....	24
5.4	Pruebas del laboratorio.....	26
5.4.1	Producción de biogás .....	26
5.4.2	pH26	
5.4.3	Nitrógeno amoniacal .....	26
5.4.4	Ácidos grasos volátiles.....	27

5.4.5	Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca .....	27
5.4.6	Purinas.....	28
5.5	Modelo no lineal para calcular la producción de biogás total .....	29
5.6	Diseño experimental.....	29
6.	RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	31
6.1	Producción de biogás total en un sistema <i>in vitro</i> (mL g <sup>-1</sup> MS) en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre .....	31
6.2	Valores de pH, nitrógeno amoniacal y purinas de medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre.....	34
6.3	Concentración de ácidos grasos volátiles en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre.....	39
6.4	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca en de un medios de cultivo inoculado con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre.....	44
7.	CONCLUSIONES .....	48
8.	LITERATURA CITADA.....	49

## ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del rumen .....	3
Cuadro 2. Requerimientos de microelementos para los microorganismos ruminales y animal hospedante .....	11
Cuadro 3. Gases de efecto invernadero en México (gigagramos de equivalentes de CO <sub>2</sub> ) .....	14
Cuadro 4. Publicaciones relacionadas con la producción de metano entérico en rumiantes de algunos países .....	15
Cuadro 5. Componentes del medio de cultivo empleado en el experimento <i>in vitro</i> .....	25
Cuadro 6. Producción de biogás total <i>in vitro</i> en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre .....	34
Cuadro 7. Valores de pH, nitrógeno amoniacal y purinas en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre .....	35
Cuadro 8. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) totales en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre .....	39
Cuadro 9. Concentración de ácido acético, propiónico y butírico en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre .....	41
Cuadro 10. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS) en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción de biogás <i>in vitro</i> (mL g <sup>-1</sup> MS) en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre. ....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

Los gases de efecto invernadero (GEI) mantienen cálida la superficie terrestre; son producto de la actividad humana y afectan el clima global causando el cambio climático. De los GEI se encuentran el metano (CH<sub>4</sub>), el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), los hidrofluorocarbonos (HFC), los perfluorocarbonos (PFC) y el hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) (Avnery *et al.*, 2013). El sector agropecuario, específicamente la fermentación ruminal produce CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> responsables del 18% del calentamiento global de acuerdo a Montenegro y Abarca (2000). Los ovinos y los caprinos producen de 10 a 16 kg de CH<sub>4</sub> año<sup>-1</sup> y los bovinos de 60 a 160 kg año<sup>-1</sup> dependiendo de su tamaño y alimentación, la mayor producción de CH<sub>4</sub> se observa en dietas de baja calidad, misma que representa una pérdida en la dieta de un 5 a un 7 % (Murray *et al.*, 1976; Muñoz *et al.*, 2012). Debido a que el CH<sub>4</sub> posee un efecto hasta 30 veces mayor que el CO<sub>2</sub> en el calentamiento del planeta (McCaughey *et al.*, 1999), actividades dirigidas a reducir las emisiones de biogás, en especial el CH<sub>4</sub> en rumiantes se han enfocado a la manipulación de la dieta, mejorando la calidad del alimento y empleando aditivos que inhiben la producción de CH<sub>4</sub>, al eliminar o reducir los microorganismos relacionados con la producción del CH<sub>4</sub> principalmente (Eckard *et al.*, 2010; BuddLe *et al.*, 2011).

El Cobre (Cu) es un nutriente esencial para muchos organismos y es también altamente tóxico (Rensing y Grass, 2003). Diversos macro y micro elementos definidos como esenciales, influyen en la fermentación ruminal dentro y fuera de los rangos determinados como óptimos para los rumiantes (Rodríguez, 1995; Arelovich, 1998). Asimismo, los microorganismos ruminales requieren minerales para su desarrollo y supervivencia, siendo susceptibles a altas concentraciones; aunque, algunos pueden adaptarse (Barry y Blaney, 1987).

Se ha estudiado muy poco el efecto de la suplementación de Cu en las bacterias ruminales y su hospedero (FEDNA, 2009). Niveles superiores a 0.5 mM de Cu incrementaron el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo *in vitro* (Pécou *et al.*, 2006), pero, esta concentración propicia proteólisis celular (Lu y Solioz, 2001). Otros estudios reportan requerimientos de Cu para bacterias ruminales en un rango de 1 a 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Martínez y Curch, 1970; NRC, 2001; Arelovich, 2008). Por otro lado, un estudio aislado reportó una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> con concentraciones superiores a 40 partes por millón (ppm) de Cu en un sistema *in vitro* con bacterias ruminales (Cervantes, 2012); no obstante, el requerimiento de Cu que optimice el metabolismo y crecimiento bacteriano, y su efecto en las bacterias metanogénicas no ha sido bien documentado. Por lo anterior, el presente estudio se condujo para investigar el efecto de diferentes concentraciones de Cu en un sistema de fermentación ruminal *in vitro* en la producción de biogás y la actividad bacteriana, inoculando con bacterias de ovinos, caprinos y bovinos.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Ambiente ruminal

El rumen es la principal cámara de fermentación, en donde se encuentran en simbiosis, el animal hospedero y microorganismos ruminales como bacterias, protozoarios y hongos. Los más importantes por su manipulación son las bacterias sintetizadoras de la mayor cantidad de sustratos energéticos como los ácidos grasos volátiles (AGV) y además proporcionan proteína microbiana al ser arrastradas a través del omaso, abomaso e intestino, en donde se digiere su proteína y se absorben como aminoácidos libres que son utilizados para la síntesis de proteína animal (Karsli y Russell, 2000). Las bacterias, protozoarios y hongos junto con el hospedero generan un ambiente con características fisicoquímicas (Cuadro 1) que favorecen la actividad de los microorganismos ruminales (Yokoyama y Johson, 1988).

**Cuadro 1. Características fisicoquímicas del rumen**

Concepto	Valor	Principales gases disueltos	%	Acido Grasos Volátiles, $\mu\text{mol mL}^{-1}$	
Temperatura, °C	38 a 41	Bióxido de carbono	65.30	Acético	66-70
pH	5.3 a 7.2	Metano	26.76	Propiónico	23-25
Potencial de oxidación, mV	-250 a -450	Nitrógeno	7.0	Butírico	15-20
Osmolaridad, mOsm $\text{kg}^{-1}$	248 a 400	Oxígeno	0.56		
Tensión superficial, dinas $\text{cm}^{-1}$	45 a 59	Hidrógeno	0.18		
Contenido de materia seca, %	10 al 18	Sulfato de hidrógeno	0.01		
Gravedad específica, $\text{kp m}^{3-1}$	1.022 a 1.055	Amoníaco, $\mu\text{mol mL}^{-1}$	<92		

Cobos, 2007.

Debido al papel que juegan los microorganismos ruminales en la degradación de la pared celular de los forrajes y que la proteína microbiana es de alto valor biológico, las dietas de los rumiantes deben formularse para permitir el crecimiento y estimular la actividad de los microorganismos ruminales, de tal forma que pueda optimizarse el aprovechamiento de los componentes de la dieta, reflejándose en una mayor productividad del animal (Simpson *et al.*, 2002).

## **2.2 Microbiología del rumen**

Se han reportados 24 géneros de bacterias, 30 de protozoarios y cinco de hongos (Van Soest, 1994), subsisten del alimento ingerido por el rumiante, altos en celulosa y hemicelulosa; estos microorganismos son el punto clave del aparato digestivo del animal. Además usan el nitrógeno no proteico (urea, ácido úrico y amoníaco) producen proteína microbiana de alto valor biológico. Es decir, los rumiantes pueden satisfacer sus necesidades biológicas con alimentos de bajo valor nutritivo y producir carne y leche de alto valor proteico y energético (Van Soest, 1994).

## **2.3 Características generales de los microorganismos ruminales**

### **2.3.1 Bacterias ruminales**

En el rumen se hospedan varias especies de bacterias  $10^{10}$  a  $10^{11}$  mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal (2011). Las bacterias son más abundantes que los demás microorganismos del rumen, la mayoría de las especies son anaerobias estrictas y Gram (-), con formas variadas (cocos, cocobacilos, bacilos, espiroquetas, esporiformes y treponemas), son las principales degradadoras de los nutrientes en el mismo, y son el principal componente de proteína microbiana que transita de rumen a duodeno, representando un 80%; se clasifican de acuerdo a su actividad degradativa en amilolíticas, celulolíticas, hemicelulolíticas,

proteolíticas, ureolíticas, metanogénicas, utilizadoras de amonio, de lípidos y ácidos orgánicos (Yokoyama y Johson, 1988).

### **2.3.2 Bacterias ruminales metanogénicas**

El CH<sub>4</sub> es producido en el rumen por bacterias estrictas altamente especializadas, en su metabolismo energético la mayoría utiliza el CO<sub>2</sub> como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia, convirtiéndolo en CH<sub>4</sub>; el H<sub>2</sub> es utilizado como donador en este proceso (Brock y Madigan, 1984). Para la degradación de materia orgánica; el rumen propicia condiciones ideales como ausencia de luz, anaerobiosis, presencia de NO<sub>3</sub>, S, SO<sub>4</sub> que conducen a la biosíntesis del CH<sub>4</sub> (Mah, 1982). El CH<sub>4</sub> es producido por microorganismos del dominio *Archaea*, divididos en dos reinos: *Euryarchaeaota* (metanogénicos, halófilos extremos y algunos hipertermófilos) y *Crenarchaeaota* (hipertermófilos y no termofílicos) (Jarrell *et al.*, 1999). Algunas especies de bacterias productoras de CH<sub>4</sub> son: *Methanobacterium formicicum*, *M. bryantii*, *M. thermoautotrophicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. arboriphilus*, *M. smithii*, *Methanococcus vanniellii*, *M. voltae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanogenium cariaci*, *M. marisnigri*, *Methanospirillum hungatei* y *Methanosarcina barkeri* (Klass, 1984). Además de las bacterias metanogénicas existe una diversidad bacteriana en el rumen que metaboliza carbohidratos, proteínas y lípidos convirtiéndolos en fragmentos de menor peso molecular; estos elementos son utilizados por bacterias acetogénicas, generando acetato, pero también se produce H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, elementales para las bacterias metanogénicas (Klass, 1984). Además de la producción de CH<sub>4</sub>, existe la oxidación de este gas por microorganismos ruminales metanotrofos, con poca importancia cuantitativa (Kajikawa *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Protozoarios ruminales

La concentración normal de protozoarios varía de  $10^4$  a  $10^6$  mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal, se clasifican de acuerdo a su morfología en ciliados y flagelados. Los protozoarios más importantes son los ciliados por su concentración abundante y por su actividad, y se dividen en dos órdenes *Trichostomatida* y *Entodinomorphida* (Jouany, 1994). Los protozoarios son células eucarióticas, presentan núcleo diferenciado envuelto por la membrana nuclear, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Presenta estructuras citoplasmas únicas como un micronúcleo, vacuolas de digestión, hidrogenosomas (presenta función similar a las mitocondrias pero adaptado a un metabolismo anaerobio, no existe ciclo de Krebs ni fosforilación oxidativa) y placas esqueléticas (estructura a base de amilopectina); los protozoarios ruminales ingieren bacterias y partículas de alimento (almidón) (Cobos, 2007).

### 2.3.4 Hongos ruminales

La concentración de hongos varía de  $10^3$  a  $10^5$  mL<sup>-1</sup> de líquido ruminal (Jouany, 1994). De las especies más conocidas están *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis*, *Piromonas communis* (Orpin, 1975; 1977), y *Orpinomyces* (Kudo *et al.*, 1990). Estos microorganismos cobran especial importancia en el rumen, en la degradación de la fibra, resultando más eficientes en el metabolismo de las paredes celulares en comparación con la bacterias del rumen; además, tienen la facultad de solubilizar la lignina, componente que limita la digestibilidad de la celulosa y hemicelulosa (Kajikawa *et al.*, 2003).

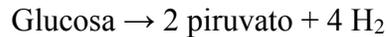
## 2.4 Metabolismo ruminal en la producción de metano

La producción ganadera a nivel mundial produce de 15 a 20% de las emisiones de gas CH<sub>4</sub> (McCaughey *et al.*, 1997; Moss y Givens, 2002). Durante el metabolismo del rumiante, la producción de CH<sub>4</sub> se da principalmente en rumen, aproximadamente en 87% y un 13% es producido en el sistema digestivo posterior, de esta última producción, un 11% es absorbido hacia la sangre y expulsado a través de los pulmones. Esto indica que a través del eructo y la respiración es expirado al ambiente un 98% del total del CH<sub>4</sub> producido por el rumiante (Montenegro y Abarca, 2000). Del total de la energía potencial del alimento consumido por los bovinos, aproximadamente un 5.5 a 6.5% es usada para la producción de CH<sub>4</sub> y estos valores cambian de 2 a 12% en condiciones de pastoreo en zonas templadas (Anderson y Rasmussen, 1998; Weimer, 1998; Kurihara *et al.*, 1999).

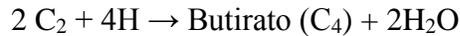
Los principales factores que influyen en la producción de CH<sub>4</sub> es la cantidad de carbohidratos fermentados en el retículo-rumen, implica diversas interacciones entre el animal y la dieta, y afectan el balance entre las tasas de fermentación y la tasa de pasaje. Por otra parte la relación de AGV también afecta la producción de CH<sub>4</sub>, ya que estos regulan la producción de H<sub>2</sub> y la subsecuente producción del CH<sub>4</sub> (Johnson y Johnson, 1995).

En la metanogénesis, la relación acético: propiónico tiene mayor impacto en la producción de CH<sub>4</sub>; si todo los carbohidratos fueran fermentado a acético sin producir propiónico se perdería 33% de la energía, si esta relación va de 0.9 a 4.0, la pérdidas por CH<sub>4</sub>, varían ampliamente (Johnson y Johnson, 1995). La estequiometría de la principales rutas de fermentación ruminal se resumen de la siguiente manera (Moss *et al.*, 2000).

Reacciones que producen H<sub>2</sub>:



Reacciones que utilizan el H<sub>2</sub>:



La fermentación de carbohidratos produce sustancias reducidas y son utilizadas por bacterias metanogénicas, bajo este esquema el acetato incrementa y generalmente el propionato disminuye, en dichas condiciones el acetato es bajo pero no se considera precursor del CH<sub>4</sub> (Van, 1996). Moss *et al.* (2000) señala que la producción de CH<sub>4</sub> es promovida por el acetato y el butirato, y la formación de propionato puede ser considerada como una forma competitiva en el uso de H<sub>2</sub> en el rumen. Una baja eficiencia alimenticia está asociada con una alta proporción acetato:propionato, lo que involucra la producción de CH<sub>4</sub> (Van, 1994).

La estequiometría de la fermentación predice la producción de CH<sub>4</sub>, si se reduce la producción molar de propionato es asociado en el incremento en la producción de CH<sub>4</sub> por kilogramo de materia orgánica fermentada, estos modelos ignoran la fermentación de sustratos no carbohidratos, como la proteína (Moss y Givens, 2002). El incremento térmico negativo se relaciona con la producción de CH<sub>4</sub>, esto se debe al metabolismo del formiato y es precursor del gas (Van, 1994).

El pH es un factor importante en la fermentación ruminal y en la producción de CH<sub>4</sub>. En un experimento *in vitro* con medio de cultivo que contenía 100 mM de acetato, a un pH de 7, usando bacterias ruminales de bovinos alimentadas con forraje, se reportó que el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> se convirtieron en

CH<sub>4</sub> independientemente del pH. Pero se observó que la producción de CH<sub>4</sub> disminuye a pH menor a 6.5 y no hubo producción de este gas a un pH de 6 (Van y Rusell, 1996).

El pH influye en las bacterias metanogénicas, y es un factor importante en la predicción de la producción de CH<sub>4</sub>, la fermentación ruminal de forrajes de baja calidad no disminuye el pH, por el contrario están asociadas a una alta producción de CH<sub>4</sub>, pero dietas con altos contenido de alimentos concentrados, específicamente en un máximo consumo, disminuyen la producción de CH<sub>4</sub> (Van y Rusell, 1996). En dietas basadas en forraje y con un pH bajo, se disminuye la metanogénesis independiente de la producción del propionato (Moss y Givens, 2002).

Existen tres aspectos importantes que inhiben la metanogénesis, el primero, las bacterias metanogénicas son sensibles a un bajo pH, en segundo lugar es la disminución en la relación acetato:propionato dependiente del pH, y por último la producción de ácidos que se producen a pH bajo en la fermentación (Van y Russell, 1996).

## **2.5 Minerales y la respuesta microbiana ruminal**

### **2.5.1 Macrominerales**

Los microorganismos ruminales tienen requerimientos minerales propios, pero pueden o no coincidir con los del animal hospedante; en el caso del fósforo, los requerimientos bacterianos se cubren con el contenido en la saliva, y sólo en caso de carencia extrema, se producirá una deficiencia bacteriana (Suttle, 1987). Estudios *in vitro* demostraron que para un cultivo continuo fueron necesarios de 75 a 100 mg L<sup>-1</sup> del mineral para propiciar la máxima tasa de crecimiento bacteriano (Komisarczuk, 1987). Por otra parte, fueron necesarios 4.3 g de fósforo kg<sup>-1</sup> de materia orgánica fermentada para la síntesis de

proteína microbiana, y se incrementa a 6.9 g para la degradación de celulosa (Ramírez-Pérez y Meschy, 2005).

Morales (2005) señala que los requerimiento de calcio y magnesio en bacterias ruminales presentan gran variabilidad aún dentro de la misma cepa y también cambian de acuerdo al tipo de sustrato (NRC, 2001). El azufre está vinculado al metabolismo del nitrógeno; además es requerido para que los microorganismos sintetizen aminoácidos como cisteína, cistina y metionina, vitaminas del complejo B como la tiamina y biotina, y enzimas; en este sentido, la microflora ruminal altera el contenido de azufre y nitrógeno en la dieta, vía hidrólisis y procesos de síntesis (Braytenbach, 1999).

Las bacterias ruminales utilizan el azufre orgánico e inorgánico, suplementarlo en la dieta incrementa la síntesis de proteína, mejora el balance de aminoácidos ruminales y contribuye a la actividad de los hongos celulíticos (Morrison *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1996). Los requerimientos de los microorganismos ruminales son muy variables, se asocian a los requerimientos de nitrógeno, y podrían ser cubiertos en base a la relación N:S de 20 ( $\pm 12$ ):1 (Gutiérrez *et al.*, 1996).

### **2.5.2 Microminerales**

El cobalto impacta en forma diferencial en el metabolismo de los microorganismos y del animal hospedante; este microelemento es necesario en el rumen para la síntesis de la vitamina B<sub>12</sub>, la cual es requerida en el cuerpo como cofactor de la metil-malonil-CoA mutasa, que cataliza la síntesis de propionato en rumen (Nagaraja *et al.*, 1997; Tiffany *et al.*, 2006).

La deficiencia de cobalto en la dieta produce acumulación de succinato en el rumen; este déficit se ve reflejado en los microorganismos y en la fermentación al disminuir el propionato; sin embargo, en el animal se mantienen reservas de vitamina B<sub>12</sub> y no se presentan signos de carencias de cobalto (Kennedy *et al.*, 1996; Tiffany *et al.*, 2006).

Las concentraciones óptimas y tóxicas de microelementos para los microorganismos ruminales determinadas *in vitro* se presenta en el Cuadro 2, es preciso enfatizar, que al usar los minerales como aditivos, existen amplias diferencias entre niveles requeridos y la tolerancia máxima tanto para la microflora ruminal como para el animal hospedante (Martínez y Church, 1970; NRC, 2000).

**Cuadro 2. Requerimientos de microelementos para los microorganismos ruminales y el animal hospedante**

Elemento, ppm	Microorganismos ruminales <sup>1</sup>		Animal Hospedante <sup>2</sup>	
	Optima	Tolerancia	Optima	Tolerancia
Boro	0 a 200	300	-	-
Cadmio	1 a 7	10	-	-
Cobalto	1 a 3	7	-	10
Cromo	1 a 3	10	10	1000
Cobre	0 a 0.1	1	-	50
Fluór	0 - 0.05	0.5	50	-
Hierro	2 a 5	100	0.5	1000
Iodo	20	> 1000	20 a 40	50
Manganeso	5 a 30	100		1000
Molibdeno	10 a 200	> 500		5
Níquel	0 a 0.1	0.5	-	50
Selenio	0 a 0.1	7	0.10	2
Zinc	3 – 10	20	30 - 40	500

<sup>1</sup>Concentración para máxima digestión de celulosa o toxicidad (Martínez y Church, 1970).

<sup>2</sup>NRC, (2000).

## 2.6 Suplementación de cobre a los rumiantes

De acuerdo a las normas FEDNA (2009), la suplementación mineral se debe de calcular en base a su disponibilidad; la recomendación final será por el estado y nivel productivo del animal si como la disponibilidad del mineral. Los requerimientos de Cu varían entre especie; los niveles recomendados para una especie pueden ser tóxicas para otra. La recomendación en vacas lecheras es de 11 ppm de Cu en la ración (NRC, 2001). Mientras que en terneros se recomienda incluir en la ración 10 ppm de Cu. El NRC (1996) y McDonald *et al.* (2006) recomienda 3 ppm de Cu en raciones de corderos. En la Unión Europea, la dieta de los terneros no debe exceder las 50 ppm, en ovinos la cantidad máxima permitida es de 15 ppm (UE, 2004). El Cu forma parte de diversas enzimas con función oxidasa que son necesarias para la síntesis de hemoglobina, el mantenimiento de la integridad estructural de los huesos y vasos sanguíneos, la síntesis de colesterol entre los principales (Bondi, 1989).

El sulfato de Cobre y el proteinato de Cobre a bajas concentraciones de molibdeno (menor a 6.9 ppm) tiene la misma disponibilidad biológica; pero si el molibdeno es superior, el proteinato de Cu es más disponible que el sulfato cúprico (Ward *et al.*, 1996). El carbonato cúprico eleva el nivel de Cu plasmático, pero no es almacenado eficientemente en el hígado; sin embargo, una mejora en la canal de los corderos se observa usando se suplementa con Cu, pero esto es complicado debido a la sobredosificación ya que está conlleva a una intoxicación, debido a que los corderos sólo toleran como máximo 15 ppm en la dieta y los bovinos hasta 100 ppm (INRA, 1988). Sin embargo, la sobredosificación del Cu representa un problema de contaminación ambiental, porque los animales excretarán este mineral a través de las heces (Sprinkle *et al.*, 2006).

En corderos, el margen entre necesidad y una dosis tóxica de este micromineral es mínimo, dado que el contenido de Cu en los ingredientes de los concentrados puede alcanzar fácilmente concentraciones de 10 a 15 mg de Cu kg<sup>-1</sup> de materia seca (MS), puede ser aconsejable evitar la suplementación y nunca superar los niveles de 15 mg de Cu kg<sup>-1</sup> del alimento (FEDNA, 2008).

## **2.7 Emisiones de gases de efecto invernadero**

La concentración atmosférica de CH<sub>4</sub> aumentó de 715 a 1774 ppb en el 2005 y en los siguientes 50 años el CH<sub>4</sub> podría causar entre un 15 a 17% del calentamiento global (IPCC, 2007). Conjuntamente, el rendimiento de las cosechas disminuiría un 10% para el año 2030, si no reducen las emisiones de precursores de O<sub>3</sub> como NO, NO<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, y los compuestos orgánicos volátiles distintos del CH<sub>4</sub> (Avnery *et al.*, 2013). El 60% de la emisión mundial de CH<sub>4</sub> se relaciona con actividades humanas como la ganadería, la agricultura, el uso de combustibles fósiles, entre otros (IPCC, 2007).

Como se muestra en el Cuadro 3, las emisiones de gases efecto invernadero estimadas para México se han encontrado diferencias y muestra un aumento considerable entre los años 1996 y 2006; el aumento de las emisiones representa una problemática continúa para el cambio climático (González y Ruiz, 2007).

**Cuadro 3. Gases de efecto invernadero en México (gigagramos de equivalentes de CO<sub>2</sub>)**

	Porcentaje por año					
	1996	%	2002	%	2006	%
Total de emisiones*	686,000	100.0	643.183	100.0	711,650	100.0
CO <sub>2</sub>	514.047	75.0	480.409	74.0	492.862	69.3
CH <sub>4</sub>	157.648	23.0	145.586	23.0	188.036	26.4
NO <sub>2</sub>	14.422	2.0	12.343	2.0	20.511	2.0
Energía	364.189	53.0	389.497	61.0	430.097	60.4
Residuos	61.710	9.0	65.584	10.0	102.173	14.4
Cambio de uso de la tierra y silvicultura.	157.000	22.9	89.854	14.0	70.203	9.9
Procesos industriales	43.121	6.3	52.102	8.0	63.526	8.9
Agricultura	55.674	8.1	46.146	7.0	45.552	6.4

Adaptado de INE, 2001; INE-SEMARNAT, 2006; Hernández y Ordoñez, 2008; INE- SEMARNAT, 2009.

En el Cuadro 4 se muestra la variabilidad en el interés de diferentes países a nivel mundial, en realizar investigaciones relacionadas con las emisiones de CH<sub>4</sub> por rumiantes; USA y Canadá son los principales países con mayor publicaciones respecto a la emisión de este gas (17.5 y 14.4%, respectivamente), con relación a las publicaciones mundiales; sin embargo, México tiene una participación pobre de tan sólo 1.6%, indicando una fuerte necesidad por el desarrollo de investigaciones que conduzcan a mitigar el calentamiento global (Bonilla y Lemus, 2012).

**Cuadro 4. Publicaciones relacionadas con la producción de metano entérico en rumiantes de algunos países**

País	Publicaciones	%	País	Publicaciones	%
USA	45	17.5	Irlanda	6	2.3
Canadá	37	14.4	Francia	5	1.9
Nueva Zelanda	25	9.7	México	4	1.6
Japón	24	9.3	Perú	4	1.6
Australia	21	8.2	Argentina	3	1.2
Inglaterra	17	6.6	Colombia	3	1.2
Suiza	14	5.4	Alemania	3	1.2
Brasil	10	3.9	Italia	2	0.8
India	9	3.5	Bélgica	2	0.8
España	8	3.1	Holanda	1	0.4
Escocia	7	2.7	Ucrania	1	0.4
China	6	2.3	Total	257	100.0

Bonilla y Lemus, 2012.

## **2.8 Producción de biogás por la fermentación ruminal y su impacto en el ambiente**

La producción pecuaria de los rumiantes contribuye a las emisiones de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O a la atmósfera, el aumento de estos gases provocan la destrucción de la capa de ozono y el aumento de la temperatura terrestre (Primavesi *et al.*, 2004). El CO<sub>2</sub> era el más abundante de los gases con efecto invernadero y tiene un gran aporte en el calentamiento global, pero las concentraciones del CH<sub>4</sub> se están incrementando y posee un efecto de 21 a 30 veces más que el CO<sub>2</sub> (McCaughey *et al.*, 1999).

Países con pocas limitaciones para alimentar a su ganado, reportan menor emisión de gas CH<sub>4</sub> y mayor eficiencia energética, estos emiten aproximadamente 35 kg de CH<sub>4</sub> al año por animal, mientras que los países en vías de desarrollo emiten 55 kg de CH<sub>4</sub> al año por animal (Kinsman *et al.*, 1995).

## 2.9 Microbiología ruminal y su efecto en la metanogénesis

La diversidad de microorganismos en el rumen, en un ambiente anaerobio, fermentan principalmente carbohidratos solubles y estructurales, siendo estos últimos más importantes en los forrajes (Kurihara, 1999). Las bacterias metanogénicas *Achaea* (Stewart, 1991; Van, 1994; Weimer, 1998) y un grupo microbiano filogenéticamente distinto a las *Eubacterias* (Van, 1994; Weimer, 1998) son responsable del CH<sub>4</sub> producido. Las *Archaea* no tienen polímeros de peptidoglicanos en su pared celular y diferentes lípidos intracelulares (Moss *et al.*, 2000).

El CH<sub>4</sub> en la naturaleza se produce por dos principales vías, la primera es  $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  y es la principal ya que requiere de 4 a 12 horas para la generación de las poblaciones metanogénicas, mientras que la segunda es  $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$  denomina acetilclástica presenta menor efecto en la producción debido a que requiere de 17 a 30 horas para la generación de las poblaciones (López, 1998; Weimer, 1998).

Las principales bacterias metanogénicas descritas son *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanomicrobium mobile* y en ovinos alimentados con melaza *Methanosarcina barkerii* (Stewart, 1991; Yokoyama y Johnson, 1993; Van Soest, 1994). Este grupo de bacterias regulan el total de H<sub>2</sub> en la fermentación ruminal, la producción de CH<sub>4</sub> a partir de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>,

pero algunas bacterias metabolizan metanol, metilamina y acetato para producir CH<sub>4</sub>, como es el caso de *Methanosarcina barkerii*, la producción de CH<sub>4</sub> reduce la concentraciones de H<sub>2</sub> permitiendo el crecimiento de otras especies de bacterias y permiten una fermentación ruminal eficiente (Weimer, 1998). Las bacterias metanogénicas eliminan el H<sub>2</sub> y permiten el crecimiento a bacterias productoras de H<sub>2</sub>, tales como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Selenomonas ruminantium*, estas producen más H<sub>2</sub> y por lo tanto su metabolismo aumenta en el rendimiento de energía (Yokoyama y Johnson, 1993).

La producción de CH<sub>4</sub> en rumen es una vía de aceptación de electrones, la metanogénesis remueve continuamente el H<sub>2</sub> y la elevada acumulación puede disminuir la degradación de la materia orgánica (Yokoyama y Johnson, 1993). La producción de CH<sub>4</sub> promueve una fermentación eficiente y mayor síntesis de adenosín trifosfato (ATP) al mantener concentraciones bajas de H<sub>2</sub>, en lugar de representar ineficiencia para el animal (Weimer, 1998).

Algunas bacterias metanogénicas se adhieren a protozoarios ruminales, sugiriendo una posible transferencia interespecífica de H<sub>2</sub>, estos juegan un papel importante en la producción de CH<sub>4</sub> especialmente en ganado alimentado con dietas altas en concentrado (Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000). La defaunación de rumiantes alimentados con dietas altas en concentrados disminuye la producción de CH<sub>4</sub> hasta en un 50% y con dietas altas en forraje no lo reduce significativamente (Johnson y Johnson, 1995). El sinergismo entre algunos hongos y bacterias metanógenicas incrementa la población de hongos ruminales; también la tasa de hidrólisis y degradación de la celulosa es incrementada por esta asociación microbiana, que a su vez aumenta la producción de acetato a expensas de la reducción de lactato y etanol (Dehority y Tirabasso, 2000).

## **2.10 Manipulación de la fermentación ruminal para disminuir la producción de biogás**

Los avances en la manipulación de los microorganismos ruminales son de interés para generar productos de origen animal saludables, seguros y ambientalmente aceptables en una empresa rentable y productiva. Numerosos métodos de manipulación ruminal han sido evaluados y adaptados, y otros se encuentran en fase experimental (Santra *et al.*, 2003).

En relación al uso de inhibidores de arqueas en el rumen, los compuestos más exitosos probados *in vivo* son bromoclorometano, sulfonato 2-bromo-etano, cloroformo, y ciclodextrina, reducen la producción del CH<sub>4</sub> hasta en un 50% en ovinos, caprinos y bovinos (Immig *et al.*, 1996; Lila *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2011; Mitsumori *et al.*, 2011). Pero las bacterias ruminales pueden adaptarse a este tipo de compuestos (Johnson *et al.*, 1972; Immig *et al.*, 1996).

El 3-nitrooxypropanol redujo la producción del CH<sub>4</sub> en el ganado ovino en 24% (Martínez *et al.*, 2013). Al suplementar hexafluoruro de azufre en vacas lecheras, refleja una disminución dramática en la producción de CH<sub>4</sub> del 60% (Haisan *et al.*, 2013). Sin embargo al utilizar hexafluoruro de azufre en vacas en lactancia, la reducción de CH<sub>4</sub> fue de tan sólo el 8% (Reynolds *et al.*, 2013).

Los ionóforos usados en programas de alimentación de rumiantes, son agentes químicos que modifican la fermentación ruminal inhibiendo las bacterias Gram + que producen NH<sub>3</sub> o ácido láctico (Faixová y Faix, 2005). Los ionóforos como la monensina y la lasalocida incrementan la producción de propionato, reducen la degradación de proteína y emisión de CH<sub>4</sub>, incrementan la conversión

alimenticia, disminuyen el nivel de grasa y promueven la proporción de ácidos grasos saturados en la leche (Teather y Forster, 1998).

La defaunación es la eliminación de protozoarios, y en diversidad de estudios mostró una mejora en el crecimiento y eficiencia de la conversión alimenticia ya que reduce el CH<sub>4</sub> y aumenta el flujo de proteína al intestino delgado (Santra *et al.*, 2003). Las enzimas fibrolíticas pueden mejorar la degradación de la fibra y sólo son condicionadas cuando se presenta una reducción en el pH (Yang *et al.*, 2002). Numerosos estudios presentan mejoras en la fermentación ruminal de diversos inhibidores del CH<sub>4</sub>, sacaridasas, proteasas y deaminasas (Teather y Forster, 1998; Santra *et al.*, 2003).

## **2.11 Estrategias en el sector pecuario para contrarrestar el cambio climático**

La población mundial crecerá de 7.2 mil millones a 9.6 mil millones en el año 2050, representa un desafío para los sistemas de alimentación y para la agricultura, mientras que los recursos naturales para apoyar la alimentación mundial no van a crecer. Condicionado por la demanda de una clase media que aumenta su población a nivel global, las dietas se harán más ricas y cada vez más diversificadas y el crecimiento en productos de alimentación de origen animal será en particular más fuerte; la demanda de carne y leche en el 2050 está proyectada para crecer en 73 y 58 %, respectivamente, con respecto al año 2010 (FAO, 2011).

La ganadería contribuye al cambio climático, las emisiones se estiman en 7.1 gigatoneladas por año, lo que representa el 14.5% de la emisiones de GEI por la actividades de la humanidad. El ganado bovino destinado a carne y el productor de leche son responsables de las emisiones del 40 y 20%, respectivamente, la producción de carne de cerdo contribuye con 9% y la producción de aves de corral

con 8%. En general, en la producción de alimento para ganado y la fermentación entérica de los rumiantes es la principal fuente de emisión de GEI y contribuyen con 45 y 39% respectivamente, el estiércol con 10% y el resto es generado por procedimiento y transporte de productos de origen animal (FAO, 2013).

Hasta el momento hay pocas soluciones para mitigar la emisión de GEI por los rumiantes, actualmente se busca disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub> a nivel mundial. La población humana aumenta y el consumo de carne crece, por lo que es necesario un equilibrio en la producción y la regulación de las emisiones de GEI.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar la producción de biogás y la actividad bacteriana en un cultivo *in vitro* con cantidades crecientes de cobre y empleando inóculos de bacterias ruminales de ovinos, caprinos y bovinos.

##### **3.1.1 Objetivos específicos**

Cuantificar la producción de biogás total producido por la fermentación de bacterias ruminales a la 72 h en un cultivo *in vitro* cuando se utilizan cantidades crecientes de cobre y fuentes de inóculo ruminal de ovinos, caprinos y bovinos.

Cuantificar la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica a la 72 h en un cultivo *in vitro* cuando se utilizan cantidades crecientes de cobre y fuentes de inóculo ruminal de ovinos, caprinos y bovinos.

Evaluar el efecto en la concentración de ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal y el pH a la 72 h en un cultivo *in vitro* adicionando diferentes cantidades de cobre y fuentes de inóculo ruminal de ovinos, caprinos y bovinos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Cantidades crecientes de cobre en un cultivo *in vitro* disminuyen la producción de biogás, aumentan la actividad de las bacterias ruminales de ovinos, caprinos y bovinos reflejándose en incrementos de la digestibilidad y mayor producción de ácidos grasos volátiles.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente al programa de Ganadería, en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5, carretera México - Texcoco, Montecillo, Estado de México.

Se realizó un experimento *in vitro*, utilizando tres fuentes de inóculo de líquido ruminal (ovinos, caprinos y bovinos), mediante los cuales se definió la concentración óptima y tóxica de Cu para las bacterias ruminales, su efecto en la producción de biogás y actividad bacteriana.

### 5.1 Animales

Los animales donadores de líquido ruminal fueron tres ovinos machos criollos de dos años de edad y 35 kg PV, tres caprinos hembras criollas de cinco años de edad y de 30 kg PV y tres bovinos machos Holstein de 2 años de edad y de un peso de 250 kg PV.

Los animales fueron separados por especie en corrales con piso de concreto, contaban con comederos y bebederos techados. Fueron desparasitados con ivermectina 10 mg mL<sup>-1</sup> y clorsulón 100 mg mL<sup>-1</sup> (Ivomec ®-F) se le aplicó vía subcutánea 5 mL a los bovinos, 0.7 mL a los ovinos y 0.6 mL caprinos y vitaminados (Vigantol ® ADE fuerte) vía intramuscular se les aplicó 3 mL a los bovinos y 2 mL a los ovinos y caprinos. La alimentación fue a libre acceso con alfalfa achicalada, cada animal fue canulado quirúrgicamente en rumen y fueron atendidos de acuerdo a la bioética de los Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## **5.2 Fermentación *in vitro***

### **5.2.1 Obtención del líquido del rumen**

La extracción del líquido ruminal se hizo mediante una bomba de vacío eléctrica, que consiste en un compresor de aire de 250 psi y un motor alimentado con 12 volts (MIKEL'S®). La extracción de líquido ruminal fue por especies y el matraz donde se depositó dicho líquido se introdujo en un termo que contenía agua a 39 °C. El líquido ruminal extraído fue mezclado para crear una muestra compuesta por especie y la duración de la extracción por muestra de cada animal fue de 15 seg.

### **5.3 Búfer, tratamientos y fermentación *in vitro***

El búfer mineral (Cuadro 5) empleado en este experimento fue elaborado como lo describe Menke *et al.* (1979), se elaboraron tres réplicas de 840 mL, y para cada una de estas se usaron fuentes de inóculo procedentes de líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos. Para la evaluación de los tratamientos experimentales, se prepararon viales de 100 mL que contenían como sustrato 0.5 g de alfalfa molida a un tamaño de partícula de 1 mm, a los cuales se adicionó su respectivo tratamiento de cobre (Sulfato de cobre, CuSO<sub>4</sub>, PM=249.7, Sigma®) a partir de la cual se elaboraron diluciones a 0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 ppm, en tres series con base a la fuente de inóculo ruminal (ovino, caprino o bovino), y nueve repeticiones por tratamiento.

Una vez extraído el líquido ruminal, inmediatamente se mezcló con el búfer y se mantuvo a 39 °C, bajo flujo de CO<sub>2</sub>; a los viales previamente preparados con sustrato y el correspondiente tratamiento con cobre, se les adicionaron 40 mL de la mezcla del búfer con líquido ruminal (Cuadro 5), bajo flujo de CO<sub>2</sub> con el fin de crear un ambiente anaerobio; posteriormente se colocó en el vial un tapón de goma y

se selló herméticamente con arillos metálicos, finalmente se incubaron a baño maría, a 39 °C durante 72 h y en un ambiente oscuro.

**Cuadro 5. Componentes del medio de cultivo empleado en el experimento *in vitro***

Solución buffer	
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)	139.8000 mL
Bicarbonato de amonio (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	0.5592 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	4.8930 g
Solución de macromineral	
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)	139.800 mL
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.7968 g
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.8667 g
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	0.0838 g
Solución de microminerales*	
Agua destilada (H <sub>2</sub> O) para 100 mL	
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O), 13.2 g	
Cloruro de magnesio tetrahidratado (MnCl. 4H <sub>2</sub> O), 10 g	0.0700 mL
Cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl. 6H <sub>2</sub> O), 1 g	
Cloruro férrico (FeCl <sub>3</sub> ), 8 g	
Indicador de óxido-reducción	
Resazurina al 1%	0.7200 mL
Solución reductora	
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)	28.0000 mL
Sulfato de sodio anhidro (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.1596 g
Sosa 0.1 N (NaOH)	1.1200 mL
Líquido ruminal	
Líquido ruminal	280.0000 mL
Agua destilada (H <sub>2</sub> O) extra	279.6000 mL

Menke *et al.*, 1979.

\*Se prepararon 100 mL y se usaron solo 0.07 mL de la mezcla y el resto se guardó en refrigeración a 4 °C.

## **5.4 Pruebas del laboratorio**

### **5.4.1 Producción de biogás**

Una vez iniciada la fermentación se determinó la producción de biogás a las 12, 24, 48 y 72 h en un sistema que contaba con una bureta graduada y conectada a una manguera con una aguja que es introducida en el tapón del vial para liberar el biogás acumulado y por desplazamiento de agua se midió la producción de biogás en mililitros como lo describe Fedorak y Hrudey (1983).

### **5.4.2 pH**

Después de la última medición de la producción de biogás, en el horario de 72 h de incubación, se procedió a medir el pH del medio de cultivo con un potenciómetro marca ORION, modelo 250A calibrado a pH 4 y 7. Se procedió a tomar muestras del medio de cultivo para determinar la concentración de nitrógeno amoniacal, ácidos grasos volátiles y concentración de bacterias totales como se describe a continuación. Finalmente, los viales se colocaron a 4 °C durante 15 min con el fin de detener la actividad bacteriana.

### **5.4.3 Nitrógeno amoniacal**

La concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) se determinó por la técnica de McCullough (1967). Se colocaron 4 mL del medio de cultivo en tubos de ensaye de 13 x 100 mm, se agregó 1 mL de ácido metafosfórico al 25%, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 12,879 g a 24 °C. Del sobrenadante se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se depositaron en tubos de 10 mL, a los cuales se les adicionó 1 mL de fenol, 1 mL de hipoclorito de sodio, con NaOH (5 g de NaOH y 10 mL de hipoclorito de sodio), se incubó a 37 °C en baño maría durante 30 min y se les agregó 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron leídas a 630 nm en un espectrofotómetro Cary 1-E, UV-visible, Marca Varían.

#### 5.4.4 Ácidos grasos volátiles

Para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles se empleó la técnica de Erwin *et al.* (1961). Se tomaron 4 mL del medio de cultivo y se mezclaron con 1 mL de ácido metafosfórico al 25%, así las muestras fueron conservadas a 4°C. Posteriormente, del sobrenadante se tomaron 2 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 12,879 g a 24°C, colectando 1.5 mL del sobrenadante y depositándolos en viales Eppendorf de 2 mL. La concentración de AGV de las muestras se determinó en un cromatografo Hewelt Packard mod. 6890, puerto de inyección 7386 con muestreador automático, la columna capilar HP-FFAP longitud 30 m, diámetro interno 0.25 mm y película de 0.25 micras. Temperatura del inyector 210°C, detector 230° C con un flujo de hidrógeno de 35 mL min<sup>-1</sup> y un flujo de aire de 350 mL min<sup>-1</sup> y como gas acarreador nitrógeno a 14 mL min<sup>-1</sup> y el horno con una rampa de temperatura inicial de 70 °C min<sup>-1</sup>, luego 150 °C 1.5 min<sup>-1</sup>, originando una corrida de 5.50 minutos, donde el ácido acético se graficó a los 3.94 min, el propiónico a los 4.54 min y el butírico a los 5.28 min.

#### 5.4.5 Degradación *in vitro* de la materia seca

Para determinar la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se vació el sustrato residual de la alfalfa en un tubo de plástico para centrifuga (Labcon North America de 50 mL) previamente ajustado a peso constante, identificado y pesado; una vez colocado en el tubo, el residual se centrifugó a 11,180 g durante 10 min, se eliminó el líquido sobrenadante por decantación, y el tubo con la materia seca remanente se colocaron a 55°C en una estufa para su secado durante 24 horas, el tubo con el residuo seco se pesó en la balanza analítica y se le resto el peso del tubo y el residuo del blanco. La DIVMS se calculó mediante la siguiente formula: 
$$\text{DIVMS (\%)} = ((\text{PIS}) - (\text{PFS}) / (\text{PIS}) * (100)) - (\text{MS del blanco})$$

Donde: PIS: Peso inicial del sustrato y PFS: Peso final del sustrato.

#### 5.4.6 Purinas

Del residuos remanentes de cada vial, por cada tratamiento se unieron para crear una mezcla compuesta; de los cuales se colecto 0.5 g y se colocaron en tubos con tapa de rosca por triplicado y en otro tubo se agregó 0.5 g del RNA para crear la curva estándar. Posteriormente se les añadieron 2.5 mL de ácido perclórico agitando con un vórtex, después se les colocó en baño María a 90 °C durante 60 minutos, agitando con un vórtex cada 8 minutos; inmediatamente se sacaron los tubos y se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos sin dejar de agitar, luego se añadieron 17.5 mL de fosfato de amonio al 0.0285 M y se colocaron nuevamente en baño María (90 °C) durante 15 minutos, después se sacaron y agitando en vórtex y se colocaron en un vibrador ultrasónico por 15 min a 90 °C, pasado el tiempo se filtró con papel filtro del No. 2 aproximadamente 1.5 mL. De este filtrado se tomó 0.5 mL, se depositaron en tubos para centrifuga, se agregó 0.5 mL de nitrato de plata al 0.4 M y 9 mL de fosfato de amonio al 0.2 M; finalmente los tubos se taparon y se refrigeraron a 4 °C durante 24 horas.

Pasadas las 24 hora de refrigeración, los tubos que contenían las muestras se centrifugaron a 3500 g durante 20 min a 5 °C, pasado el tiempo se decantó el líquido, evitando derramar el pellet, posteriormente se añadieron 10 mL a cada tubo de una mezcla elaborada con 0.0271 mL de ácido sulfhídrico al 0.01 N, 25 mL de nitrato de plata al 0.4 M y aforado a 2 L, con un pH ajustado a 2; posteriormente se agitó con vórtex, se volvió a centrifugar a 3500 g durante 30 minutos a 0 °C, se decantó el líquido y se agregaron 10 mL de ácido clorhídrico 0.5 N; las muestras se taparon y se agitaron hasta deshacer el pellet. Después, los tubos se taparon con canicas y se colocaron a baño María a 90 °C durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se aspiraron los residuos flotantes en cada tubo y después se centrifugo a 3500 g durante 10 minutos a 21 °C. Las muestras con el RNA se diluyeron a 0.24, 0.5 y 0.75 mL en tubos de ensayo y se aforaron a 10 mL con ácido clorhídrico 0.5 N. Para realizar la lectura del contenido de purinas fue en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA) se ajustó

a cero con ácido clorhídrico y se calibró la curva con las diluciones del RNA; finalmente se leyeron las muestras a 260 nm.

### **5.5 Modelo no lineal para calcular la producción de biogás total**

La producción de biogás total ( $\text{g MS}^{-1}$ ) con respecto a las horas de incubación (12, 24, 48 y 72 h) fueron calculados por el modelo no lineal, con el Software SigmaPlot (Ver. 10.01, 2007). El modelo se realizó con el procedimiento de Oskev y McDonald (1979) de la siguiente manera:

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

Dónde:

$p$  = el volumen producido de gas en el tiempo.

$a$  = el intercepto de la curva de la producción de biogás en el tiempo cero.

$b$  = el potencial de la producción de gas a través del tiempo.

$c$  = la constante de la velocidad de producción de biogás "b" en horas "t".

$t$  = el tiempo de incubación.

### **5.6 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar con siete tratamientos (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 ppm de Cu) y hubo una reducción de los mimos tomando como base el nivel de cobre donde la cinética ruminal no tuvo respuesta. Se asignaron nueve repeticiones por tratamiento. Los datos se analizarán mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS, 2004). Las medias de tratamientos de las variables evaluadas: pH, concentración de bacterias totales, concentración de ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal, purinas y digestibilidad aparente, se compararon con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). De los datos de los mL de biogás  $\text{g MS}^{-1}$  en el tiempo (12, 24, 48 y 72 horas), usando los resultados del

modelo con el procedimiento de Oskev y McDonald (1979) a partir de la hora 48 hasta las 72 horas, los 95 datos calculados por el programa se analizaron mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS, 2004) y se compararon con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_j$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = variable respuesta

$\mu$  = media general

$T_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\varepsilon_j$  = error experimental

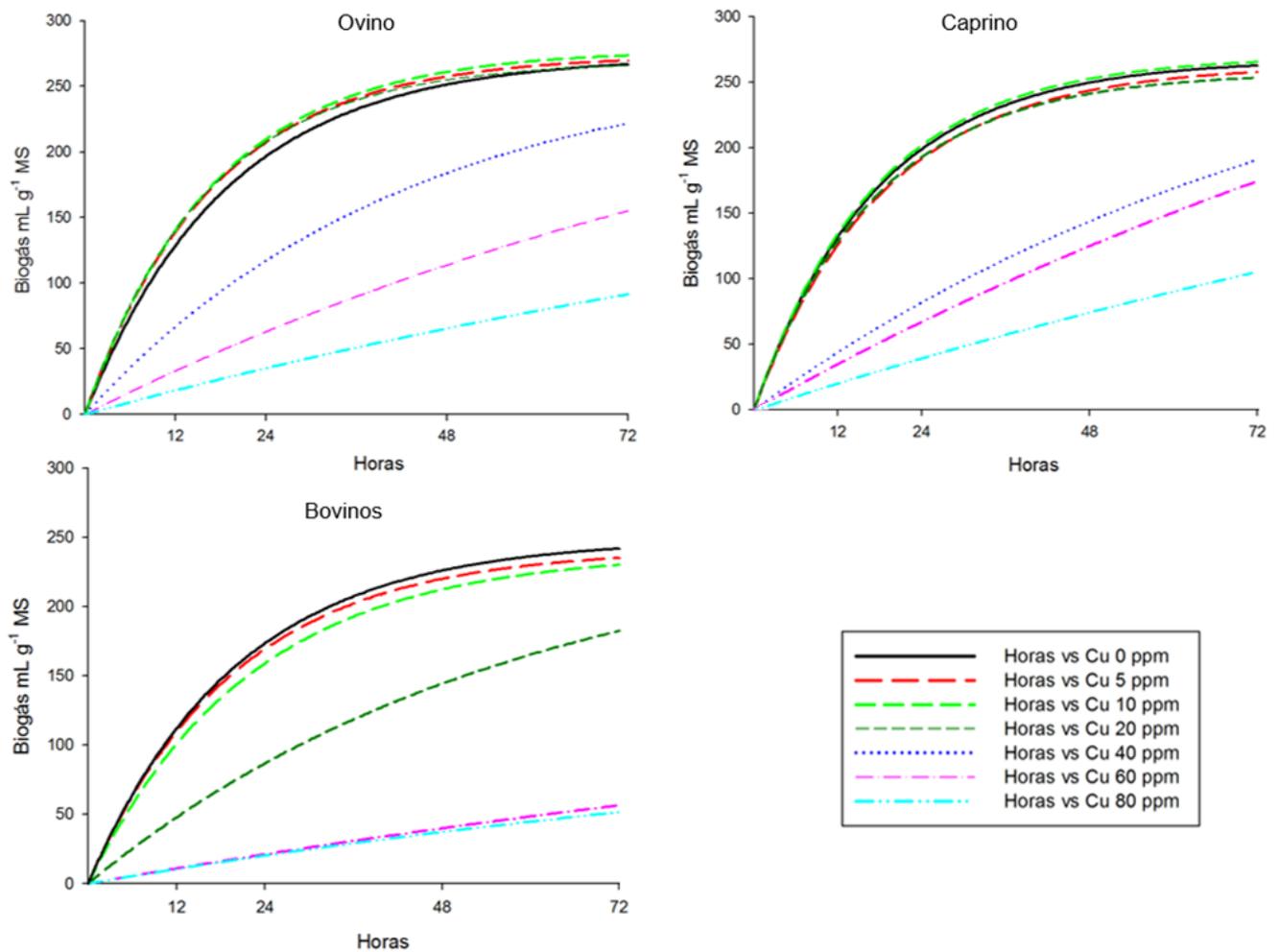
## 6. RESULTADO Y DISCUSIÓN

### 6.1 Producción de biogás total en un sistema *in vitro* (mL g<sup>-1</sup> MS) en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre

En la Figura 1 se presentan los resultados de la producción de biogás total en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de Cu evaluados a diferentes horarios de incubación (0, 12, 24, 48 y 72 h) en un sistema *in vitro*. Los resultados con niveles de 0 a 20 ppm de cobre producen los más altos ( $p < 0.05$ ) volúmenes de gas acumulado a 0, 12, 24, 48 y 72 h. Sin embargo, la producción de biogás total se reduce con niveles superiores a 20 ppm de cobre. Por lo anterior, para el resto de las variables evaluadas se decidió solo considerar los niveles de cobre de 0, 5, 10 y 20 ppm en los cuales se observa crecimiento bacteriano normal, tomando como indicativo inicial la producción de biogás. En consecuencia, se establece que niveles de 40, 60 y 80 ppm del mineral resultan tóxicos para las bacterias ruminales, independientemente de la procedencia del inóculo ruminal.

Está documentado que altas concentraciones de cobre disminuye considerablemente la actividad bacteriana ruminal, y la producción de biogás total es un indicador del efecto que tiene los metales sobre la actividad bacteriana (Yue *et al.*, 2007). Se ha demostrado en estudios con bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras que el daño ocasionado por el cobre es principalmente en la membrana y es un evento clave en la muerte por contacto (Santo *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2012; Santo *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012). EL agua que se encuentra entre las bacterias y el Cu, permite que migren los iones de este mineral, pero el contacto prolongado de las bacterias con el metal puede

acelerar el daño de la membrana y el acceso de iones de Cu al interior de la célula, (Molteni *et al.*, 2010; Elguindi *et al.*, 2011). El mecanismo de intoxicación por Cu en las bacterias implica las siguientes etapas: daños del exterior e interior de la membrana de las bacterias, la acumulación de iones de Cu en la célula y la degradación del DNA (Grass *et al.*, 2011), finalmente repercutiendo en el cese del metabolismo bacteriano y la subsecuente reducción en la producción de biogás.



**Figura 1. Producción de biogás *in vitro* (mL g<sup>-1</sup> MS) en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre.**

La producción de biogás *in vitro* está relacionada con la eficiencia de utilización del alimento por parte de los microorganismos ruminales. En general, sustratos nutricionalmente más pobres tienden a

presentar una fermentación con mayores proporciones de acetato y butirato, la síntesis de estos compuestos está asociada con la producción de CO<sub>2</sub>, en consecuencia este tipo de alimentos presentarán mayores volúmenes de gas por miligramo de sustrato degradado (Noguera *et al.*, 2011). La producción de gas *in vitro* es un indicador de la fermentación de los carbohidratos. En este sentido, la mejor ( $p<0.05$ ) producción de biogás total se observó de forma general con niveles de 10 ppm de Cu (Cuadro 6), y esto explica la optimización que el mineral tuvo sobre la población bacteriana y su actividad metabólica.

En el Cuadro 6 se presentan los resultados relacionados con la producción de biogás total en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre evaluados a las 72 horas de incubación. Cuando se utilizaron inóculos de ovinos, la producción más alta ( $p<0.05$ ) de biogás total ocurrió al adicionar al medio 10 ppm de Cu y el nivel más bajo ( $p<0.05$ ) se observó con 0 y 20 ppm del mineral. Al utilizar inóculos ruminales de caprinos en los medios de cultivo la adición de 10 ppm de Cu presentó la producción más alta ( $p<0.05$ ) de biogás total y el nivel de 20 ppm el nivel más bajo ( $p<0.05$ ). En contraste, los inóculos de bovinos presentaron la producción más alta ( $p<0.05$ ) de biogás total cuando no se adicionó Cu al medio y con niveles de 20 ppm se registró la cantidad más baja ( $p<0.05$ ) de biogás. Analizando la fuente de inóculo ruminal, el procedente de bovinos observó la producción más baja de biogás total, independientemente del nivel de Cu evaluado en los medios de cultivo. Durante el proceso fermentativo *in vitro*, los sustratos incubados con bacterias ruminales de caprino produjeron un mayor volumen de gas en relación con la cantidad de sustrato degradado, sugiriendo que una menor proporción de la MS degradada se utilizó para la síntesis de biomasa microbiana. (Noguera *et al.*, 2011).

**Cuadro 6. Producción de biogás total *in vitro* en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

Tratamiento Cu (ppm)	Ovino	Caprino	Bovino
	Biogás, mL g <sup>-1</sup> MS		
0	260.5 <sup>c</sup>	257.5 <sup>b</sup>	235.6 <sup>a</sup>
5	265.0 <sup>b</sup>	252.2 <sup>c</sup>	229.2 <sup>b</sup>
10	268.8 <sup>a</sup>	260.5 <sup>a</sup>	222.9 <sup>c</sup>
20	261.5 <sup>c</sup>	248.6 <sup>d</sup>	164.9 <sup>d</sup>
Media	264.0	254.7	213.1
CV	1.3	1.7	3.2

<sup>a, b, c</sup> Medias con distinta literal en la mismas columna son diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

CV: Coeficiente de variación.

## **6.2 Valores de pH, nitrógeno amoniacal y purinas de medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

El valor del pH no fue afectado ( $p > 0.05$ ; Cuadro 7) al adicionar niveles crecientes de Cu, ni al cambiar la fuente de líquido ruminal (ovinos, caprinos o bovinos) en el medio de cultivo a las 72 h de incubación, y registró valores dentro del rango óptimo para la actividad y crecimiento de los microorganismos ruminales (Zhang *et al.*, 2007). La estabilidad del pH está influenciada por diversos factores, pero los rumiantes y los micro organismo del rumen poseen un sistema específico para mantenerlo dentro de los límites fisiológicos establecidos entre 5.5 y 7.0 (Krause y Oetzel, 2006). La saliva de los rumiantes posee capacidad amortiguadora debido a los bicarbonatos y fosfatos presentes en ésta, mantienen el pH con valores entre 6 a 7 en una fermentación normal (Yokoyama y Johnson, 1988). De forma similar actúan los amortiguadores que constituyen el medio de cultivo al neutralizar

los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación bacteriana en el sistema *in vitro* (Menke *et al.*, 1979).

Los reportes en la literatura asociados al efecto del Cu sobre la actividad microbiana del rumen, *in vitro* e *in situ*, son escasos y no concluyentes. Algunos autores reportaron que la adición de Cu al medio de cultivo afecta el pH ruminal 2 h después de haber agregado este mineral al medio (Nikolić *et al.*, 1983), situación que no ocurrió en este experimento después de 72 h de incubación y con concentraciones de Cu de 0 a 20 ppm. Congruente con estos resultados, Cervantes (2012), tampoco observó cambios en los valores de pH al evaluar niveles crecientes de Cu la cuales se encontraron entre 0 y 100 ppm. Hasman *et al.* (2009) reportan que al cambiar la concentración de sulfato de cobre de 0 a 40 ppm el pH disminuye de 7.0 a 3.3 al final de la medición. En este sentido, se puede mencionar que a pesar de que los niveles de Cu evaluados en este trabajo fueron desde 0 hasta 20 ppm, el pH no sufrió cambios drásticos que afectaran la fermentación bacteriana.

**Cuadro 7. Valores de pH, nitrógeno amoniacal y purinas en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

Tratamiento	Ovino	Caprino	Bovino	Ovino	Caprino	Bovino	Ovino	Caprino	Bovino
Cu (ppm)	pH			N-NH <sub>3</sub> , mg dL <sup>-1</sup>			Purinas, mg dL <sup>-1</sup>		
0	6.7 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	35.3 <sup>a</sup>	44.2 <sup>a</sup>	22.7 <sup>b</sup>	5.3 <sup>c</sup>	8.5 <sup>a</sup>	4.7 <sup>c</sup>
5	6.6 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	26.3 <sup>c</sup>	44.5 <sup>a</sup>	31.3 <sup>a</sup>	6.1 <sup>b</sup>	6.7 <sup>b</sup>	6.4 <sup>b</sup>
10	6.6 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	31.1 <sup>b</sup>	36.7 <sup>b</sup>	24.3 <sup>b</sup>	7.2 <sup>a</sup>	6.1 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup>
20	6.6 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	22.6 <sup>d</sup>	25.6 <sup>c</sup>	21.9 <sup>b</sup>	6.8 <sup>ab</sup>	5.5 <sup>d</sup>	6.9 <sup>a</sup>
Media	6.7	6.7	6.6	28.8	37.8	25.0	6.4	6.7	6.0
CV	6.2	6.6	2.6	7.4	6.6	11.9	8.1	4.9	5.7

<sup>a, b</sup> Medias con distinta literal en la mismas columna son diferentes (Tukey, p<0.05).

CV: Coeficiente de variación.

En el Cuadro 7 se presentan los resultados relacionados con la concentración de nitrógeno amoniacal determinada en los medios de cultivo inoculados con tres fuentes de líquido ruminal y niveles crecientes

de cobre e incubados a 72 h. Con líquido ruminal de ovinos, la mayor ( $p < 0.05$ ) concentración de  $\text{N-NH}_3$  ( $35.3 \text{ mg dL}^{-1}$ ) se observó cuando no se adicionó Cu al medio de cultivo y la menor concentración se presentó al adicionar 5 ppm de Cu ( $26.3 \text{ mg N-NH}_3 \text{ dL}^{-1}$ ). En el caso de los cultivos inoculados con líquido ruminal de caprinos, la mayor ( $p < 0.05$ ) concentración se registró en los cultivos con 0 y 5 ppm de Cu ( $44.5$  y  $44.2 \text{ mg dL}^{-1}$  de  $\text{HN}_3\text{-N}$ , respectivamente) y la menor producción fue con 20 ppm del mineral ( $25.6 \text{ mg dL}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_3$ ). Sin embargo, al usar el inóculo ruminal de bovinos, la mayor ( $p < 0.05$ ) concentración de nitrógeno amoniacal fue de  $31.3 \text{ mg dL}^{-1}$ , y se presentó al adicionar 5 ppm de Cu al medio, y la menor ( $p < 0.05$ ) concentración fue registrada al adicionar 20 ppm ( $21.9 \text{ mg dL}^{-1}$ ). De manera general, el inóculo ruminal de caprinos presentó la mayor producción de  $\text{N-NH}_3$  en los medios de cultivo, en comparación con los obtenidos de ovinos y bovinos.

La producción de  $\text{N-NH}_3$  está relacionada con la actividad microbiana ruminal y se observa un incremento del metabolito después de la ingestión de alimento, derivando en la descomposición de proteínas a esqueletos carbonados y amoniaco (Throne *et al.*, 2009). La concentración de nitrógeno amoniacal en el medio ruminal es muy variada y está influenciada por factores como el contenido de proteína en la dieta y la eficiencia en la degradación microbiana de la proteína, la absorción de  $\text{N-NH}_3$  a través de la pared ruminal y su incorporación a la proteína microbiana; por ejemplo, dietas con bajo contenido proteico se relacionan con baja cantidad de nitrógeno amoniacal (Abdoun *et al.*, 2007). Sin embargo, ciertos compuestos en el medio pueden modular la producción de nitrógeno amoniacal. Estudios realizados por Arelovich (2008) demostraron que la adición de Cu en cultivos *in vitro* disminuye la producción de  $\text{N-NH}_3$  y puede estar relacionado con una disminución en la tasa de ureolisis ruminal; no obstante, a concentraciones de 0.383 ppm se estimula la actividad enzimática microbiana. En contraste, concentraciones de 60 ppm de Cu o superiores disminuyen la concentración

de nitrógeno amoniacal, de tal manera que con 80 y 100 ppm de este mineral en cultivos *in vitro* se reduce la producción de amonio en 39 y 46%, respectivamente (Cervantes, 2012).

Al evaluar los resultados relacionados con la concentración de purinas (Cuadro 7) en los medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos, y niveles crecientes de Cu, se determinó que para el caso de los medios inoculados con líquido ruminal de ovinos la mayor ( $p < 0.05$ ) concentración de purinas se presentó al adicionar 10 y 20 ppm de Cu al medio, lo que originó 7.2 y 6.8 mg de purinas  $\text{dL}^{-1}$ , respectivamente, sin existir diferencia significativa entre estos niveles, y la menor ( $p < 0.05$ ) concentración observada fue de 5.3 mg  $\text{dL}^{-1}$  cuando no se adiciona Cu al medio. En los medios inoculados con líquido ruminal de caprinos, la mayor ( $p < 0.05$ ) producción de purinas fue de 8.5 mg  $\text{dL}^{-1}$  y se presentó cuando no se agregó Cu en el medio (0 ppm) y la menor ( $p < 0.05$ ) concentración fue de 6.1 mg  $\text{dL}^{-1}$  al adicionar 10 ppm de Cu. Con inóculos ruminales de bovinos la mayor ( $p < 0.05$ ) producción de purinas fue de 6.9 mg  $\text{dL}^{-1}$  y se presentó al adicionar 20 ppm de Cu y la menor ( $p < 0.05$ ; 4.7 mg  $\text{dL}^{-1}$ ) se registró sin adicionar Cu al medio. Al comparar las fuentes de inóculos ruminales, la mayor concentración de purinas se observó con líquido ruminal de caprinos, independientemente del nivel de Cu.

Las purinas son bases nitrogenadas constituyentes de las células microbianas, se encuentran principalmente en forma de nucleótidos y se identifican como adenina y guanina (Madigan *et al.*, 2009).

La proteína microbiana en forma aminoácida, pasa en cantidades considerables del rumen a duodeno, la maximización en su producción suplementa proteína al ganado y es forma más económica. También, los aminoácidos de la proteína verdadera, es parecida a la proteína de la carne y leche, reflejando una alta calidad nutricional. En este sentido, maximizar el contenido de purinas en sistemas *in vitro* o *in situ* sugiere un aumento en la población microbiana ruminal (Posada *et al.*, 2005).

Se ha estudiado muy poco el efecto de la suplementación de Cu en las bacterias ruminales (FEDNA, 2009), y por lo tanto su implicación en el contenido de purinas en condiciones *in situ* o *in vitro* donde se adicione el mineral. Niveles superiores a 0.5 mM de Cu incrementaron el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo *in vitro* (Pécou *et al.*, 2006), pero, a esta concentración propicia proteólisis celular (Lu y Solioz, 2001). Otros estudios reportan requerimientos de Cu para bacterias ruminales en un rango de 1 a 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  (NRC, 2001; Arelovich, 2008). Por su parte, Martínez y Church (1970) establecieron concentraciones óptimas (0 a 0.1 ppm) y tóxicas (1.0 ppm) de Cu para los microorganismos ruminales, determinadas bajo condiciones *in vitro* y enfatizan que al usar los minerales como aditivos, existen amplias diferencias entre niveles requeridos y la tolerancia máxima para la microflora ruminal. Estas variaciones también denotan la variabilidad que pueden existir en los microorganismos presentes en cada especie de rumiante, observándose diferencias en los niveles de purinas determinados a un mismo nivel de Cu pero con diferente fuente de inóculo ruminal, como sucedió en este experimento.

Con respecto a las fuentes de inóculos ruminales, Noguera *et al.* (2011) indicaron diferencias en el proceso fermentativo al comparar inóculos ruminales procedentes de caprino y bovinos, señalando que fue menos eficiente el obtenido a partir de caprinos y se basa en observaciones durante el proceso fermentativo *in vitro*, donde los sustratos incubados con líquido ruminal de caprinos produjeron un mayor volumen de gas en relación con la cantidad de sustrato degradado, sugiriendo que una menor proporción de la MS degradada se utilizó para la síntesis de biomasa microbiana y por lo tanto generó menor cantidad de purinas.

### 6.3 Concentración de ácidos grasos volátiles en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre

En el Cuadro 8 se presentan los resultados relacionados con la concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGV) determinados en medios de cultivos inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y niveles crecientes de Cu. Con la adición de inóculos ruminales de ovinos, la mayor ( $p < 0.05$ ) concentración de AGV ( $110.1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) se presentó cuando se adicionó al medio de 5 ppm de Cu y la menor ( $p < 0.05$ ) en el tratamiento testigo (0 ppm de Cu;  $77.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ); sin embargo, en el caso de los medios inoculados con líquido ruminal de caprinos no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos al incrementar los niveles de Cu de 0 a 20 ppm. Al adicionar a los medios de cultivo líquido ruminal de bovinos, la mayor ( $p < 0.05$ ) concentración de AGV totales se presentó con 0 ppm de Cu ( $87.6 \text{ mmol L}^{-1}$ ), y la menor con 20 ppm del mineral ( $80.7 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sin existir diferencia de estos tratamientos con los niveles de 5 y 10 ppm de Cu. Con base a las medias generales, el inóculo de caprinos sugiere mayor producción de AGV totales, independientemente del nivel de cobre evaluado.

**Cuadro 8. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) totales en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

Tratamiento Cu (ppm)	AGV Totales, $\text{mmol L}^{-1}$		
	Ovino	Caprino	Bovino
0	77.5 <sup>c</sup>	89.5 <sup>a</sup>	87.6 <sup>a</sup>
5	110.1 <sup>a</sup>	96.4 <sup>a</sup>	85.2 <sup>ab</sup>
10	84.7 <sup>b</sup>	100.7 <sup>a</sup>	84.4 <sup>ab</sup>
20	80.5 <sup>bc</sup>	96.8 <sup>a</sup>	80.7 <sup>b</sup>
Media	71.0	95.8	84.4
CV	3.8	7.2	5.6

<sup>a, b, c</sup> Medias con distinta literal en la mismas columna son diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

CV: Coeficiente de variación.

La concentración de ácido acético, propiónico y butírico determinadas en medios de cultivos inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con niveles crecientes de Cu se presenta en el Cuadro 9. Cuando se evaluó el inóculo de ovinos, la producción de acético observada en los tratamientos con 0, 5 y 10 ppm de Cu fue similar ( $p>0.05$ ), pero superior a la registrada con 20 ppm del mineral. En el caso del inóculo de caprinos, la concentración de acético más alta ( $p<0.05$ ) se presentó con 0 ppm de Cu y la más baja ( $p<0.05$ ) con 5 ppm, sin existir diferencias de con respecto a 10 y 20 ppm del mineral. La concentración de acético en medios de cultivo con inóculos de bovinos no presentó diferencias ( $p>0.05$ ) al adicionar 0, 5, 10 y 20 ppm de Cu. De acuerdo a las medias generales, los inóculos de ovinos presentan la menor producción de ácido acético en medios de cultivo con niveles crecientes de Cu.

La concentración de ácido propiónico (Cuadro 9) determinada en medios de cultivo adicionados con inóculos de ovinos fue mayor ( $p<0.05$ ) al adicionar 20 ppm de Cu y la menor ( $p<0.05$ ) concentración se presentó con 10 ppm, 24.6 y 18.2%, respectivamente. En el caso de los medios con inóculos de caprinos, la concentración de propiónico fue mayor ( $p<0.05$ ) al adicionar al medio 5 ppm de Cu y la menor ( $p<0.05$ ) concentración se observó sin adicionar Cu al medio (19.5 y 15.9%, respectivamente), sin existir diferencia ( $p>0.05$ ) entre estas concentraciones y los tratamientos con 10 y 20 ppm del mineral. Con inóculos procedentes de bovinos, la concentración de propiónico fue mayor ( $p<0.05$ ) al adicionar 20 ppm de Cu al medio y la menor ( $p<0.05$ ) concentración se presentó al adicionar 5 ppm de Cu (21.3 y 17.6% respectivamente), sin existir diferencia ( $p>0.05$ ) entre estas concentraciones y los tratamientos con 0 y 10 ppm del mineral. Las medias generales sugieren que al adicionar inóculos de ovinos aumenta la producción de propiónico en los medios de cultivo, en comparación con los inóculos de caprino y bovinos, e independientemente del nivel de Cu evaluado.

**Cuadro 9. Concentración de ácido acético, propiónico y butírico en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

Tratamientos Cu (ppm)	Acético, %			Propiónico, %			Butírico, %		
	Ovino	Caprino	Bovino	Ovino	Caprino	Bovino	Ovino	Caprino	Bovino
0	70.8 <sup>a</sup>	73.4 <sup>a</sup>	72.3 <sup>a</sup>	19.5 <sup>bc</sup>	15.9 <sup>b</sup>	17.9 <sup>ab</sup>	9.7 <sup>b</sup>	10.6 <sup>a</sup>	9.8 <sup>a</sup>
5	69.6 <sup>a</sup>	69.9 <sup>b</sup>	72.0 <sup>a</sup>	21.5 <sup>b</sup>	19.5 <sup>a</sup>	17.6 <sup>b</sup>	8.9 <sup>b</sup>	10.5 <sup>a</sup>	10.3 <sup>a</sup>
10	71.3 <sup>a</sup>	72.4 <sup>ab</sup>	70.4 <sup>a</sup>	18.2 <sup>c</sup>	17.9 <sup>ab</sup>	19.4 <sup>ab</sup>	10.4 <sup>ab</sup>	10.2 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>
20	63.6 <sup>b</sup>	71.9 <sup>ab</sup>	69.6 <sup>a</sup>	24.6 <sup>a</sup>	17.8 <sup>ab</sup>	21.3 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	9.7 <sup>a</sup>	9.0 <sup>a</sup>
Media	68.8	71.9	71.0	20.9	17.8	19.0	10.2	10.2	9.8
CV	2.2	2.7	3.8	6.6	7.5	11.5	9.9	9.1	10.0

<sup>a, b, c</sup>Medias con distinta literal en la mismas columna son diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

CV: Coeficiente de variación.

La concentración del ácido butírico (Cuadro 9) con el inóculo de ovinos fue mayor ( $p < 0.05$ ) al adicionar al medio 20 ppm de Cu y la menor ( $p < 0.05$ ) concentración se observó con 0 y 5 ppm. La concentración de butírico con inóculos de caprinos o de bovinos no presentó diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los niveles de Cu evaluados, y con base a la media general, la proporción de butírico fue similar entre las tres fuentes de inóculos evaluados.

Congruente con los resultados observados en este trabajo, otros autores como Essig *et al.* (1972), Nikolić *et al.* (1983), y Zhang *et al.* (2007), reportaron disminución en la concentración de AGV totales al adicionar niveles crecientes de Cu a las dietas de rumiantes, como sucedió en los medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos y bovinos. Sin embargo, los resultados reportados en la literatura son variables y no hay una definición del nivel óptimo de Cu que maximice la producción de AGV totales; mientras algunos autores señalan que la disminución puede darse con 6.5 ppm de Cu, otros estudios informan que esta reducción ocurre con niveles superiores a 60 ppm (Cervantes, 2012)

(Essig *et al.*, 1972; Nikolic *et al.*, 1983); en tanto, concentraciones de Cu de 40 mM en el medio no generan cambios en la producción de estos metabolitos (Hasman *et al.*, 2009).

Al analizar la concentración individual de ácidos grasos volátiles, de manera general los porcentajes de acético, propiónico y butírico disminuyeron al incluir en el medio de cultivo 20 ppm de Cu y proporcionalmente la contracción de acético suele ser más afectada al formarse acetato de Cu (Busch, 1980); en contraste con los resultados de este experimento, en otro estudio se reporta que al adicionar de 10 a 20 ppm de Cu a la dieta aumentó la concentración de ácido acético y disminuyó la concentración de propiónico y butírico (Zhang *et al.*, 2007) y un comportamiento inverso se observa con niveles superiores a 60 ppm del mineral (Cervantes, 2012). Al respecto, Busch (1980) menciona que la formación de acetato de cobre ocurre cuando el mineral reacciona con ácido acético, resultando un compuesto altamente oxidante, explicando la disminución de ácido acético en los medios de cultivo con los niveles más altos de Cu obtenidos en esta investigación. Para Solaiman *et al.* (2007), la adición de Cu a cantidades inferiores de 12 ppm al medio de cultivo no tiene ningún impacto sobre la producción de ácido acético, propiónico y butírico; sin embargo, con un incremento de este mineral, de 12 a 30 ppm, la concentración de AGV disminuye.

Los resultados observados en este estudio son congruentes con reportes citados en la literatura, en los que se ha estudiado el efecto de la concentración de Cu en el medios de cultivos *in vitro* e *in vivo* donde se indican que la adición de 10 a 20 ppm de Cu en dietas de rumiantes, muestran cambios detectables en las concentraciones molares de acético, pero la concentración de propiónico y butírico no se altera (Zhang *et al.*, 2007).

El tipo de inóculo ruminal también ha sido fuente de variación en la concentración detectada de AGV totales, y diferentes trabajos donde se compara líquido ruminal de caprinos, bovino y ovinos en la fermentación ruminal son disponibles en la literatura. Rutagwenda *et al.* (1990) y Lechner-Doll *et al.* (1995) no encontraron efecto significativo de la especie animal sobre la producción de metabolitos ruminales, incluyendo la de AGV, cuando incubaron forrajes con altos contenidos de celulosa, en el rumen de vacas, cabras, ovejas y camellos. De forma similar, Isac *et al.* (1994), reportan que los modelos de fermentación ruminal en cabras y ovejas no difieren significativamente cuando estos animales se alimentaron con heno de alfalfa.

Por otra parte, Domingue *et al.* (1991) trabajando con cabras y ovejas, comparando la capacidad para digerir las diferentes fracciones nutricionales de la paja de *Bromus catharticus*, encontraron que las cabras tuvieron incrementos en digestibilidad aparente, lo cual se relacionó con mayor producción de AGV que las ovejas. Al respecto, Rapetti y Bava (2008) reportan que las cabras son más eficientes en la fermentación del alimento que otras especies de rumiantes, esa mayor capacidad está dada por su mayor actividad masticatoria, mayor reducción del tamaño de partícula del alimento, mayor actividad selectiva, mayor tolerancia a pH ácidos en el rumen y menores tiempos de retención de partículas. Lo

anterior explica la mayor producción de AGV totales observada en este estudio, independientemente de las concentraciones de cobre evaluadas.

#### **6.4 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca en de un medios de cultivo inoculado con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca de alfalfa determinada a las 72 horas de incubación en medios de cultivos inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con niveles crecientes de cobre se presenta en el Cuadro 10. Los medios con inóculos de ovinos y adicionados con 5 ppm de Cu presentaron la mayor ( $p < 0.05$ ) digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIMVS) en comparación con aquellos que no se les adicionó Cu; sin embargo, no existió diferencia ( $p > 0.05$ ) y los tratamientos con 10 y 20 ppm del mineral. Los niveles de Cu evaluados no afectaron ( $p > 0.05$ ) la DIVMS al usar líquido ruminal de caprinos; pero cuando el inóculo procede de bovinos, la DIMS fue mayor ( $p < 0.05$ ) en aquellos medios de cultivo que contenían 10 ppm de Cu, y esta se reduce ( $p < 0.05$ ) en 53.2% cuando no se adiciona Cu. Al comparar la fuente de inóculo, el líquido ruminal de caprinos mostró menor capacidad para optimizar la digestibilidad del sustrato evaluado, independientemente del nivel de Cu.

**Cuadro 10. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca en medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos y con diferentes concentraciones de cobre**

Tratamiento	Ovino	Caprino	Bovino
Cu (ppm)	DIMS, %		
0	61.4 <sup>b</sup>	58.0 <sup>ab</sup>	39.2 <sup>c</sup>
5	64.2 <sup>a</sup>	54.6 <sup>b</sup>	67.1 <sup>b</sup>
10	62.3 <sup>ba</sup>	58.6 <sup>ab</sup>	73.6 <sup>a</sup>
20	63.1 <sup>ba</sup>	59.2 <sup>a</sup>	68.7 <sup>b</sup>
Media	62.7	57.6	62.1
CV	2.7	5.9	4.3

<sup>a, b, c</sup>Medias con distinta literal en la mismas columna son diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

CV: Coeficiente de variación.

Congruente con los resultados de este estudio, Zevenhuizen *et al.* (1979) y Zhang *et al.* (2007), señalan que la adición de 20 a 30 ppm de cobre en la dieta para rumiantes, no afecta la digestibilidad de la materia seca, aunque reportan una disminución en la población bacteriana. En otro estudio, Wang *et al.* (2010) informaron que la digestibilidad de la MS y MO no cambió al adicionar 20 ppm de Cu en la dieta de rumiantes, similar a lo que ocurrió en este trabajo, a excepción de los medios de cultivo inoculados con líquido ruminal de bovino, adicionado con 20 ppm de Cu, donde se observó una disminución de la DIMS. Recientemente, Cervantes (2012) señaló que niveles de 20 ppm de Cu y usando líquido ruminal de bovino no afecta la DIMS, pero cuando el nivel de Cu cambia a 80 ppm esta variable es afectada negativamente.

La capacidad de digestión en los rumiantes está dada en gran parte por factores implícitos en el ambiente ruminal, pero también los componentes anatómicos de la boca y el comportamiento ingestivo de cada especie de rumiante contribuye a esta actividad (Rapetti y Bava, 2008). Sin embargo, en estudios conducidos con el objetivo de elucidar posibles efectos en la variación de la actividad

microbiana de diferentes fuentes de inóculo de especies rumiantes, no se ha observado diferencia entre el líquido ruminal de cabras, ovejas, bovinos o camellos en cuanto a la cinética de degradación de la MS y la MO (Rutagwenda *et al.*, 1990; Lechner-Doll *et al.*, 1995; Noruega *et al.*, 2011), sugiriendo que no existe un efecto de la especie animal sobre la extensión de la degradación y la cinética de desaparición de los constituyentes de la dieta. Congruentemente, Isac *et al.* (1994), reporta que los modelos de fermentación entre cabras y ovejas no difieren significativamente en las tasas de digestión de la MS cuando estos animales se alimentaron con heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y vicia (*Vicia sativa*). También el estudio conducido por Flachowsky y Tiroke (1993), demostró una extensión y tasa de digestión de la MS similar entre cabras y ovejas consumiendo proporciones variables de Ryegrass (*Lolium multiflorum*), paja de trigo y concentrado.

Estas afirmaciones son congruentes con los resultados observado en este experimento, donde después de 72 horas de incubación *in vitro*, ninguna diferencia en la DIVMS se observó entre el inóculo procedente de ovino y bovino; sin embargo, el uso de líquido ruminal de caprino propició menor digestibilidad, lo cual contrasta con la producción de AGV totales determinada, donde el inóculo de caprinos registró la mayor producción de estos metabolitos, sugiriendo una mayor digestibilidad. Domingue *et al.* (1991) señalan que las cabras tienen mayor digestibilidad aparente de la fibra y mayores tasas de degradación de la celulosa y hemicelulosa.

Por otro lado, Lechner-Doll *et al.* (1995) al revisar el comportamientos ingestivo y digestivo en rumiantes concluye que los rumiantes mayores, entre estos los bovinos, optimizan la utilización de forrajes con altos contenidos de celulosa, incrementando los tiempos de retención de las partículas en el rumen; las cabras por su parte, son menos eficientes en la utilización de carbohidratos estructurales y compensan esta deficiencia ingiriendo partes de la planta más digestibles y con menores tiempos de

retención. Los métodos para determinar digestibilidad *in vitro* al tratarse de sistemas cerrados que no involucran la dinámica de las partículas en el rumen y que mediante el control del tamaño de partícula, simular el proceso de masticación durante el consumo y la rumia, pueden enmascarar estrategias evolutivas en el comportamiento ingestivo, que tienen incidencia directa sobre la forma en que los nutrientes se digieren (Noguera *et al.*, 2011).

## 7. CONCLUSIONES

Con base a los objetivos establecidos en esta investigación se puede concluir que la adición de niveles de 10 ppm optimizan la producción de biogás total al usar inóculos ruminales de ovinos y caprinos, relacionándose con mayor actividad bacteriana y mayor degradación de la materia seca, pero al incrementar la concentración de cobre por arriba de 20 ppm afectan la producción de biogás total en sistemas *in vitro*, independientemente de la fuente de inóculo ruminal (ovino, caprino o bovino), y de manera específica, el líquido ruminal de bovinos presenta la menor actividad microbiana reflejándose en una producción de biogás más baja,

El pH de los medios de cultivo no cambia al adicionar niveles de 0 a 20 ppm de cobre o al inocular con líquido ruminal de ovinos, caprinos o bovinos. Sin embargo la concentración de nitrógeno amoniacal es alta cuando se adicionan a los medios de cultivo 5 ppm de cobre y entre los inóculos evaluados, el de caprinos muestra la mayor producción de este metabolito. Asimismo, la mayor producción de ácidos grasos volátiles se registró al adicionar entre 5 y 10 ppm de cobre cuando se usaron inóculos de ovinos o bovinos, pero cuando el inóculo fue de caprino no existió diferencia entre los niveles de cobre evaluados (0 a 20 ppm). Niveles crecientes de cobre en los medios de cultivo se relacionaron con una disminución de acético e incremento de propiónico y butírico.

La fuente de inóculo no fue consistente en los cambios observados en la fermentación en sistemas *in vitro* evaluado con diferentes niveles de cobre.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abdoun K., F. Stumpff, H. Martens 2007. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim. Health Res. Rev.* 7: 1 – 17.
- Anderson, R. C., M. A. Rasmussen. 1998. Use of a novel nitrotoxin-metabolising bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technology.* 64, 89–95.
- Arelovich, H. M. 2008. Elementos minerales y su impacto en la fermentación. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 28(3):235-253.
- Arelovich, H. M. 2008. Minerals elements, the impact of fermentation. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 28: 235-253.
- Avnery S., D. L. Mauzerall., A. M. Fiore. 2013. Increasing global agricultural production by reducing ozone damages via methane emission controls and ozone- resistant cultivar selection. *Glob. Change Biol.* 19: 1285-1299.
- Barry, T. N., B. J. Blaney. 1987. Secondary compounds of forages. In: Hacker, J. B. and Ternouth, J. H. (Eds). *The Nutrition of herbivores.* Academic Press, Australia. pp. 91-119.
- Bondi, A. A. 1989. *Nutrición Animal.* Editorial Acribia. Zaragoza, España. 546 p.
- Bonilla, C. J. A., F. C. Lemus. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. *Rev. Mex. Cien. Pec.* 3(2): 215-246.

- Breytenbach S. 1999. Sulphur in Ruminant Nutrition. Stephan, Kynoch Feeds, Randburg; AFMAMatrix.[http://www.engormix.com/e\\_articles\\_view.asp?art=77](http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=77). Consultado el 12 de enero de 2014.
- Brock, D. T., W. D. Smith., Madigan T. M. 1984. Biology of microorganisms. 4th ed. Englewood Cliffs. Prentice-Hall Inc. NJ, USA.
- Buddle, B. M., M. Denis., G. T. Attwood., E. Altermann., P. H. Janssen., R. S. Ronimus., Pinares-Patiño, C. S., S. Muetzel., D. N. WedLock. 2011. Review: Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pastures. *Vet. J.* 188: 11-17.
- Busch, D. H. 1980. Inorganic syntheses, Volume XX. Edit. John Wiley & Sons. EEUU. pp.53-55
- Cervantes, G. D. 2012. Concentración óptima y tóxica de Cu para el crecimiento de bacterias ruminales. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad - Ganadería. Montecillo, Estado de México, México. 74 p.
- Church, C. D. 1988. El ruminante: Fisiología digestiva y nutrición. Editorial Acribia, S. a. 641 p.
- Cobos, P. M., C. R. Ferrera., A. Alarcon. 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales. In: *Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Editorial Trillas. México. pp. 498-516.
- Dehority B. A., P. A. Tirabasso. 2000. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2921-2927.

- Domingue, B. M. F., D. W. Dellow., T. N. Barry. 1991. Voluntary intake and rumen Digestion of a low quality roughage by goats and sheep. *J. Agric. Sci.* 117: 111–120.
- Elguindi J., S. Moffitt., H. Hasman., C. Andrade., S. Raghavan., C. Rensing. 2011. Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper ion-resistant bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:1963–1970
- Erwin, E. S., G. J. Marco., E. Emery. 1961. Volatile fatty acids analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
- Essing, J. H. W., D. Davis., L. J. Smithson. 1972. Copper Sulfate in Steer Rations. *J. Anim. Sci.* 35:436-439.
- Faixová, Z., S. Faix. 2005. Manipulation of rumen nitrogen metabolism (a review). *Folia Veterinaria*, 49: 215-219.
- FAO. 2011. World Livestock – Livestock in food security. Food and agriculture organization of the united nations. Rome.
- FAO. 2013. Tackling climate change through livestock. A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and agriculture organization of the united nations. Rome.
- FEDNA. 2008. Fundación Española para el Desarrollo de la Alimentación Animal. Necesidades nutricionales para rumiantes en cebo. Ediciones Perninsula S. L.- c/Tomelloso 27 – 28026 Madrid.

- FEDNA. 2009. Fundación Española para el Desarrollo de la Alimentación Animal. Normas FEDNA. Necesidades nutricionales para rumiantes de leche. Ediciones Perninsula S.L.-c/Tomelloso 27 – 28026 Madrid.
- Fedorak, P. M., S. E. Hrudey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.* 4: 425-432.
- González, A. E., S. L. Ruíz. 2007. Methane conversion factors from cattle manure in México. *Atmósfera.* 20(1): 83-92.
- Grass G., C. Rensing., M. Solioz. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1541-1547.
- Gutierrez H., T. Portman., V. Pershin., M. Ringuette. 2012. Evaluation of biocidal efficacy of copper alloy coatings in comparison with solid metal surfaces: generation of organic copper phosphate nanoflowers. *J. Appl. Microbiol.* 114(3):680-687.
- Gutiérrez, C. L., L. D. Contreras., G. J. T. Ramírez., F. Sánchez., C. H. González. 1996. Sulphur supplementation improves rumen activity. *Feed Mix.* 4:18-19.
- Haisan, J., Y. San., K. Beauchemin., L. Guan., D. R. Barreda., M. Oba. 2013. Effect of feeding 3-nitrooxpropanol on methane emissions and productivity of lactating dairy cows. *Adv. Anim. Biosci.* 4(2):260.
- Hasman, H., J. M. Bjerrum., E. L. Christiansen., H. C. B. Hansen., M. F. Aarestrup. 2009. The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *J. Microbiol. Methods.* 78:20-24.

- Hasman, H., J. M. Bjerrum., E. L. Christiansen., H. C. B. Hansen., M. F. Aarestrup. 2009. The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *J. Microbiol. Methods.* 78:20-24.
- Hernández, T. T., D. J. A. B. Ordóñez. 2008. Inventario de emisiones de gases de efecto invernadero para México. Tercera Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal Yucatán. 234 p.
- Immig, I., D. Demeyer., D. Fiedler., C. Van Nevel., L. Mbanzamihigo., 1996. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Arch. Tierernahr.* 49:363
- INE. 2001. Instituto Nacional de Ecología. Segunda comunicación nacional de México sobre cambio climático. Resumen ejecutivo. *Gaceta Ecol.* 60:37-49.
- INE-SEMARNAT. 2006. Instituto Nacional de Ecología-Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México tercera comunicación nacional ante la convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático. Primera ed.
- INE-SEMARNAT. 2009. Instituto nacional de ecología-Secretaría del medio ambiente y recursos naturales. México cuarta comunicación nacional ante la convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático. Primera ed.
- IPCC 2007. Intergovernmental Panel on Climate Change. The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, H.L. Miller. Ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 996 p.

- Isac, M. D., M. A. García., J. F. Aguilera., A. E. Molina. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of digestion and pasaje and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Archives of Animal Nutrition*. 46: 37-50.
- Jarrell, K. F., D. P. Bayley, J. D. Correia., N. A. Thomas. 1999. Recent excitement about Archaea. *Bioscience*. 49(7): 530-541.
- Johnson, E.D., A. S. Wood., J. B. Stone., Jr. E. T. Moran. 1972. Some effects of methane inhibition in ruminants (steers). *Can. J. Anim. Sci.* 52: 703–712.
- Johnson, K. A., D. E. Johnson. 1995. Methane emission from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
- Jouany, J. P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann Zootech.* 43:49-62.
- Kajikawa, H., C. Valdes., K. Hillman., R. J. Wallace., C. J. Newbold. 2003. Methane oxidation and its coupled electron-sink reactions in ruminal fluid. *Lett Appl Microbiol.* 36:354-357.
- Karsli, M. A., Russell, J. R. 2000. Effects of source and concentrations of nitrogen and carbohydrate on ruminal microbial protein synthesis. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 26: 201-207.
- Kinsman R., F. D. Sauer., H. A. Jackson., M. S. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci*; 78 (12): 2760-2766.
- Klass, D. L. 1984. Methane from anaerobic fermentation. *Science*. 223(4640): 1021-1028.

- Knight, T., R. S. Ronimus., D. Dey., C. Tootill., G. Naylor., P. Evans., G. Molano., A. Smith., M. Tavendale., C. S. Pinares-Patino., H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 101–112.
- Komisarczuk, S., R. J. Merry., A. B. McAllan. 1987. Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *Brit. J. Nat.* 57:279-290.
- Krause, M. K., G. R. Otzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 126: 215-236.
- Kudo, H., K. D., Jacober, R. C., Phillippe, K. J. Cheng, D. J. S., Barr J. W. C. 1990. Isolation and characterization of cellulolytic anaerobic fungi and associated mycoplasmas from the rumen of steer fed a roughage diet. *Cam. J. Microbiol.* 36: 513-517.
- Kurihara M., Magner T., McCrabb H., McCrabb G. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition.* 81: 227-234.
- Kurihara M., T. Magner., H. McCrabb., G. McCrabb. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition*; 81: 227-234.
- Lechner-Doll, M., W. Von Engelhardt., H. M. Abbas, L. Mousa, L. Luciano, E. Reale. 1995. Particularities in forestomach anatomy, physiology and biochemistry of camelids compared to ruminants. In: Tisserand JL (ed) *Elevage et alimentation du dromadaire-camel production and nutrition. Options méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches Nr 13, CIHEAM, Paris.* pp. 19-32.

- Lila, Z.A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. & Itabashi, H. 2003. Effect of  $\alpha$ -cyclodextrin-allyl isothiocyanate on ruminal microbial methane production in vitro. *J. Anim. Sci.* 74:321.
- López S., F. M. McIntosh., R. J. Wallace., C. J. Newbold. 1998. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*; 78: 1-9.
- Lu, Z., M. Solioz., 2001. Copper-induced proteolysis of the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 276:47822.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap., D. P. Clark. 2009. Brock, *Biología de los microorganismos*. C. Barranchina, M. Berlanga, M. G. D. Claros, M. F. Gacto, C. L. García, A. Prats, J. A. Ruiz, A. L. Ruiz-Bravo, traductores. 12 ed. Editorial Pearson Addison Wesley. 1259 p.
- Mah, R. A. 1982. Methanogenesis and methanogenic partnerships. *Phil Trans R. Soc. Lond. B.* 297:599-616.
- Martinez, A., D. C. Church. 1970. Effect of various mineral elements on *in vitro* rumen cellulose digestion. *J. Anim. Sci.* 31: 982-990.
- Martinez, F. G., A. Arco., L. Abecia., H. G. Cantalapiedra., A. E. Molina., G. A. I. Martin., M. Kindermann, S. Duval., R. D. R. Yanez. 2013. The addition of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol in the diet of sheep sustainably reduces methane emissions and the effect persists over a month. *Adv. Anim. Biosci.* 4(part 2):368.

- Martinez-Fernandez, G., A. Arco., L. Abecia., G. Cantalapiedra-Hijar., E. Molina-Alcaide., A. I. Martin-Garcia., M. Kindermann., S. Du val., D. R. Yanez-Ruiz. 2013. The addition of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol in the diet of sheep sustain ably reduces methane emissions and the effect persists over a month. *Adv. Anim. Biosci.* 4(part 2):368.
- McCaughey W, Wittenberg K, Corrigan D. Methane production by steers on pasture. *Can J An Sc*, 1997; 76 (3): 519-524.
- McCaughey, W. P., K. Wittenberg., D. Corrigan. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 221–226.
- McCoullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17: 297-302.
- McDonald, P., R. A. Edwards., J. F. D. Greenhalgh., C. A. Morgan. 2006. *Nutrición animal*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 587 p.
- Menke, K.H., L. Raab., A. Salewski., H. Steingass., D. Fritz., W. Schneider. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agric. Sci.* 1979; 93: 217–222
- Mitsumori, M., T. Shinkai., A. Takenaka., O. Enishi., K. Higuchi., Y. Kobayashi., I. Nonaka., N. Asanuma., S. E. Denman., C. S. McSweeney. 2011. Responses in digestion, rumen fermentation and microbial populations to inhibition of methane formation by a halogenated methane analogue. *Br. J. Nutr.* 8: 1–10.

- Molteni C., H. K. Abicht., M. Solioz. 2010. Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4099-4101.
- Montenegro J., S. Abarca. 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. En: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE – FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 334 p.
- Morales, S. M. S. 2005. Role of ionized calcium and magnesium in cellulose degradation by ruminal bacteria. PhD Dissertation. Ohio State University, OH, USA. 180 p.
- Morrison, M., R. M. Murray., A. N. Boniface. 1990. Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor quality tropical grass hay supplemented with sulphate. *J. Agri. Sci. Camb.* 115: 269-175.
- Moss, A. J., D. I. Givens. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, *in Sacco* degradability rumen fermentation and methane production in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 127-143.
- Moss, A. R., J. P. Jouany., J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants its contribution to global warming. INRA, EDP Sciences, *Ann. Zootech.* 49:231-253.
- Muñoz, C., T. Yan., D. A. Wills., S. Murray., A. W. Gordon. 2012. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3139–3148

- Murray, R. M., A. M. Bryant., R. A. Leng. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* 36:1–14.
- Nagaraja, T. G., C. J. Newbold., C. J. Van Nevel., D. I. Demeyer. 1997. Manipulation of Ruminant Fermentation. *In: The Rumen Microbial Ecosystem*, Hobson, P. N. and Stewart, C. S. (Eds.). Blackie Academic & Professional, London, pp. 588-593.
- National Research Council. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. Washington D. C.: National Academic Press. 234 p.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requeriments of Dairy Cttle, 7<sup>th</sup> Ed. *Natl. Acad. S ci.* Washigton, D. C.
- Nikolić, J. A., Jovanović, M., Andrić, R., Djordjević, D., Krsmanović, J. 1983. Examination of the effect of copper and molybdenum on microbial protein synthesis in rumen contents using 35S. *J. Appl. Radiat. Lost.* 34(5) 809-812.
- Noguera, R. R., D. M. Ortiz., N. Gallego. 2011. Comparación de líquido ruminal vacuno y caprino como fuente de inóculo en la técnica in vitro de producción de gases. *Livestock Research for Rural Development.* 23(11) June 20, 2014, from <http://www.lrrd.org/lrrd23/11/nogu23225.htm>
- NOM-062-ZOO-1999. Diario oficial. Especificaciones técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Norma Oficial Mexicana; 2001.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 2000. (7th Ed. Update). National Research Council. National Academy of Press, Washington, D.C. EEUU.

- Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. J. Gen. Microbiol. 91: 249–262.
- Orpin, C. G. 1977. The rumen flagellate *Piromonas comminis*. Its life-history and invasion of plant material in the rumen. J. Gen. Microbiol. 99: 107-117.
- Orskov E. R., I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Res. (Cambridge); 92: 499–503.
- Pécou, E., A. Maass., D. Remenik., J. Briche., M. Gonzalez. 2006. A mathematical model for copper homeostasis in *enterococcus hirae*. Mathematical Biosciences. 203:222–239.
- Posada, S. L., L. A. Giraldo., D. M. Bolívar. 2005. Estimación de la síntesis de proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de derivados púricos. Livestock Research for Rural Development. 17(6): <http://www.lrrd.org/lrrd17/6/posa17063.htm>. Consultado el 28 de junio de 2014.
- Ramírez, P. A. H., F. Meschy. 2005. Requerimiento de fósforo de los microorganismos ruminales: una revisión. Interciencia. 30: 664-670.
- Rapetti, L., L. Bava. 2008. Feeding Management of Dairy Goats in Intensive Systems. In: Dairy Goats Feeding and Nutrition. Pulina G, Cannas A. (eds.) CAB International, Wallingford, UK. pp 221-237.
- Rensing, C., G. Grass. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiol. Rev. 27:197-213.

- Rodríguez, B. T. 1995. Factores de la dieta que afectan la actividad ureásica ruminal en ovinos alimentados con forraje de baja calidad”. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires, Argentina. 83 p.
- Rutagwenda, T., T. M. Lechner-Doll., H. J. Schwartz., W. Schultka., W. Von Engelhardt. 1990. Dietary preference and degradability of forage on a semi-arid thorn bush savannah by indigenous ruminants, camels and donkeys. *Animal Feed Sci. Technol.*31:179-192.
- Santo E. C., D. Quaranta., G. Grass. 2012. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiologyopen* 1:46–52.
- Santo E. C., E. W. Lam., C. G. Elowsky., D. Quaranta., D.W. Domaille., C. J. Chang., G. Grass. 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:794–802.
- Santo E. C., N. Taudte., D. H. Nies., G. Grass. 2008. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:977-986.
- Santo E. C., P. V. Morais., G. Grass. 2010. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1341-1348.
- Santo, E. C., E. W. Lam., G. C. Elowsky., D. Quaranta., D. W. Domaille., C. J. Chang., G. Grass., 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appli. Environm. Microbiol.* 77(3): 749-802.

- Santra, A., S. A. Karim. 2003. Rumen manipulation to improve animal productivity. *Asian Australasian J. Anim. Sci.* 16: 748-763.
- SAS. 2002. SAS Copyright by SAS institute Inc., Cary, NC, USA. SAS. Proprietary Software Version 9.00 (TS M0) Licensed to SUNY AT STONY BROOK, Site 0013402001. USA.
- Simpson, M., A. Svetlana., Kocherginskaya., I. Roustam., Aminov, L. T. Skerlos., T. M. Bradley., R. I. Mackie., B. A. White. 2002. Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species. *Society for integrative and comparative biology.* 42: 327-331.
- Solaiman, S. G., T. J. Jr. Craig., G. Reddy., C. E. Shoemaker. 2007. Effect of high levels of Cu supplement on growth performance, rumen fermentation, and immune responses in goat kids. *Small Ruminant Research* 69: 115–123.
- Sprinkle, J. E., S. P. Cuneo., H. M. Frederinck., R. M. Enns., D. W. Schafer., G. E. Carstens., S. B. Daugherty., T. H. Noon., B. M. Rickert., y C. Reggiardo. 2006. Effects of a long-acting, trace mineral, reticulo-rumen bolus on range cow productivity and trace mineral profiles. *J. Anim. Sci.* 84: 439-1453.
- Stewart C. S. 1991. The rumen bacteria. In: Jouany, JP. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA editions, Paris, France; 15-26.
- Suttle, N. F. 1987. The absorption, retention and function of minor nutrients. *In:* Hacker, J. B. and Ternouth, J. H. (Eds). *The Nutrition of Herbivores.* Academic Press. Australia. pp 333-362.

- Teather, R. M., R. J. Forster. 1998. Manipulating the rumen microflora with bacteriocins to improve ruminant production. *Can. J. Anim. Sci.* 78 (Sup).
- Teather, R. M., R. J. Forster. 1998. Manipulating the rumen microflora with bacteriocins to improve ruminant production. *Can J Anim Sci* 78, 57–69.
- Throne M., A. Bach., M. M. Ruiz., S. D. Stern., J. G. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livestock Science.* 124: 261 – 265.
- Tian W. X., S. Yu., M. Ibrahim., A. W. Almonaofy., L. He., Q. Hui., Z. Bo., B. Li., G. L. Xie. 2012. Copper as an antimicrobial agent against opportunistic pathogenic and multidrug resistant *Enterobacter* bacteria. *J. Microbiol.* 64:345-354.
- Tiffany, M. E., V. Fellner., J. W. Spears., 2006. Influence of cobalt concentration on vitamin B<sub>12</sub> production and fermentation of mixed ruminal microorganisms grown in continuous culture flow-through fermenters. *J. Anim. Sci.* 84: 635-640.
- UE. 2004. List of the authorised additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. Disponible en URL: <[http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2004/c\\_050/c\\_05020040225es00010144.pdf](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2004/c_050/c_05020040225es00010144.pdf)>. Consultado el 3 de diciembre de 2013.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca, N.Y., Cornell University Press.
- Van. K. S. J., B. Rusell. 1996. The effect of pH of ruminal methanogenesis. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 20: 205-210.

- Wang, R. L., Z. Wei., X. P. Zhu., J. H. Zhi. 2010. Influence of different ratios of cobalt and copper supplementation on vitamin B12 status and nutrient utilization in sheep. *Agricultural Sci. in China*. 9(12): 1829-1835.
- Ward, J. D., J. W. Spears., E. B. Kegley. 1996. Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulphate in cattle. *J. Dairy Sci*. 79: 127-132.
- Weaver L., J. O. Noyce., H. T. Michels., C. W. Keevil. 2010. Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol*. 109:2200–2205.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science* 76, 3114–3122.
- Wright, A.G., A. V. Klieve, 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Sci. Technol*. 166: 248-253.
- Yocoyama, M. T., K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. *In: El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. C. D. Church (Ed.). Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. Pp 137-157.
- Yokoyama, M. T., K. A. Johnson. 1993. Microbiología del rumen e intestino delgado. *In: Church, D. C. (ed). El Rumiante, Fisiología y Nutrición*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp: 137-157.
- Yuan, W. P., S. G. Liu., G. S. Zhou., G. Y. Zhou., L. L. Tieszen., D. Baldocchi. 2007. Deriving a light use efficiency model from eddy covariance flux data for predicting daily gross primary production across biomes. *Agricultural and Forest Meteorology*. 143, 189–207

Zevenhuizen, L. P. T. M., J. Dolfing., E. J. Eshuis., I. J. Scholten-Koerselman. 1979. Inhibitory Effects of copper on bacteria related to the free Ion concentration. *Microbial Ecology*. 5:139-146.

Zhang, W., R. Wang., X. Zhu., O. D. Kleemann., C. Yue., Z. Jia. 2007. Effects of dietary copper on ruminal fermentation, nutrient digestibility and fibre characteristics in cashmere goats. *J. Anim. Sci.* 20(12):1843-1848.