



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

CONCENTRACIÓN ÓPTIMA Y TÓXICA DE COBRE PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS RUMINALES

DANIEL CERVANTES GÓMEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.

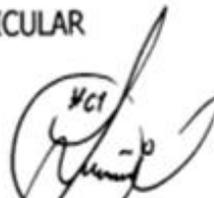
2012

La presente tesis titulada: **Concentración óptima y tóxica de cobre para el crecimiento de bacterias ruminales**, realizada por el alumno: **Daniel Cervantes Gómez**, bajo la dirección del Consejo Particular Indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

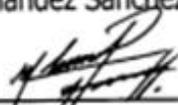
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR



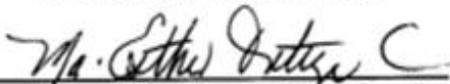
Dr. Mario Antonio Cobos Peralta

ASESOR



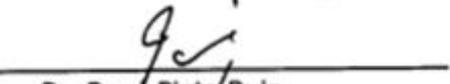
Dr. Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



Dra. María Esther Ortega Cerrilla

ASESOR



Dr. René Pinto Ruiz

Montecillo, Texcoco, Edo, de México, Julio de 2012

CONCENTRACIÓN ÓPTIMA Y TÓXICA DE COBRE PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS RUMINALES

Daniel Cervantes Gómez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN

El cobre (Cu) es un micromineral que cumple funciones esenciales en el organismo de los animales; del mismo modo es necesario para las bacterias ruminales, implicando que todos los nutrientes que requieren los microorganismos, dentro de estos el cobre, deben estar disponibles en el rumen en forma estable y continúa para asegurar su crecimiento. Por lo anterior, en el presente estudio se desarrollaron dos ensayos experimentales para determinar la concentración óptima y tóxica de cobre, con base al crecimiento y la actividad de las bacterias ruminales; en el primer experimento se utilizaron seis concentraciones de cobre (0, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm), en un medio de cultivo que contenía heno de alfalfa. Los resultados de este ensayo mostraron que las concentraciones de cobre evaluadas no afectaron ($p > 0.05$) el pH y la producción de AGV; sin embargo, la población de bacterias totales disminuyó ($p < 0.05$) con el aporte de 40 ppm de Cu a las 72 h de incubación. Estos resultados, no permitieron evidenciar con claridad cual es la cantidad óptima y tóxica de cobre en el crecimiento bacteriano. El segundo experimento se incrementaron las concentraciones de cobre: Testigo 0, tratamientos de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Hubo una disminución ($p < 0.05$) de 20 y 55 % en la población total de bacterias, de 23.5 y 23 % en la digestibilidad *in vitro* de MO, y de 29 y 37 % en la producción total de AGV, con cantidades de 80 y 100 ppm de cobre. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la cantidad óptima de Cu para las bacterias ruminales se encuentra entre 40 a 60 ppm, y la concentración tóxica es de 80 ppm o más.

Palabras clave: Cobre, concentración óptima y tóxica, bacterias ruminales, digestibilidad *in vitro*.

OPTIMAL AND TOXIC COPPER CONCENTRATION FOR RUMINAL BACTERIAL GROWTH

Daniel Cervantes Gómez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2012

ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential mineral that support animal body functions, in the same way, is essential for rumen bacteria growth, implying that all the minerals needed by microbes, including copper, should be available at the rumen in a stable and continues concentration to ensure its growth. Therefore, in the present study, two assays were developed to determine the optimal and toxic copper level, based on ruminal bacterial growth and their activity; in the first trial six copper levels (0, 10, 20, 30, 40 and 50 ppm) were evaluated, using a culture medium containing alfalfa hay. Copper treatments didn't affect ($p>0.05$) pH and VFA production in the first trial; however, total bacterial population decrease ($p<0.05$) at 72 h of incubation, when the culture medium contain 40 ppm Cu; but these preliminary results didn't explain clearly the optimal and toxic copper level on bacterial growth. Therefore in the second assay, copper levels were increased from 0, 20, 40, 60, 80, to 100 ppm, make evident a decrease ($p<0.05$) of 20 and 55 %, 23.5 and 23 %, 29 and 37 % on total bacterial population, OM *in vitro* digestibility, and VFA total production, with 80 and 100 ppm Cu, respectively. These results suggest that optimum copper level for rumen bacterial growth is observed between 40 to 60 ppm, and the toxic concentration occurs at 80 ppm or higher.

Key words: Copper, optimal and toxic concentration, ruminal microbes, *in vitro* digestibility.

DEDICATORIA

A dios:

Por darme la oportunidad de vivir cada día y ser mi guía en el camino del bien, brindarme salud, fortaleza, dedicación para realizar mis proyectos y cumplir mis metas, nunca te alejes de mí y de las personas que te aman.

A mi Padre:

Sr. Demetrio Cervantes Contreras por orientarme en el camino de la vida.

A mis hermanas:

Elizabeth y María de los Ángeles, por todos aquellos momentos felices en los que nos hemos reunido, por su gran apoyo y fortaleza en tiempos difíciles de nuestra vida y que esos lazos nunca se rompan.

A mis hermanos:

Rodrigo y Andrea que comienzan sus primeros pasos.

A mis abuelos:

Manuela Contreras†, Camilo Cervantes, María Guadalupe Ávila† y Heriberto Gómez†, donde quiera que estén siempre los extraño.

A mi familia:

A mi tío Miguel Cervantes que ha sido una inspiración para seguir en el camino de la superación académica y personal, así como a toda mi familia (tíos, tías y primos).

Dios concédeme *serenidad* para aceptar las cosas que no puedo cambiar, *Valor* para cambiar las cosas que si puedo cambiar y *Sabiduría* para reconocer la diferencia.

Reinhold Niebuhr

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me otorgo para poder continuar mis estudios y así poder obtener el grado de Maestro en Ciencias. Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar mi estudio de maestría en esta institución. Así también a la LPI 5, Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal y a la LPI 11, Sistemas de Producción Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola y Pesquera.

Al **Dr. David Hernández Sánchez** por el apoyo, orientación, amistad y confianza que me brindo, durante mi estancia en el colegio de postgraduados y fuera de este. Al **Dr. Mario A. Cobos Peralta** por compartir sus conocimientos en el área de Microbiología Ruminal para la culminación de esta investigación, además de su apoyo, tiempo y amistad que me brindo. Al **Dr. Efrén Ramírez Bribiesca** por sus consejos y orientación que me brindo para la realización exitosa de esta investigación, así como la amistad que me brindo. A la **Dra. María E. Ortega Cerrilla** por sus valiosos conocimientos y ser guía en mi formación académica. Al **Dr. René Pinto Ruiz** por sus valiosas sugerencias hacia esta investigación. A la **Dra. María Magdalena Crosby Galván** por las facilidades que me otorgo para los análisis de laboratorio.

A todos aquellos profesores que me brindaron su amistad y conocimientos durante la Maestría.

Al Sr. Agustín Hernández, jefe de laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana por su apoyo, experiencia y amistad brindada, así como Sr. Anastasio jefe de laboratorio de Nutrición Animal y su auxiliar Jorge.

A mis amigos y compañeros que me brindaron ánimos y apoyo durante mi estancia en el postgrado: Rosy, Raymundo, Mónica, Elías, Guadalupe, Felipe, Manuel Domínguez, Omar, Mayra, Sergio, Ulises, Claudia, Alejandra, Liberia, Manuel Balam, Dr. Alberto, Dr. José, MVZ. Víctor Bonilla, MVZ. Sergio, Sra. Josefina, Sr. José y familia.

A Hortencia Barragán; obstáculos en la vida se presentan continuamente, lo más importante es no dejar que nos derroten.

A todo el personal de apoyo del área de ganadería y biblioteca por su amistad y eficiencia en su trabajo: Verónica, Celsa, Guadalupe, Ana luisa, Leticia, Jacinto.

“MUCHAS GRACIAS”

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	lii
ABSTRACT.....	lv
ÍNDICE DE CUADROS.....	Xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Disponibilidad de cobre en el organismo animal.....	3
2.2. Suplemento de cobre en rumiantes.....	4
2.3. Concentraciones de cobre en el organismo de los rumiantes	5
2.4. Características fisicoquímicas del rumen.....	6
2.5. Absorción del cobre en rumiantes.....	8
2.6. Metabolismo del cobre.....	9
2.7. El cobre en la circulación sanguínea.....	10
2.8. Homeostasis celular del cobre.....	12
2.9. Efecto del cobre sobre la disponibilidad de las proteínas.....	15
2.10. Mecanismos bacterianos de captación, absorción y excreción del cobre.....	16
III. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21

5.1.	Primer ensayo. Exploración de la tendencia del crecimiento microbiano en un medio de cultivo <i>in vitro</i> , con cantidades crecientes de cobre, en el intervalo de 0 a 50 ppm.....	21
5.1.1.	Elaboración del medio de cultivo.....	23
5.1.2.	Inoculación y periodo de incubación.....	24
5.1.3.	Variables de respuesta.....	24
5.1.3.1.	pH del medio de cultivo inoculado.....	24
5.1.3.2.	Concentración de bacterias totales.....	24
5.1.3.3.	Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).....	25
5.1.4.	Diseño experimental.....	25
5.2.	Segundo ensayo. Crecimiento y actividad microbiana en un medio de cultivo <i>in vitro</i> , con cantidades crecientes de 0 a 100 ppm de cobre, que permitan determinar la concentración óptima y tóxica de éste mineral en bacterias ruminales.....	27
5.2.1.	Elaboración del medio de cultivo anaerobio.....	28
5.2.2.	Inoculación e incubación de medios y montaje del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	28
5.2.3.	Preparación de trampas de solución salina saturada.....	29
5.2.4.	Variables de respuesta.....	30
5.2.4.1.	Concentración de bacterias totales.....	30
5.2.4.2.	pH del medio de cultivo inoculado.....	30
5.2.4.3.	Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).....	31
5.2.4.4.	Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	31
5.2.4.5.	Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	32
5.2.4.6.	Determinación de la producción de biogás total, CH ₄ y CO ₂	32
5.2.5.	Diseño experimental.....	33

VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1.	Primer ensayo. Exploración de la tendencia del crecimiento microbiano en un medio de cultivo <i>in vitro</i> , con cantidades crecientes de cobre, en el intervalo de 0 a 50 ppm.....	34
6.2.	Segundo ensayo. Concentración y actividad microbiana en un medio de cultivo <i>in vitro</i> , con cantidades crecientes de 0 a 100 ppm de cobre, que permitan determinar la concentración óptima y tóxica de este mineral en bacterias ruminales.....	38
6.2.1.	Concentración bacteriana.....	38
6.2.2.	pH del medio de cultivo inoculado.....	40
6.2.3.	Ácidos grasos volátiles (AGV).....	41
6.2.4.	Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	45
6.2.5.	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (MS).....	46
6.2.6.	Determinación de la producción de biogás total, CH ₄ y CO ₂	47
VII.	CONCLUSIÓN.....	51
VIII.	LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Concentraciones recomendadas de cobre en rumiantes...	3
Cuadro 2. Requerimientos de microelementos (ppm) para los microorganismos ruminales y rumiantes.....	5
Cuadro 3. Características fisicoquímicas del rumen.....	7
Cuadro 4. Tratamientos (T) experimentales del ensayo 1.....	22
Cuadro 5. Medio de cultivo anaerobio utilizado en el experimento...	23
Cuadro 6. Tratamientos (T) experimentales del ensayo 2.....	27
Cuadro 7. pH, concentración de bacterias totales y ácidos grasos volátiles en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cobre después de 72 h de incubación	34
Cuadro 8. Concentración (mM) de ácido acético, propiónico y butírico en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cobre.....	37
Cuadro 9. Concentración de bacterias totales en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.....	39
Cuadro 10. pH de medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre al inicio y al final de la incubación	41
Cuadro 11. Concentración de AGV en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cobre, al inicio y final de la incubación.....	42
Cuadro 12. Proporción de ácido acético, propiónico y butírico en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.....	44
Cuadro 13. Concentración de nitrógeno amoniacal en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.....	45
Cuadro 14. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) de materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO) con diferentes cantidades de cobre.....	47

Cuadro 15.	Biogás total acumulado (mL^{-1}) por la fermentación en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.....	48
Cuadro 16.	Proporción de CH_4 y CO_2 producidos en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Antagonismo y sinergismo entre minerales.....	10
Figura 2. Rutas metabólicas del cobre.....	12
Figura 3. Entrada de cobre a la célula a través de la membrana plasmática.....	14
Figura 4. Mecanismo de interacción entre la bacteria y el cobre.....	18
Figura 5. Sistema para captar biogás.....	29
Figura 6. Concentración de bacterias totales y AGV en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.....	36

I. INTRODUCCIÓN

El 65 % de la materia orgánica de la dieta es fermentada en el rumen (Velásquez y Pichard, 2010) y la energía es liberada en forma de ácidos grasos volátiles (51.6 %), proteína microbiana (29.9 %), metano (11.6 %) y calor (6.9 %). La actividad microbiana proporciona hasta 85 % de la energía en forma de ácidos grasos volátiles y de 50 a 90 % de la proteína digestible para el animal (Aguerre *et al.*, 2011) por tanto, es importante proporcionar a los microorganismos del rumen los nutrientes necesarios para lograr la máxima eficiencia en su crecimiento, lo que se refleja en el mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta por parte de los animales. Los microorganismos tienen alta tasa de crecimiento, de tal manera que algunos duplican su población en minutos (Wang *et al.*, 2010). Esto implica que todos los nutrientes que requieren los microorganismos deben estar disponibles en el rumen en forma estable y continua para asegurar su óptimo crecimiento (Hasman *et al.*, 2009).

De acuerdo a Durand y Kawashima (1980), los requerimientos minerales de los microorganismos del rumen son similares o incluso mayores que los del rumiante.

Santo *et al.* (2011) mencionan al cobre como un metal de transición capaz de existir entre dos estados de oxido-reducción, oxidado (Cu^{2+}) y reducido (Cu^{1+}). Esta capacidad para aceptar o donar electrones lo convierte en un cofactor enzimático muy eficiente, pero ese tipo de reacción también puede convertirlo un metal tóxico. Una concentración de sulfato de cobre en líquido ruminal de 0.11 a

1.3 mg L⁻¹ estimula la desaminación y utilización de carbohidratos para la síntesis de proteína microbiana (Nikolić *et al.*, 1983). En otro estudio, Pécou *et al.* (2006) observaron incrementos en el crecimiento bacteriano al suplementar cantidades de cobre inferiores a 0.5 mM en el medio de cultivo, indicando que este mineral entra a la célula por medio de transportadores de cationes; sin embargo, aún se desconocen muchos detalles de este mecanismo de transporte, sólo se sabe de los procesos de captación, almacenamiento intracelular y flujo de salida del cobre. Pécout *et al.* (2006) también reporta dosis mayores a 0.5 mM de cobre, propiciando proteólisis celular (Lu y Solioz, 2001).

Desafortunadamente, la literatura no reporta trabajos que indiquen las concentraciones óptimas y tóxicas de cobre para las bacterias ruminales. El objetivo del trabajo plantea obtener indicadores que permitan establecer las concentraciones óptimas de cobre para las bacterias ruminales, que contribuyan en optimizar la actividad microbiana en el rumen y la eficiencia alimenticia de los animales para producción de carne y leche.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Disponibilidad de cobre en el organismo animal

El cobre (Cu) es requerido para la síntesis de hemoglobina, absorción y movilización de hierro. El cobre es componente de varios sistemas enzimáticos que actúan en el sistema nervioso central, participa en el metabolismo del tejido óseo y tejido conectivo, síntesis de melanina, y el funcionamiento del músculo cardíaco (Balbuena *et al.*, 2003). También previene trastornos fisiológicos provocados por deficiencia del mineral como anemias, falta de crecimiento, pelo o lana irsuta, y anormal, ataxia neonatal (Nikolić *et al.*, 1983).

Cuadro 1. Concentraciones recomendadas de cobre en rumiantes

Especie	Requerimientos de cobre mg kg ⁻¹ MS	Concentraciones máximas tolerables de cobre mg kg ⁻¹ MS
Bovinos productores de leche	12-15.7	40
Bovinos productores de carne	10	100
Ovinos	4.6-8.6	25- 35

NRC, (1985); NRC, (2000); NRC, (2001).

La disponibilidad del cobre en rumiantes depende de la cantidad consumida en la dieta, además de estar condicionada por variaciones en la microflora del rumen; otros factores que influyen en su absorción y aprovechamiento son la raza y edad del animal, la composición del suelo, composición de la ración, así como las variaciones en la absorción intestinal (Nederbragt *et al.*, 1984)

2.2. Suplemento de cobre en rumiantes

El sulfato de cobre (CuSO_4) es la principal fuente de cobre en animales domésticos. También se usa el óxido de cobre (CuO); sin embargo, esta fuente es no es recomendable en rumiantes (Spears, 2003; Spears *et al.*, 2004), salvo por el uso reciente de bolos intraruminales a base de óxido, siempre y cuando la concentración de antagonistas como el molibdeno y el azufre en la dieta sea baja. Se debe evitar la adición en exceso de sulfato de cobre en la dieta, ya que, resultaría muy caro; así mismo, se debe considerar que los animales excretarán más cobre a través de las heces creando un problema de contaminación ambiental (Baker y Ammerman 1995; Sprinkle *et al.*, 2006). También se ha documentado que excesos de cobre generan problemas en la absorción de zinc (Engle y Spears, 2000).

El cobre es esencial en el potencial de modificación de patrones de fermentación ruminal; no obstante, se deben conocer los requerimientos y tolerancia por los microorganismos del rumen, así como para el animal hospedador. Ya que los microorganismos ruminales tiene requerimientos propios. El Cuadro 2 menciona los requerimientos en medios *in vitro* para los microorganismos ruminales (Arelovich, 2008).

Cuadro 2. Requerimientos minerales (ppm) para microorganismos ruminales y rumiantes.

Elemento, ppm	Microorganismos ruminales		Animal hospedante	
	Optima	Tolerancia	Optima	Tolerancia
Boro	0-200	300	-	-
Cadmio	1-7	10	-	-
Cobalto	1-3	7	-	10
Cromo	1-3	10	10	1000
Cobre	0-0,1	1	-	50
Flúor	0-0,05	0,5	50	-
Hierro	2-5	100	0,5	1000
Iodo	20	>1000	20-40	50
Manganeso	5-30	100		1000
Molibdeno	10-200	>500		5
Niquel	0-0,1	0,5	-	50
Selenio	0-0,1	7	0,10	2
Zinc	3-10	20	30-40	500

Martínez *et al.* (1970); NRC (2001); Arelovich *et al.* (2008).

Vacas Holstein y Jersey suplementadas con 80 mg de cobre kg⁻¹MS acumularon cobre en hígado de 6.4 µg y 7.5 µg Kg MS respectivamente, siendo un indicativo que las vacas Jersey son relativamente más susceptibles a la adición de cobre Holstein (Engle y Spears, 2000).

2.3. Concentraciones de cobre en el organismo de los rumiantes

El requerimiento adecuado de cobre en el organismo animal puede hacerse mediante la medición de cobre en plasma o suero sanguíneo. Los valores de referencia para el cobre plasmático en bovinos son de 8 a 11 mM L⁻¹ (70-120 µg dL⁻¹). Algunos autores mencionan en cabras de 8 a 24 mM L⁻¹ (50 y 150 µg dL⁻¹; Rocha *et al.*, 2001). Sin embargo, este método es poco confiable, debido a que los animales con deficiencia de cobre pueden tener cupremia dentro del rango normal

de cobre plasmático, ya que los tejidos en donde normalmente se acumula el mineral, continúan enviando sus reservas de cobre a la circulación (Rocha y Bouda, 2001).

Asimismo, animales con intoxicación crónica por cobre pueden tener una acumulación excesiva de cobre principalmente en el hígado y la cantidad sérica puede encontrarse en los rangos de referencia (Gooneratne *et al.*, 1989). En hígado, se encuentra la mayor parte de acumulación de cobre (92 %) y el resto se distribuye en, tejido muscular (2.9 %), en leche (3.5 %) y en orina (1.5 %). La eficiencia que tiene el cobre para acumularse en hígado es de 0.7 % con respecto al cobre proveniente de la dieta (Forbes y Simonds, 1993; Engle y Spears, 2001). El cobre contenido en el hígado de bovinos 0.87 ± 0.41 %, es excretado en la bilis y alrededor del 1 % en la orina (Koenig *et al.*, 1997).

2.4. Características fisicoquímicas del rumen

El rumen es la principal cámara de fermentación, en donde se encuentran en simbiosis, microorganismos ruminales como bacterias, protozoarios y hongos, dentro de estos, los más importantes por su manipulación son las bacterias (Cobos, 2007), estas sintetizan la mayor cantidad de sustratos energéticos como los AGV y además proporcionan proteína microbiana al ser arrastradas a través de omaso, abomaso e intestino, en donde se digiere su proteína y se absorben como los aminoácidos libres que son utilizados para la síntesis de proteína animal (Karsli y Russell, 2000).

Las bacterias, protozoarios y hongos junto con el animal huésped generan un ambiente ruminal con características fisicoquímicas (ver cuadro 3) que favorecen la actividad de los microorganismos ruminales. Entre las bacterias más importantes del rumen se encuentran diferentes especies que, con base a su principal actividad degradativa, se clasifican en amilolíticas, hemicelulolíticas, proteolíticas, ureolíticas, metanogénicas, utilizadoras de amonio, de lípidos y de ácido orgánicos (Cobos, 2007).

Cuadro 3. Características fisicoquímicas del rumen

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

Cobos, 2007.

Debido al papel que juegan los microorganismos ruminales en la degradación de la pared celular de los forrajes y a que la proteína microbiana es de alto valor biológico, las dietas de los rumiantes deben formularse para permitir

el crecimiento de los microorganismos ruminales; en este sentido, la adición de cobre permitirá contribuir al crecimiento de la población bacteriana, favoreciendo la fermentación de los componentes de la dieta y reflejándose una mayor productividad del animal (Simpson *et al.*, 2002).

2.5. Absorción del cobre en rumiantes

En los rumiantes la absorción del cobre es baja (1.0 a 10 %), atribuido a la formación de complejos en rumen (Spears, 2003). Además una alta concentración dietaria de molibdeno y concentraciones medias de azufre, resultan en una reducción en la absorción de cobre, lo que ocurre principalmente debido a la formación de tiomolibdatos en el rumen. En presencia de azufre y ausencia de molibdeno, hay una inhibición en la absorción de cobre debido a la formación de sulfidos de cobre (Sprinkle *et al.*, 2006). Es sabido que la presencia de sulfatos en agua de bebida reduce la absorción de cobre. Por su parte, el hierro es otro elemento que puede interferir con la absorción del cobre; en este sentido Baker y Ammerman (1995) y Spears *et al.* (2004) reportaron frecuentemente que los animales están expuestos a consumo de hierro a través del agua, suelo o alimentos. La deficiencia de cobre es bastante común en el mundo, y a excepción del fósforo, la deficiencia de cobre es la principal limitante en zonas tropicales (Sprinkle *et al.*, 2006).

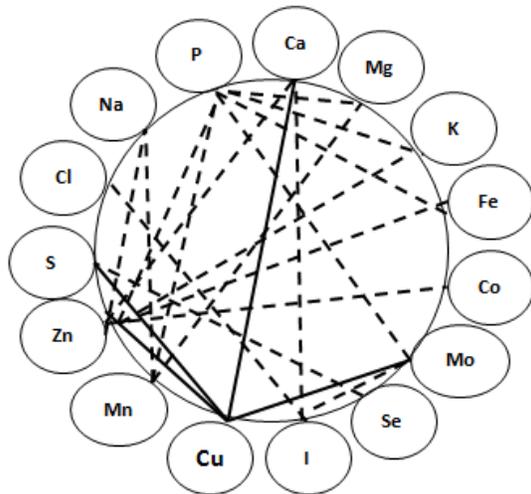
2.6. Metabolismo del cobre

En rumiantes, la absorción del cobre se lleva a cabo principalmente en el duodeno, y yeyuno, en menor proporción en íleon; mientras que en ovinos la mayor absorción ocurre en el intestino grueso. El cobre es absorbido por transporte activo, (mecanismo saturable), y por difusión simple, (mecanismo insaturable) (Chicco y Godoy, 2005). El paso del cobre a través del enterocito es por transporte activo y se ve influenciado por aminoácidos, ácido ascórbico, y otros factores de la dieta; una vez que se encuentra dentro de las células de la mucosa, aproximadamente el 80 % del cobre absorbido se liga y regula por concentraciones de metalotiónina (Baker y Amermann, 1995). Estas proteínas son de bajo peso molecular e intervienen en muchas funciones incluyendo la homeostasis, el almacenamiento, el transporte y la desintoxicación de metales. Tras el paso por los enterocitos, el cobre entra en la circulación, uniéndose a proteínas transportadoras, péptidos, aminoácidos para su transporte a hígado, y en menor proporción al riñón (Fuentealba y Aburto, 2003).

La absorción intestinal máxima del cobre es de 30 a 60 %, y es un elemento esencial para la formación de hemoglobina (Prohaska, 1991).

Chicco y Godoy (2005) mencionan al cobre como un micromineral que tiene más antagonistas que otros microelementos, entre los principales están el molibdeno, zinc y calcio; en la Figura 1 se muestran las interacciones entre el cobre y algunos minerales.

Principales relaciones antagonicas entre minerales



Principales relaciones sinérgicas entre minerales

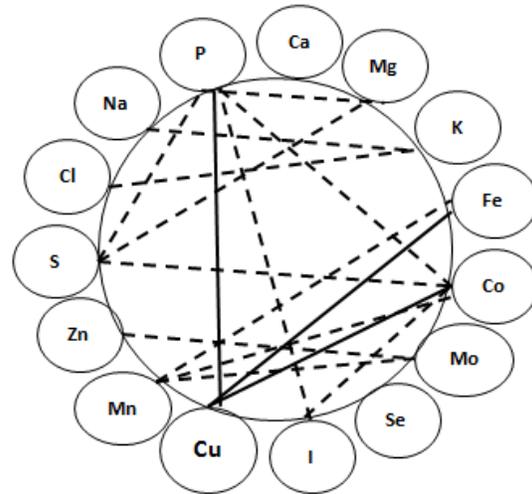


Figura 1. Antagonismo y sinergismo entre minerales (Forbes *et al.*, 1993; McDonald *et al.*, 1995).

2.7. El cobre en la circulación sanguínea

Kebreab y Vitti (2005) mencionan una reserva central de cobre donde se genera un intercambio de este mineral a distintos ritmos de movilización. Esta reserva es el plasma sanguíneo, el cual recibe el cobre procedente del tubo digestivo y lo distribuye a los compartimentos de fácil o difícil movilización, como son los riñones y la leche, o bien lo retorna al tubo digestivo (Mattioli y Rosa, 2002). Sin embargo, la alteración de la homeostasis normal del cobre o la acumulación de cobre en exceso a los requerimientos metabólicos pueden causar a una toxicidad. La intoxicación por cobre se clasifica como primaria cuando resulta de un defecto metabólico hereditario, y secundaria cuando es la

consecuencia de un consumo elevado de este mineral o un aumento en la absorción o reducción de la excreción de cobre debido a procesos patológicos (Fuentealba y Aburto, 2003). La cantidad de cobre en suero sanguíneo de bovinos oscila entre 17 y 27 μM , y se une a albuminas llamadas transcupreína, macroglobulina y ceruplasmina, siendo esta última la que más se acopla al cobre (70 %) y se relaciona con una variedad de enzimas para el funcionamiento de factores de coagulación (Cater y Mercer, 2005).

El hígado es el depósito inicial de cobre recién absorbido y la mayor parte de este elemento es secretado en plasma unido a la ceruplasmina o se secreta en la bilis. Así parece que la distribución de cobre en los tejidos extrahepáticos involucra una serie de moléculas, que intervienen para una distribución eficaz del cobre en el organismo (Arredondo y Nuñez, 2005).

La Figura 2 muestra las rutas metabólicas del movimiento del cobre en el organismo de rumiantes. La letra "A" representa un compartimento de reserva del cobre en hígado, hay un intercambio con la sangre y la excreción de la bilis; "B" representa una reserva temporal para su incorporación a la ceruloplasmina, y C representa un compartimento de reserva a largo plazo (Forbes *et al.*, 1993; Kebreab y Vitti, 2005).

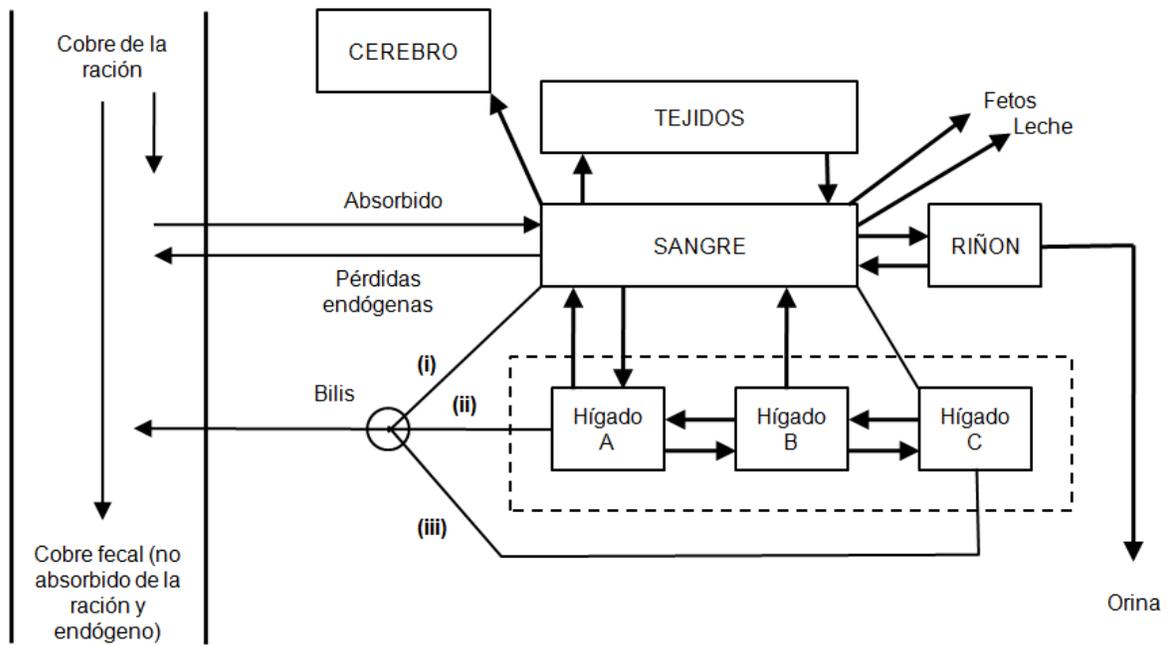


Figura 2. Rutas metabólicas del cobre (Forbes y Symonds, 1993).

2.8. Homeostasis celular del cobre

Todas las células tienen mecanismos para el paso de minerales a su interior. La medición es por enzimas específicas, sin que causen daño a los demás componentes celulares; se ha identificado una red de proteínas involucradas en el movimiento del cobre dentro y fuera de las células, y entre los compartimentos intracelulares. Estas proteínas, han sido identificadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se han estudiado ampliamente para identificar las proteínas clave que intervienen en el transporte del cobre celular, así como, su metabolismo celular (Casareno *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Arredondo y Nuñez, 2005). El cobre es un cofactor esencial en una serie de enzimas críticas del metabolismo, incluyendo superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), la citocromo c oxidasa (COX), la lisil oxidasa, y ceruloplasmina (CP). Si la deficiencia de cobre se

presenta, el transporte del hierro se verá afectado negativamente y este se acumulará en varios tejidos, dando como consecuencia una anemia microcítica hipocrómica (Carroll *et al.*, 2004).

La Figura 3 esquematiza la entrada de cobre a la célula mediada por la proteína CTR1, donde Cu^{2+} se reduce a Cu^{1+} por una reductasa, al entrar en la célula el cobre es distribuido por tres chaperonas, la chaperona de cobre (CCS), la citocromo oxidasa 17 (COX17) y la proteína de transporte de cobre (ATOX), la chaperona CCS ofrece el catión de la superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD), el COX17 distribuye al cobre en el citocromo c oxidasa en la mitocondria o al cobre ATPasa (ATP7A o ATP7B en función del tipo de célula) a la red trans Golgi (TNG) (Forbes y Cox, 2000). El cobre-ATPasa de la bomba de cobre en la TNG se incorpora al catión en cuproenzimas, secretada como la lisil oxidasa ATP 7 entre el TGN y la membrana plasmática, y el paso de ATP7B entre el TNG y el compartimiento vesicular post Golgi (Cater y Mercer, 2005). Si el cobre aumenta en las concentraciones intracelulares, el cobre-ATPasa se encuentra principalmente localizado en el compartimiento post Golgi, permitiendo el flujo celular o el secuestro vesicular de los cationes de cobre en exceso (Carroll *et al.*, 2004). Si el flujo de cobre ATPasa es insuficiente, estará mediado por proteínas citoplasmáticas llamadas metalotioneinas (MT) estas se unirán al exceso de cobre (Pena *et al.*, 1999; Fuentealba y Aburto, 2003).

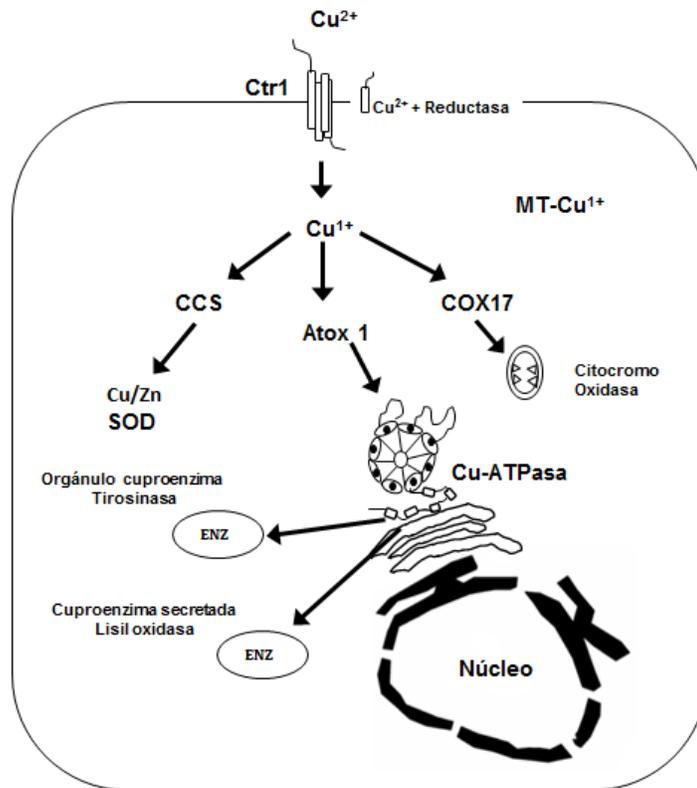


Figura 3. Entrada de cobre a la célula a través de la membrana plasmática (Cater y Mercer, 2005).

La ceruloplasmina (CP) es una α -2 globulina sintetizada en el hígado. Es una glucoproteína de PM 132.000 con 6 átomos de Cu por molécula y 7 a 8 % de hidratos de carbono (Harrison *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Sus funciones principales son el transporte de Cu desde el hígado a los tejidos, acción antioxidante, modulación de la respuesta inflamatoria, como proteína de fase aguda en infecciones o estrés, oxidación del Fe^{+2} para que éste pueda ser transportado hasta los tejidos hematopoyéticos por la transferrina y oxidación de aminas aromáticas (Mattioli y Rosa, 2002).

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima ampliamente distribuida por el organismo, posee un PM de 34.000 con dos átomos de Cu y dos de Zn por molécula. Así, como la CP es importante como antioxidante plasmático,

la SOD actúa como principal antioxidante intracelular (Qi *et al.*, 1993). Su función es inactivar los iones superóxidos con la producción de peróxido de hidrógeno y oxígeno. El peróxido de hidrógeno, aún tóxico, es inactivado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (Mattioli y Rosa, 2002).

Mattioli y Rosa (2002) describen al citocromo c oxidasa como un complejo que contiene los citocromos *a* y *a3* de la cadena respiratoria, posee dos átomos de Cu además de dos grupos hemo con sus respectivos átomos de Fe. Representa la enzima terminal de la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de cuatro electrones al O₂ para formar dos moléculas de agua y ATP. Su función para obtener energía hacen que la enzima sea vital para el animal (Harrison *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005).

2.9. Efecto del cobre sobre la disponibilidad de las proteínas

Las proteínas de la dieta son hidrolizadas en el rumen por enzimas microbianas dando lugar a compuestos nitrogenados más simples como péptidos, aminoácidos y amoníaco (Wallace, 1996). Los microorganismos ruminales que se encargan de degradar los carbohidratos estructurales con actividad celulolítica tienen una tasa de crecimiento muy lenta, por lo que requieren bajas cantidades de nutrientes para su mantenimiento; además utilizan el amoníaco como principal fuente de N (Russell *et al.*, 1992). Los microorganismos que degradan carbohidratos no estructurales y con actividad amilolítica tienen un alto nivel de crecimiento, por lo cual requieren además de amoníaco, otras fuentes de nitrógeno como, péptidos y aminoácidos para su síntesis de proteína (Bach *et al.*, 2008).

La producción de proteína microbiana es afectada por factores químicos, fisiológicos, características nutricionales e interacciones entre nutrientes, así como producción de AGV. Nikolić *et al.* (1983) mencionan que la adición de cobre en el medio ruminal disminuye la producción de AGV a concentraciones de 0.11 a 1.3 mg L⁻¹, estimula la descomposición de las proteínas, su desaminación y la utilización de hidratos de carbono para la síntesis de proteínas, y a concentraciones de 0.08 hasta 1.58 mg L⁻¹ se inhibe la digestión de la celulosa (Nikolić *et al.*, 1983; Qi *et al.*, 1993).

El efecto de ciertos minerales disminuyen o estimulan la actividad enzimática de la ureasa ruminal que requiere de nitrógeno para optimizar su actividad; sin embargo, la adición de Cu, Zn, Cd, Se, Ca, Co, Mn, Ba, y Mg en medio de cultivo *in vitro* disminuye la producción de NH₃ debido a la reducción de la ureolisis ruminal o al incremento en la utilización microbiana del NH₃ (Spears, 2003; Faixová *et al.*, 2006). Pero bajas concentraciones de cobre (0.383 ppm) estimula a las enzimas alanina amino-transferasa, aspartato amino transferasa, glutamato deshidrogenasa, y γ - glutamiltransferasa responsables de una elevada síntesis de aminoácidos a partir de N-NH₃ (Zanton *et al.*, 2007; Arelovich, 2008).

2.10. Mecanismos bacterianos de captación, absorción y excreción de cobre

Vargas *et al.* (1998) mencionan que los principales mecanismos de interacción que tiene las bacterias con algunos metales como el cobre, se realiza

mediante 1) precipitación extracelular de los iones tóxicos, por sustancias excretadas por las bacterias, 2) por unión de cationes metálicos en las cubiertas celulares basado en cargas negativas de los constituyentes de la pared celular, 3) acumulación intracelular mediante la unión de los metales a componentes citoplasmáticos, 4) las transformaciones redox que convierte algunos iones tóxicos en iones menos tóxicos, 5) sistemas de expulsión de membranas que impiden que se acumulen iones que perjudiquen a la bacteria (Cervantes y Gutiérrez, 1994; Lu y Solioz, 2001).

La Figura 4 esquematiza los mecanismos de interacción entre las bacterias y el cobre (Osman y Cavet, 2008). Este mineral es captado por porinas de la membrana externa, mediante las proteínas CupA y CupB el cobre es transportado hacia el interior de la célula y lo transfieren a las proteínas citoplasmáticas CupE y CupF, las cuales lo transportan a los sitios de síntesis de proteínas (Solioz y Styanov, 2003). El exceso de cobre es expulsado hacia el exterior de la célula mediante las proteínas CupC y CupD que funcionan como ATPasa (Vargas *et al.*, 1998; Puig y Thiele, 2002).

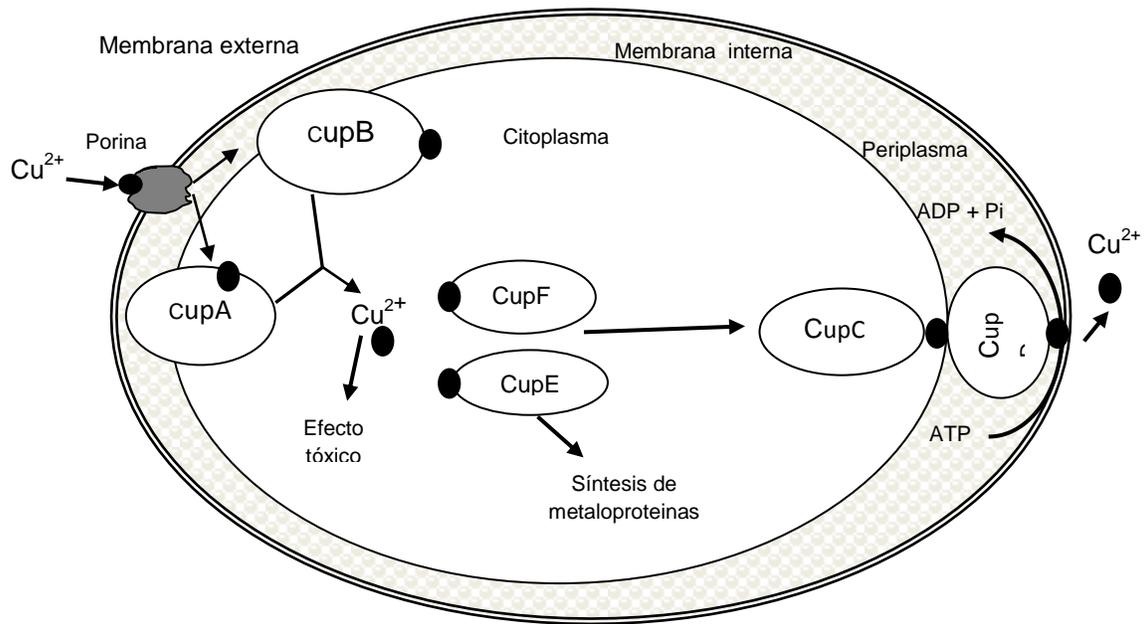


Figura 4. Mecanismo de interacción entre la bacteria y el cobre (Osman y Cavet, 2008).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la cantidad óptima y tóxica de cobre para las bacterias ruminales, evaluando cantidades crecientes del mineral en un medio *in vitro* y tomando como indicadores la concentración y la actividad bacteriana.

3.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y la población bacteriana en cultivos *in vitro* cuando se utilizan cantidades crecientes de cobre.
- Evaluar el efecto en la concentración de ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal y el pH en medios de cultivo *in vitro* adicionando diferentes cantidades de cobre.
- Cuantificar la cantidad de biogás total producido por la fermentación de bacterias ruminales a 24, 48 y 72 h, en medios de cultivo *in vitro* con diferentes concentraciones de cobre.

IV. HIPÓTESIS

Cantidades crecientes de cobre en cultivos *in vitro* aumentan la población y la actividad de las bacterias ruminales, reflejándose en incrementos de la digestibilidad, mayor producción de ácidos grasos volátiles y de biogás total.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al Postgrado en Ganadería, Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el Km 36.5 de la carretera México-Texcoco, Estado de México.

Para fines del presente trabajo se realizaron dos ensayos experimentales, el primero consistió en explorar la tendencia del crecimiento microbiano en un medio de cultivo *in vitro* con cantidades crecientes de cobre, en el intervalo de 0 a 50 ppm, y establecer si entre estos valores se encontraba la concentración óptima y tóxica del mineral, para las bacterias ruminales. Debido al resultado preliminar y no concluyente en el primer ensayo, en un segundo ensayo se amplió el intervalo, usando concentraciones entre 0 y 100 ppm de Cu.

5.1. Primer ensayo. Exploración de la tendencia del crecimiento microbiano en un medio de cultivo *in vitro*, con cantidades crecientes de cobre, en el intervalo de 0 a 50 ppm.

Se realizó un ensayo *in vitro*, utilizando un medio de cultivo anaerobio para bacterias totales (Cobos y Yokoyama, 1995) la respuesta sobre la concentración y actividad bacteriana fue evaluada utilizando seis concentraciones de cobre (0, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm; Cuadro 4), con tres repeticiones por tratamiento; los tiempos

de incubación fueron de 0 y 72 h, para establecer la cantidad óptima y tóxica del cobre en los microorganismos ruminales.

Cuadro 4. Tratamientos (T) experimentales del ensayo 1.

Tratamiento	Nivel de cobre* ppm
T ₁	0
T ₂	10
T ₃	20
T ₄	30
T ₅	40
T ₆	50

*Se utilizó una solución patrón de sulfato de cobre (CuSO₄) PM=249.7, Marca Sigma, a partir de la cual se elaboraron diluciones a 0, 10, 20, 30, 40, ó 50 ppm, las cuales se adicionaron al medio de cultivo.

El medio de cultivo se elaboró con base a las recomendaciones de Cobos y Yokoyama (1995), los componentes se describen en el Cuadro 5. Se utilizó heno de alfalfa molido (tamaño de partícula de 1 mm) como sustrato.

Cuadro 5. Medio de cultivo anaerobio utilizado en el experimento

Componentes	Por cada 100 mL
Agua destilada	52.6 mL
Líquido ruminal clarificado ^a	30.0 mL
Solución mineral I ^b	5.0 mL
Solución mineral II ^c	5.0 mL
Resazurina (solución al 0.1 %) ^d	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Carbonato de Na (solución al 8 %) ^e	5.0 mL
Cisteína-sulfido ^f	2.0 mL
Alfalfa	1 g

^(a)El líquido ruminal fresco fue previamente filtrado a través de tela, velo de novia y centrifugado a 10 000 rpm por 10 min, a 4°C y esterilizado en autoclave a 121 °C, durante 15 min. ^(b) Contiene 6 g de K₂HPO₄, por 1000 mL de agua destilada. ^(c) Contiene 6 g KH₂ PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄; y 1.6 g CaCl₂·2H₂O por 1000 mL de agua destilada (Bryant y Robinson, 1961). ^(d) Disolver 100 mg de resazurina en 100 mL de agua destilada. Pasar por autoclave a 121°C por 15 min.

5.1.1. Elaboración del medio de cultivo

El medio de cultivo anaerobio (Cuadro 5) se preparó en un matraz Erlenmeyer de bola (500 mL) sin fuente de carbohidratos solubles (Cobos y Yokoyama, 1995). Se midió el pH al medio, estabilizándolo a 7 ± 0.2 . El medio de cultivo fue esterilizado durante 15 min a 121°C, posteriormente se vertió (9 mL) bajo flujo de CO₂ en tubos de cultivo (18 x 150 mm) estériles que contenían 0.1 g de heno de alfalfa y cobre, de acuerdo a los tratamientos establecidos (0, 10, 20, 30, 40, 50 ppm); una vez vertido el medio a los tubos, se sellaron con tapones negros de neopreono. Se incubaron a 38 °C por 48 h para comprobar la esterilidad del

medio, se seleccionaron los medios de cultivo que se encontraron sin contaminación u oxidación para su inoculación.

5.1.2. Inoculación y periodo de incubación

Se extrajo contenido ruminal fresco de una vaca Holstein, de 700 kg PV, se filtró con tela tipo velo de novia para separar la materia sólida; posteriormente, el líquido separado se centrifugó a 3,000 rpm durante 3 min. Finalmente se inoculó el medio de cultivo con 1 mL bajo flujo de CO₂, y se incubó a 38°C durante 72 h.

5.1.3. Variables de respuesta

5.1.3.1. pH del medio de cultivo inoculado

Se determinó el pH directamente a los medios de cultivo inoculados a las 0, y 72 h de incubación, con un potenciómetro marca ORION, modelo 250A calibrado a pH 4 y 7.

5.1.3.2. Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias se midió a las 0 y 72 h. Se tomó 1 mL de muestra del cultivo antes de iniciar la incubación (hora cero) y a las 72 h de incubación. Las muestras se fijaron con formaldehído al 4 % para preservar las bacterias; las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo de 13 x 100 mm, empleando tres repeticiones por tratamiento y diluciones de 10⁻¹ a 10⁻². Se realizaron los conteos bacterianos en una cámara Petroff-Hauser, con ayuda de un microscopio de contraste Zeiss con objetivo 100x y ocular de 10x, generando una magnificación de 1000x, el cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias totales mL}^{-1} = (\text{promedio}) (\text{factor de dilución})(2 \times 10^7)$$

5.1.3.3. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de AGV de las muestras se determinó por cromatografía de gases en un cromatógrafo Perkin Elmer, Modelo Clarus 500 con columna capilar Elite FFAP, utilizando el hidrógeno como gas acarreador. Se tomaron 4 mL del medio de cultivo de las 0 y 72 h de cada muestra y se mezclaron con 1 mL de ácido metafosfórico al 25 %; del sobrenadante se tomaron 2 mL y se centrifugo a 14, 000 rpm durante 10 min, colectando 1.5 mL del sobrenadante a viales para medición de AGV o cromatografía de acuerdo al método establecido en el Laboratorio de Microbiología Ruminal. El tiempo calculado para medición de cada muestra fue de 5 min.

5.1.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS, 2004). Las medias de tratamientos: pH, concentración de bacterias totales, concentración de AGV, se compararon con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta

μ = media general

T_i = efecto del *i*-ésimo tratamiento

ϵ_j = error experimental

5.2. Segundo ensayo. Crecimiento y actividad microbiana en un medio de cultivo *in vitro*, con cantidades crecientes de 0 a 100 ppm de cobre, que permitan determinar la concentración óptima y tóxica de este mineral en bacterias ruminales.

Se utilizó el mismo medio de cultivo anaerobio preparado en el apartado 5.1.1, para evaluar la respuesta del crecimiento y actividad bacteriana, utilizando seis concentraciones de cobre (0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm; Cuadro 6), y cinco repeticiones en cada tratamiento; asimismo, se realizaron incubaciones a 0 y 72 h, para establecer los requerimientos óptimos y de toxicidad del cobre en los microorganismos ruminales.

Cuadro 6. Tratamientos (T) experimentales del ensayo 2.

Tratamiento	Nivel de cobre*, ppm
T ₁	0
T ₂	20
T ₃	40
T ₄	60
T ₅	80
T ₆	100

*Se utilizó una solución patrón de sulfato de cobre (CuSO₄) PM=249.7, Marca Sigma, a partir de la cual se elaboraron diluciones a 0, 20, 40, 60, 80, ó 100 ppm, las cuales se adicionaron al medio de cultivo.

La preparación del medio de cultivo anaerobio fue el mismo descrito en el Cuadro 5, y nuevamente se usó heno de alfalfa como sustrato.

5.2.1. Elaboración del medio de cultivo anaerobio

Se usó el medio de cultivo anaerobio ya descrito. Se midió el pH al medio, ajustándolo a 7 ± 0.02 ; posteriormente, el medio fue esterilizado durante 15 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se depositaron 36 mL del medio bajo flujo de CO_2 , en viales serológicos de cultivo (100 mL) estériles que contenían 0.4 g de heno de alfalfa y cobre a distintas concentraciones (0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm). Una vez vertido el medio en los viales, se sellaron con tapones de goma (20 mm de diámetro) y con casquillos de aluminio, utilizando una engargoladora marca Wheaton. Los viales con el medio de cultivo se incubaron a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h para comprobar la esterilidad, y se seleccionaron aquellos que no presentaron contaminación u oxidación.

5.2.2. Inoculación e incubación de medios y montaje del sistema de producción de gas *in vitro*.

Se extrajo líquido ruminal fresco de una vaca Holstein, de 700 kg PV, el cual se filtró a través de tela tipo velo de novia para separar la materia sólida. Previamente se colocaron 60 viales con el medio de cultivo en baño maría a $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar un choque térmico con el líquido ruminal fresco; posteriormente cada vial con medio de cultivo se inoculó con 4 mL, con jeringas estériles desechables de 10 mL y agujas hipodérmicas de calibre 20G X $1\frac{1}{4}$ ', marca Terumo®.

Cada vial fue conectado mediante una manguera de hule (marca Festo® de 0.25 mm pneumatic, de 10 bar), de 40 cm de largo y una aguja calibre 20G X $1\frac{1}{4}$ ' en cada extremo de la manguera, a un vial de 100 mL invertido, conteniendo

solución salina saturada. El cual se lleno en su totalidad y usado como trampa, teniendo una aguja como válvula de alivio como se muestra en la Figura 5. La base del vial usado como trampa, descansó sobre una probeta de 50 mL, donde por desplazamiento caería la solución salina y con base al desplazamiento se midió la producción de biogás total, producción de CO₂ y CH₄.

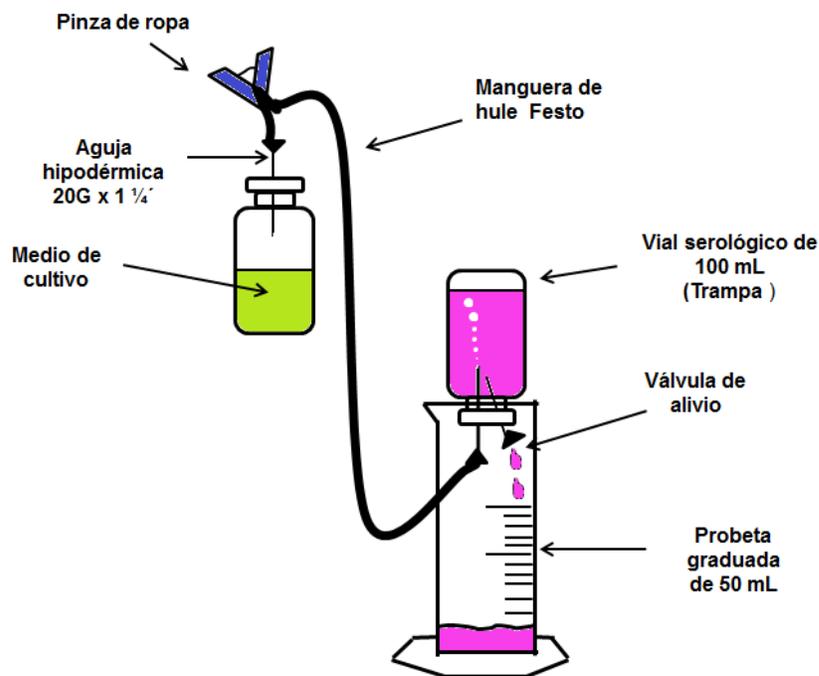


Figura 5. Sistema para captar biogás (Adaptado de Ramírez *et al.*, 2010).

5.2.3. Preparación de trampas de solución salina saturada

En un matraz aforado de 2, 000 mL, se colocaron 608 g de NaCl y 1, 600 mL de agua destilada, se mezclaron en una plancha de calentamiento (Marca Cimarec 2 Mod. N° SP46925), hasta saturar la solución; posteriormente se agregaron 16 mL de naranja de metilo al 0.1 % y se ajustó el pH a 2.3. Con esta solución se

llenaron los viales de 100 mL que fueron utilizados como trampas para estimar la producción de biogás.

5.2.4. Variables de respuesta

5.2.4.1. Concentración de bacterias totales

La concentración de bacterias totales se midió a las 0 y 72 h, se tomó 1 mL de muestra del cultivo antes de iniciar la incubación (hora cero) y al finalizar ésta (72 h) y se fijó con formaldehído al 4 % para preservar las bacterias, las muestras fueron colocadas en tubos de ensaye de 13 x 100 mm, empleando tres repeticiones por tratamiento y diluciones de 10^{-1} a 10^{-2} . Se realizaron los conteos bacterianos en una cámara Petroff-Hauser, con ayuda de un microscopio de contraste Zeiss con objetivo 100x y ocular de 10x, generando una magnificación de 1000x. La concentración de bacterias por mL de medio de cultivo se cálculo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias totales mL}^{-1} = (\text{promedio}) (\text{factor de dilución})(2 \times 10^7)$$

5.2.4.2. pH del medio de cultivo inoculado

Se midió el pH directamente en los medios de cultivo inoculados a las 0, y 72 h de incubación, con un potenciómetro marca ORION, modelo 250^a, calibrado a pH 4 y 7.

5.2.4.3. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de AGV de las muestras se determinó por cromatografía de gases en un cromatógrafo Perkin Elmer, Modelo Clarus 500 con columna capilar Elite FFAP, utilizando el hidrógeno como gas acarreador. Se tomaron 4 mL del medio de cultivo, de las 0 y 72 h de cada muestra y se mezclaron con 1 mL de ácido metafosfórico al 25 %; del sobrenadante se tomaron 2 mL y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min, colectando 1.5 ml del sobrenadante a viales para medición de AGV o cromatografía de acuerdo al método establecido en el Laboratorio de Microbiología Ruminal. Las condiciones de la corrida fueron: temperatura del FID a 250 °C, con temperatura de inyector a 190 °C, temperatura del horno 160 °C. El tiempo estimado para medición de cada muestra fue de 5 min.

5.2.4.4. Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

Se utilizó 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 (solución al 25 %), la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Del sobrenadante se tomaron 20 µL 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 agregaron 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron leídas a 630 nm, en un espectrofotómetro Cary 1-E, UV-visible, Marca Varían.

5.2.4.5. Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Para la determinación de la degradación *in vitro* de la materia seca, se colectó de cada vial, el sustrato residual de heno de alfalfa, usando un filtró de papel Whatman N° 541, secado a 70 °C durante 24 h, el residuo fue pesado en una balanza analítica. La DIVMS se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{DIVMS (\%)} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

5.2.4.6. Determinación de la producción de biogás total, CH₄ y CO₂

La determinación de CH₄ y CO₂ se midió en el volumen de solución salina desplazada después de 0, 24, 48 y 72 h de incubación. Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, modelo Clarus 500, con detector de conductividad térmica (TCD). El volumen de inyección fue de 0.3 mL de gas por muestra. Las condiciones de la corrida fueron: temperatura del TCD a 130 °C, con temperatura de inyector a 170 °C, temperatura del horno 140 °C. Bajo estas condiciones el tiempo de retención fue de 0.73 min⁻¹ para el CH₄, y de 1.05 min⁻¹ para el CO₂.

5.2.5. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS, 2004). Las medias de tratamientos: pH, concentración de bacterias totales, concentración de ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal, DIVMS, biogás total, CH₄ y CO₂, se compararon con la prueba de Tukey (p<0.05).

El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta

μ = media general

T_i = efecto del *i*-ésimo tratamiento

ε_j = error experimental

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Primer ensayo. Exploración de la tendencia del crecimiento microbiano en un medio de cultivo *in vitro*, con cantidades crecientes de cobre, en el intervalo de 0 a 50 ppm.

Los resultados del primer ensayo experimental mostraron que las concentraciones de cobre evaluadas (0, 10, 20, 30, y 50 ppm), no afectaron ($p>0.05$) el pH y la producción de AGV, (Figura 6 y Cuadro 7). Sin embargo, el crecimiento bacteriano disminuyó ($p<0.05$) cuando se adiciona al medio de cultivo 40 ppm de cobre, con relación al tratamiento testigo y el tratamiento que contenía 50 ppm de este mineral.

Cuadro 7. pH, concentración de bacterias totales y ácidos grasos volátiles en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cobre después de 72 h de incubación

Tratamiento cobre (ppm)	pH	Bacterias, 10^{10} mL ⁻¹	AGV totales, mM
0	6.61 ^a	2.01 ^a	56.12 ^a
10	6.81 ^a	1.96 ^a	55.78 ^a
20	6.79 ^a	1.58 ^{ab}	55.21 ^a
30	6.89 ^a	1.62 ^{ab}	50.88 ^a
40	6.50 ^a	1.03 ^b	47.01 ^a
50	6.72 ^a	1.58 ^a	50.54 ^a
Media	7.72	1.63	52.59
CV	2.61	1.24	6.91

^{a,b}: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p<0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

Los resultados reportados en la literatura asociada al efecto del cobre, sobre la actividad microbiana del rumen, *in vitro* e *in situ*, son escasos y no concluyentes. Nikolić *et al.* (1983), reportaron que la adición de cobre al medio de cultivo afectaba el pH ruminal, 2 h después de haber agregado este mineral al medio, situación que no ocurrió en este experimento después de 72 h de incubación y con concentraciones de cobre de 0 a 50 ppm. Asimismo, Essig *et al.* (1972) y Nikolić *et al.* (1983), reportaron que la adición de 6.5 ppm Cu kg⁻¹ MS disminuye la concentración total de AGV *in situ*. Sin embargo, bajo las condiciones *in vitro* de este trabajo, la producción total de AGV no se vio afectada cuando se adiciona al medio de cultivo hasta 50 ppm de cobre.

Gordon *et al.* (1993) mostraron que la adición de 20 µM de cobre, disminuyó la concentración de bacterias; sin embargo, la población bacteriana fue capaz de recuperarse después de 4 días de exposición a estos niveles del cobre.

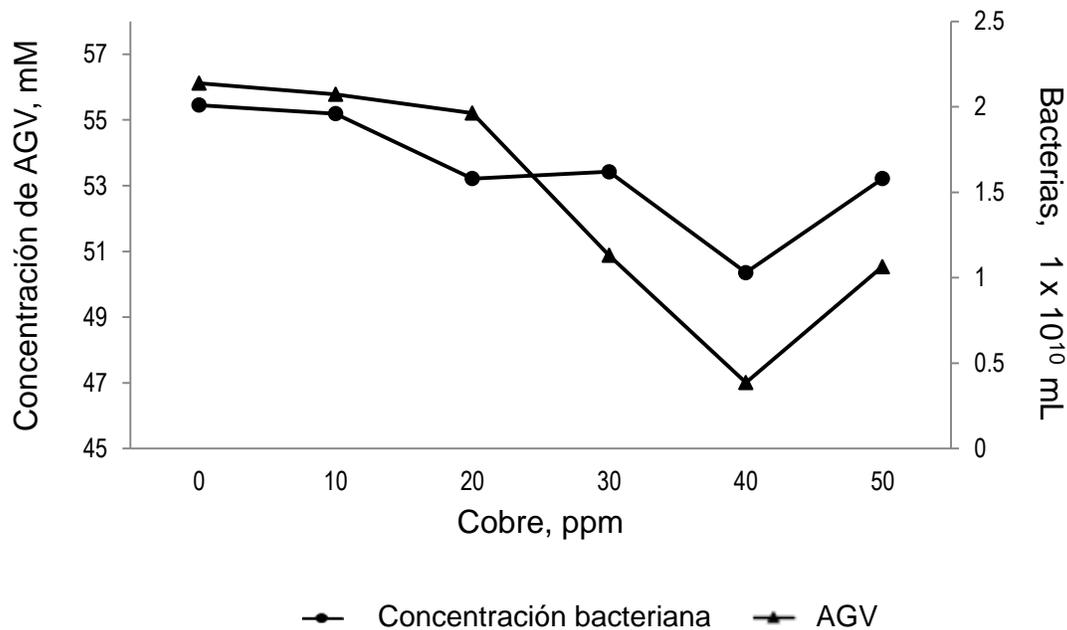


Figura 6. Concentración de bacterias totales y AGV en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre.

A pesar de no haberse presentado diferencias ($p > 0.05$) en la concentración de AGV totales en los tratamientos evaluados, al graficar hay tendencia de esta variable (Figura 6) y al compararla con el comportamiento que siguió la población de bacterias totales en medios de cultivo con distintas concentraciones de cobre, se observó una respuesta similar, en especial a una concentración de 40 ppm de cobre, donde se dio una caída de la curva, pero sin resultar en un cambio significativo en la concentración total de AGV.

El Cuadro 8 muestra las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico producidos en medios de cultivo *in vitro*, con diferentes concentraciones de cobre (0 a 50 ppm), donde se pudo observar que los niveles de cobre

evaluados no afectaron ($p>0.05$) las cantidades producidas de estos metabolitos bacterianos. En un estudio similar, Hasman *et al.* (2009), no observaron cambios en la producción de ácido acético, propiónico y butírico, al adicionar concentraciones de cobre de 40 mM en el medio de cultivo.

Cuadro 8. Concentración (mM) de ácido acético, propiónico y butírico en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cobre.

Tratamientos cobre (ppm)	Acético	Propiónico	Butírico
0	37.64 ^a	14.08 ^a	4.39 ^a
10	37.80 ^a	14.01 ^a	3.97 ^a
20	37.80 ^a	13.13 ^a	4.27 ^a
30	34.21 ^a	11.43 ^a	5.23 ^a
40	32.59 ^a	10.13 ^a	4.29 ^a
50	34.46 ^a	12.05 ^a	4.03 ^a
Media	35.75	12.47	4.36
CV	6.51	12.07	17.59

^a: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p<0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

De forma similar, en estudios conducidos por Solaiman *et al.* (2007), se reportó que la adición de 20 a 40 ppm Cu kg⁻¹ MS en la dieta, no tuvo ningún efecto ($p>0.05$), en la producción de ácido acético, propiónico y butírico, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, Zhang *et al.* (2007) reportaron que al adicionar de 10 a 20 ppm de Cu kg⁻¹ MS a la dieta, disminuyó significativamente el pH del líquido ruminal y la concentración de AGV; sin embargo, aumentó la producción de ácido acético y disminuyó propiónico y butírico.

6.2. Segundo ensayo. Concentración y actividad microbiana en un medio de cultivo *in vitro*, con cantidades crecientes de 0 a 100 ppm de cobre, que permitan determinar la concentración óptima y tóxica de este mineral en bacterias ruminales

6.2.1. Concentración bacteriana

Al analizar los resultados de la fase experimental 2, se determinó que las concentraciones de cobre evaluadas, no afectaron ($p>0.05$; Cuadro 9) la concentración bacteriana al tiempo inicial de 0 h; sin embargo a las 72 h de incubación, la población de bacterias disminuyó con las cantidades de cobre de 80 y 100 ppm. Con base a estos resultados, se puede establecer que la cantidad óptima para mantener la concentración de bacterias *in vitro* se encuentran en un rango de 20 a 60 ppm de cobre. Mientras que, a partir de 80 y 100 ppm se presenta la toxicidad por este mineral, ya que de acuerdo con los resultados, disminuye la concentración bacteriana en un 20 y 55 %, respectivamente, con relación al grupo testigo, a las 72 h de incubación.

Cuadro 9. Concentración de bacterias totales en medios de cultivo diferentes cantidades de cobre

Tratamientos cobre (ppm)	Tiempo	
	0 h	72 h
	Concentración bacteriana, 10^{10} mL ⁻¹	
0	4.88 ^a	4.40 ^a
20	3.76 ^a	5.04 ^a
40	4.24 ^a	4.68 ^a
60	4.20 ^a	4.44 ^a
80	4.48 ^a	3.48 ^b
100	4.04 ^a	1.96 ^b
Media	4.26	4.00
CV	17.08	20.88

a, b: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

La concentración de bacterias totales que reportan Zevenhuizen *et al.* (1979) al adicionar 16 ppm de cobre fue de 3×10^6 mL⁻¹, que resulta inferior a los valores observados en el primer y segundo ensayo de este trabajo, incluso en los tratamientos con las que resultaron tóxicas (80 y 100 ppm). Hasman *et al.* (2009) documentaron que el aumento de cobre en el medio de cultivo, puede ocasionar una caída en el número de bacterias existentes; sin embargo, debido a que puede haber resistencia bacteriana, es posible una gran variación en las estimaciones de la tolerancia bacteriana al cobre. Saifullah (1978) reportó que 2 ppm de Cu L⁻¹ redujo hasta el 50 % de bacterias en el segundo día de incubación, debido a la incorporación de cobre al intracelular.

6.2.2. pH del medio de cultivo inoculado

El Cuadro 10 muestra los resultados de pH en el segundo ensayo experimental. A las 0 h de incubación se observó una disminución ($p < 0.05$) de esta variable con cantidades de cobre de 20, 60, 80 y 100 ppm con respecto al tratamiento sin cobre. A las 72 h de incubación, únicamente el tratamiento con 60 ppm de cobre produjo una disminución del pH con respecto al tratamiento sin cobre. No obstante, los valores de pH de todos los tratamientos se encuentran dentro del rango óptimo para la actividad y crecimiento de microorganismos ruminales (Zhang *et al.*, 2007).

Hasman *et al.* (2009) reportan que al cambiar la concentración de sulfato de cobre de 0 a 40 ppm el pH disminuye de 7 a 3.3 al final de la medición. En este sentido, se puede mencionar que a pesar de que los niveles de cobre evaluados en este trabajo fueron desde 0 hasta 100 ppm, el pH no sufrió cambios drásticos que afectaran la fermentación y la concentración bacteriana.

Cuadro 10. pH de medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre al inicio y al final de la incubación.

Tratamientos cobre (ppm)	Tiempo de incubación	
	0 h	72 h
0	6.61 ^a	6.31 ^a
20	6.56 ^b	6.31 ^a
40	6.61 ^a	6.22 ^{ab}
60	6.52 ^{bc}	6.14 ^b
80	6.48 ^c	6.25 ^a
100	6.53 ^b	6.31 ^a
Media	6.55	6.26
CV	0.35	0.83

a, b, c: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

6.2.3. Ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de AGV mostró diferencias significativas ($p < 0.05$; Cuadro 11) en los periodos de evaluación de 0 y 72 h. La concentración de AGV fue ajustada para estimar el valor real, restando el valor inicial (0 h) al de 72 h. A las 0 h de incubación, la producción de AGV disminuyó con cantidades de 40 ppm de cobre o superiores a este. A las 72 h de incubación, la disminución de la producción de AGV en el cultivo *in vitro* se dio a concentraciones de 60 ppm o superiores a esta. Es importante destacar que la adición de 80 y 100 ppm de cobre al medio de cultivo reduce la producción de AGV en 29 y 37 %, respectivamente.

Congruente con estos resultados, otros autores como Essig *et al.* (1972), Nikolić *et al.* (1983), y Zhang *et al.* (2007), han reportado que la adición de niveles crecientes de cobre a las dietas de los rumiantes se relaciona con una disminución en la concentración de AGV.

Cuadro 11. Concentración de AGV en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cobre, al inicio y final de la incubación.

Tratamientos cobre (ppm)	Tiempo 0 h	Tiempo 72 h
	AGV, mM	
0	55.28 ^a	49.76 ^{ab}
20	54.42 ^a	43.87 ^{abc}
40	42.69 ^b	53.11 ^a
60	37.36 ^c	51.60 ^a
80	36.60 ^c	38.44 ^{bc}
100	34.99 ^c	32.05 ^c
Media	43.56	44.80
CV	5.21	14.73

^{a,b,c}: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$)

CV: Coeficiente de variación.

El Cuadro 12 muestra las proporciones de ácido acético, propiónico y butírico, a las 0 y 72 h de incubación. Para el caso de la proporción de propiónico y butírico, en el horario cero de incubación, se presentó una disminución ($p < 0.05$) en la producción de estos AGV a partir de la concentración de 40 ppm con relación al grupo testigo.

A las 72 h de incubación, con 60 ppm de cobre en el medio, la concentración de ácido acético disminuye y se incrementa ($p < 0.05$) la concentración de propiónico. En cambio, la concentración de butírico aumento cuando la cantidad de cobre en el medio fue de 100 ppm. Congruente con estos resultados está la disminución en la población bacteriana (Cuadro 9). Busch (1980) menciona que la formación de acetato de cobre ocurre cuando el mineral reacciona con ácido acético, resultando un compuesto altamente oxidante en síntesis orgánicas. Esto podría explicar la disminución de ácido acético en los medios de cultivo con altos niveles de cobre obtenidos en esta investigación.

Los resultados de otros trabajos en los que se ha estudiado la concentración de cobre en el medio de cultivo *in vitro* e *in vivo* no han sido contundentes, ya que Zhang *et al.* (2007) indican que la adición de 10 a 20 ppm de Cu kg^{-1} MS en dietas de rumiantes, muestran cambios detectables en las concentraciones molares de acético, pero la concentración de propiónico y butírico no se altera. Essig *et al.* (1972) reportan que la adición de sulfato de cobre a la dieta en concentraciones de 4.4 a 5.73 g por cada 100 kg PV provocan una disminución ($p < 0.05$) en la producción de AGV.

Para Solaiman *et al.* (2007), la adición de cobre 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 a 788 y 130 mM, respectivamente.

Cuadro 12. Proporción de ácido acético propiónico y butírico en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre

Tratamientos cobre (ppm)	Tiempo de incubación, 0 h			Tiempo de incubación, 72 h		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
0	75.55 ^a	16.30 ^b	8.15 ^c	71.53 ^a	19.16 ^{ab}	9.31 ^a
20	74.33 ^b	17.88 ^a	7.79 ^c	71.15 ^a	19.27 ^{ab}	9.58 ^{ab}
40	75.46 ^a	16.18 ^c	8.36 ^b	71.09 ^a	18.67 ^b	10.24 ^{ab}
60	75.17 ^a	16.07 ^c	8.76 ^a	68.31 ^b	21.83 ^a	9.86 ^{ab}
80	74.82 ^{ab}	16.30 ^c	8.88 ^a	69.17 ^b	19.88 ^{ab}	10.95 ^{ab}
100	75.12 ^a	16.18 ^c	8.70 ^a	68.97 ^b	19.40 ^{ab}	11.63 ^a
Media	75.08	16.59	8.44	70.03	19.70	10.26
CV	0.52	1.73	1.6	1.22	7.83	11.04

^{a, b, c} Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$)

CV: Coeficiente de variación.

6.2.4. Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

El Cuadro 13 presenta los resultados de la producción de nitrógeno amoniacal en función con las concentraciones de cobre en el medio de cultivo *in vitro* a 0 y 72 h de incubación. La concentración de N-NH₃ fue ajustada para estimar el valor real, restando el valor inicial (0 h) al de 72 h. La producción de nitrógeno amoniacal a las 0 h de incubación, mostró una disminución ($p < 0.05$) con cantidades de cobre de 40 ppm o superiores, de tal forma que con

concentraciones de 80 y 100 ppm de cobre en el medio de cultivo, la producción de nitrógeno amoniacal se redujo a casi el 50 %.

De forma similar, a las 72 h de incubación, el nivel de 60 ppm de Cu y concentraciones superiores produjeron disminución ($p < 0.05$) de nitrógeno amoniacal, de tal manera que con 80 y 100 ppm de cobre en el medio de cultivo la producción de amonio se redujo en 39 y 46 %, respectivamente.

Estudios realizados por Arelovich (2008) demostraron que la adición de cobre en cultivos *in vitro* disminuye la producción de N-NH₃ y puede estar relacionado con una disminución en la tasa de ureolisis ruminal; sin embargo, a concentraciones de 0.383 ppm se estimula la actividad enzimática microbiana.

Cuadro 13. Concentración de nitrógeno amoniacal en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre

Tratamientos cobre (ppm)	Tiempo de incubación	
	0 h	72 h
	N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	
0	12.67 ^a	27.04 ^a
20	11.81 ^a	25.75 ^{ab}
40	8.37 ^b	29.95 ^a
60	7.37 ^c	22.00 ^{bc}
80	6.80 ^c	17.60 ^{cd}
100	6.52 ^c	15.03 ^d
Media	8.92	22.90
CV	5.58	13.5

a, b, c: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$)

CV: Coeficiente de variación.

6.2.5. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (MS)

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS; Cuadro 14) obtenida después de 72 h de incubación, mostró disminución ($p < 0.05$) de 19.6 y 18 % cuando la cantidad de cobre fue de 80 y 100 ppm, con respecto al tratamiento testigo (0 ppm de Cu). De igual manera, los tratamientos T₅ y T₆, que correspondían a las cantidades de cobre de 80 y 100 ppm, favorecieron la disminución en 23.5 y 23 % respectivamente, de la digestibilidad de la materia orgánica. Congruente con estos resultados, en otra investigación se observó que la adición de 20 a 30 ppm de cobre en dietas para rumiantes, no afectó la digestibilidad de materia seca Zevenhuizen *et al.*, (1979) y Zhang *et al.* (2007), también observaron que la adición de 20 a 30 ppm de cobre en la dieta para rumiantes, no afectó la digestibilidad de la materia seca, aunque encontraron una disminución en la población de bacterias.

En otro estudio, Wang *et al.* (2010) informaron que la digestibilidad de la MS y MO no cambió al adicionar 20 ppm de cobre en la dieta de rumiantes.

Cuadro 14. Digestibilidad *in vitro* (%) de materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO) con diferentes cantidades de cobre

Tratamientos cobre (ppm)	Tiempo de incubación	
	72 h	
	DIVMS	DIVMO
0	43.21 ^a	43.56 ^a
20	43.27 ^a	44.07 ^a
40	43.83 ^a	44.20 ^a
60	43.41 ^a	43.18 ^a
80	33.94 ^b	33.30 ^b
100	34.77 ^b	33.54 ^b
Media	40.4	40.3
CV	9.98	9.99

a,b: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

6.2.6. Determinación de la producción de biogás total, CH₄ y CO₂

El Cuadro 15 muestra la producción total de biogás en el medio de cultivo *in vitro*, donde el mayor volumen ($p < 0.05$) de biogás acumulado se observó en los tratamientos con 0, 20 y 40 ppm de cobre a 24, 48 y 72 h; no obstante, con niveles de 60 ppm de Cu o superiores, la producción de biogás disminuyó ($p < 0.05$). Al respecto, Yue *et al.* (2007) mencionaron que la producción de biogás total es un indicador del efecto que tienen los metales sobre los microorganismos ruminales.

Cuadro 15. Biogás total acumulado (mL⁻¹) por la fermentación en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre

Tratamientos cobre (ppm)	Horas de incubación		
	24	48	72
0	69.90 ^a	79.50 ^a	80.90 ^a
20	66.50 ^a	75.90 ^a	77.40 ^a
40	60.00 ^a	79.20 ^a	82.40 ^a
60	22.40 ^b	42.40 ^b	54.90 ^b
80	12.40 ^{bc}	30.00 ^{bc}	37.50 ^c
100	6.40 ^c	22.40 ^c	27.80 ^c
Media.	39.60	54.90	60.15
CV	19.59	14.15	14.37

a,b: Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, $p < 0.05$).

CV: Coeficiente de variación.

La producción de CH₄ y CO₂ en los tratamientos evaluados (Cuadro 16) a las 24 h de incubación mostraron resultados similares ($p > 0.05$) y las proporciones CH₄:CO₂ estuvieron en un rango de 1:16 a 1:21. A las 48 h, los niveles de 60, 80 y 100 ppm de cobre propiciaron una elevada ($p < 0.05$) producción de CO₂ y baja producción ($p < 0.05$) de CH₄. La proporción CH₄:CO₂ cambió de 1:4 a 1:22 con 0 y 60 ppm de Cu. A la 72 h de incubación, los niveles de 60, 80 y 100 ppm de Cu originaron un incremento ($p < 0.05$) en la producción de CO₂ y una disminución en la producción de CH₄, y las proporciones de CH₄:CO₂ cambiaron de 1:1 a 1:3 y 1:4, cuando la concentración de cobre en el medio fue de 0, 80 y 100 ppm.

En un estudio *in vitro* realizado por Yue *et al.* (2007), la máxima producción de metano se obtuvo con 2.4 ppm de Cu, (5.6 % CH₄ y 94.4 % CO₂), mientras que a niveles de 30 ppm de Cu, la producción de metano disminuyó. Hickey *et al.* (1989) reportan que la producción de CO₂ se ve menos afectada que la metalogénesis debido a que las bacterias productoras de este compuesto son más sensibles a cambios en el ambiente ruminal y en especial al cobre.

1 **Cuadro 16. Proporción de CH₄ y CO₂ producidos en medios de cultivo con diferentes cantidades de cobre**

Tratamientos cobre (ppm)	24 h			48 h			72 h		
	CH ₄	CO ₂	CH ₄ :CO ₂	CH ₄ ,	CO ₂	CH ₄ :CO ₂	CH ₄ ,	CO ₂	CH ₄ :CO ₂
	----- % -----			----- % -----			----- % -----		
0	5.90 ^b	94.09 ^a	1:16	20.92 ^{ab}	79.07 ^{bc}	1:4	37.11 ^{ab}	62.88 ^{cd}	1:1
20	4.62 ^b	95.37 ^a	1:21	19.20 ^b	80.79 ^b	1:4	31.63 ^{bc}	68.36 ^{cb}	1:2
40	5.03 ^b	94.96 ^a	1:19	25.31 ^a	74.69 ^c	1:3	45.89 ^a	54.10 ^d	1:1
60	4.80 ^b	95.19 ^a	1:20	4.25 ^c	95.74 ^a	1:22	29.96 ^{bc}	70.03 ^{bc}	1:2
80	5.47 ^b	94.53 ^a	1:17	5.18 ^c	94.82 ^a	1:18	26.18 ^{cd}	73.82 ^{ab}	1:3
100	7.48 ^a	92.52 ^a	1:12	4.98 ^c	95.01 ^a	1:19	18.20 ^d	81.80 ^a	1:4
Media	5.55	94.44		13.30	86.69		31.49	68.50	
CV	13.67	0.803		18.78	2.88		16.47	7.57	

2 ^{a, b, c, d:} Medias de tratamientos con diferente literal en la misma columna indican diferencia estadística (Tukey, p<0.05)

3 CV: Coeficiente de variación.

VII. CONCLUSIÓN

Con base a los objetivos planteados al inicio de este trabajo y a los resultados obtenidos, se puede concluir que el crecimiento y la actividad de las bacterias ruminales, tuvo un crecimiento óptimo con concentraciones de 40 a 60 ppm de cobre en medios de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la toxicidad por cobre de las bacterias ruminales comienza a concentraciones de 80 ppm, afectando el crecimiento y la actividad metabólica.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguerre, M. J., Wattiaux, M. A., Powell, J. M., Broderick, G. A., Arndt, C. 2011. Effect of forage to concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *J. Dairy Sci.* 94(6):3081-3093.
- Arelovich, H. M. 2008. Elementos minerales su impacto en la fermentación. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 28(3):235-253.
- Arredondo, M., Núñez, T. M. 2005. Iron and copper metabolism: Molecular Aspects of Medicine. 26: 313–327.
- Bach, A., Ruiz M., Thrune, M., Stern, M. D. 2008. Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters. *J. Animal Sci.* 86:1364-137.
- Balbuena, O., McDowell, L. R., Luciani, C. A., Conrad, J. H., Wilkinso, N. N., Martin, F. G. 2003. Estudios de la Nutrición Mineral de los Bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). 3. Cobre, Molibdeno y Azufre. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 1-8.
- Baker, H. D., Ammerman, A. B. 1995. Copper bioavailability. Department of Animal Science. University of Florida Gainesville, Florida. pp .127-156.
- Bryant, M. P. and Robinson, I. M. 1961. An improved non-selective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *J. Dairy Sci.* 44: 1446-1456.

- Busch, D. H. 1980. Inorganic syntheses, Volume XX. Edit. John Wiley & Sons. EEUU. pp.53-55
- Carroll, M. C., Girouard, J. B., Ulloa, J. L., Subramaniam, J. R., Wong, P. C., Valentine, J. S., Culotta, V. C. 2004. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 5964–5969.
- Casareno, R. L. B., Waggoner, D., Gitlin, J. D. 1998. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 273:23625-23628.
- Cater, M. A., Mercer, J. F. B. 2005. Copper in mammals: mechanisms of homeostasis and pathophysiology. Topics in Current Genetics. 14:102-129.
- Cervantes, C., Gutiérrez, C. F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiology. 14: 121-138.
- Chicco, F. C., Godoy de León, S. 2005. Deficiencias minerales y condiciones asociadas en la ganadería de carne de las sabanas de Venezuela. Primer Curso Internacional Sobre Avances en la Nutrición de los Rumiantes. pp. 101-128.
- Cobos, P. M., Ferrera, C. R., Alarcon, A. (Eds). 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales, in: Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Editorial Trillas. México. pp. 498-516.

- Cobos, P. M., Yokoyama, M. T. 1995. *Clostridium Parapurificum* Var Ruminatum: colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In: Wallace RJ, Lahlou Kassi A, editors. Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of a Workshop; 1995 March 13–18; Addis Abeba, Ethiopia. Addis Abeba, Ethiopia: The International Livestock Research Institute, 1995:151-162.
- Durand, M., Kawashima, R. 1980. Influence of minerals in rumen digestion. *In*: Y. Ruckebusch y P. Thivend (Eds.) Digestive Physiology and Metabolism in the Ruminant. Proc. V International Symposium on Ruminant Physiology. MTP Press, Lancaster, England pp. 375- 408.
- Engle, T. E., Spears, J. W. 2000. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78:2446-2451.
- Engle, T. E., Spears, J. W., 2001. Performance, carcass characteristics and lipid metabolism in growing and finishing Simmental steers fed varying concentrations of copper. *J. Anim. Sci.* 79: 2920-2925.
- Essig, J. H. W., Davis, D., Smithson, L. J. 1972. Copper Sulfate in Steer Rations. *J. Anim. Sci.* 35:436-439.
- Erwin, E. S., Marco, G. J., Emery, E. 1961. Volatile fatty acids analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
- Faixová, Z., Faix, S., Makova, Z., Vaczi, P., Prosbova, M. 2006. Effect of divalent ions on ruminal enzyme activities in sheep. *Acta Vet. Beograd.* 56: 17-23.

- Forbes J. M., Symonds, H. W., France, J. 1993. Mineral Metabolism: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. Edit. Wallingford, UK, C·A·B, International. pp. 363-370.
- Forbes, J. R., Cox, D. W. 2000. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum. Mol. Genet.* 9:1927-1935
- Fuentealba, C. I., Aburto, M. E. 2003. Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology. BioMed. Central.* pp. 1-12.
- Gooneratne, S. R., Buckley, W. T., Christensen, D. A. 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J. Anim. Sci.* 69:819-845.
- Gordon S. A., Harwood, A. J. V., Sayyar, S. 1993. Growth, copper-tolerant cells, and extracellular protein production in copper-stressed chemostat cultures of *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1):60 - 66.
- Harrison, M. D., Jones, E. C., Solioz M., Dameron, T. C. 2000. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *J. Biol. Chem.* 4(99):29-32.
- Harrigan W. F., McCance, M. E. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. León España. pp. 361-366.
- Hasman, H., Bjerrum, J. M., Christiansen, E. L., Hansen, H. C. B., Aarestrup, M. F. 2009. The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *J. Microbiol. Methods.* 78:20-24.
- Hickey, R. F., Vanderwielen, J., Switzenbaum, M. S. 1989. The effects of heavy metals on methane production and hydrogen and carbonmonoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Water Res.* 23: 207–219.

- 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.
- Karapinar, T, Dabak, M, Demircyl, Y. 2007. Copper deficiency in feedlot cattle. *Bull Vet. Inst. Pulawy.* 51: 135-138.
- Kebreab, E., Vitti, D. M. S. S. 2005. Mineral metabolism. *J. Dairy Sci.* 82: 469-484.
- Khafipour, S. L. E., Krause, D. O., Kroeker, A., Rodriguez-Lecompte, J. C., Gozho, G. N., Plaizier, J. C. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(1):294-303.
- Koenig, K. N., Rode, L. M., Cohen, R. D., Buckley, W. T. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.* 75:817-827.
- Lee, S. S., Ha, J. K., Cheng, J. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 88:201-217.
- Lee, J., Pena, M. M. O., Nose, Y., Thiele, D. J. 2002. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* 277:4380-4387
- Lu, Z., Solioz, M. 2001. Copper-induced proteolysis of the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 276:47822.
- Martinez, A., Church, D. C. 1970. Effect of various mineral elements on *in vitro* rumen cellulose digestion. *J. Anim. Sci.* 31:982-990.

- Mattioli, G .A., Rosa, D. E. 2002. Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. *Analecta Veterinaria*. 22 (1): 7-16
- McCoullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chem.* 17:297-302.
- McDonald. P., Greenhalgh, J. F. D., Edwards, R. A., Morgan, C. A. 1995. *Nutrición Animal*. 5ª edición. Edit. Acribia. S. A. Zaragoza España. pp. 89-106.
- Nederbragt, H., Van den Ingh, T.S.G.A.M., Wensvoort, P. 1984. Pathobiology of copper toxicity. *Vet. Q.* 6: 179-235.
- 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. Isot.* 34(5) 809-812.
- NRC. 1985. *Nutrient requirements of sheep. (6th Ed. Revised)*. National Research Council. National Academy of Press, Washington, D. C. EEUU.
- NRC. 2000. *Nutrient requirements of beef cattle. (7th Ed. Update)*. National Research Council. National Academy of Press, Washington, D.C. EEUU.
- NRC. 2001. *Nutrient requirements of dairy Cattle. Seventh Revised Edition*, National Academy of Sciences. Washington, D.C. EEUU.
- Odermatt, H., Sutert, R., Krapfs, M., Solioz. 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *enterococcus hirae*, *J. Biol Chem.* 268: 12775.

- Osman, D., Cavet, S. J. 2008. Copper homeostasis in bacteria. *Advances in Appl. Microbiol.* 65:217-247.
- Pécou, E., Maass, A., Remenik, D., Briche, J., Gonzalez, M. 2006. A mathematical model for copper homeostasis in *enterococcus hirae*. *Mathematical Biosciences.* 203:222–239.
- Pena, M. M. O., Lee, J., Thiele, D. J. 1999. A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutrition.* 129:1251-1260.
- Prohaska, J. R. 1991. Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase Activities in copper-deficient mice and rats. *J. Nutrition* 55:355-363.
- Puig, S., Thiele, D. J. 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Bioinorganic chemistry.* 6:171–180
- Qi, C. K., Lu, F. D., Owens, N., Lupton, C. J. 1992. Sulfate supplementation of Angora goats: metabolic and mohair responses. *J. Anim. Sci.* 70:2828-2837.
- Qi, K., Lu, C. D., Owens, F.N. 1993. Sulfate supplementation of Angora goats: sulfur metabolism and interactions with zinc, copper and molybdenum. *Small Ruminant Research*, 11: 209-225.
- Ramírez, H. I. F., Cobos, P. M. A., Gavi, R.F., Quevedo, N. A., González, A. E. 2010. Emisiones de metano generadas por excretas de animales de granja y contenido ruminal de bovino. *Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco Edo. De México.* pp. 55.

- Rocha, Q. G. F., Bouda, I. 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Vet. Méx.* 2(4):289-296.
- Russell, J. B., Connor, O., Fox, D. G., Van Soest Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J. Animal Sci.* 70(11):3551-3561.
- Saifullah, S. M. 1978. Inhibitory effects of copper on marine dinoflagellates. *Marine Biology.* 44: 299-308.
- Santo, E. C., Lam, E. W. Elowsky, G. C., Quaranta, D., Domaille, D. W., Chang, C. J., Grass, G. 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environm. Microbiol.* 77(3):749-802
- SAS. 2004. SAS/STAT User's guide (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA.
- Simpson, M., Svetlana A., Kocherginskaya., Roustam, I., Aminov, Skerlos, L. T., Bradley, T. M., Mackie R. I., White B. A. 2002. Comparative microbial diversity in the gastrointestinal tracts of food animal species. *Society for integrative and comparative biology.* 42:327-331.
- Solaiman, S. G., Craig, T. J. Jr., Reddy, G., Shoemaker, C. E. 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.
- Solioz, M., Stoyanov, V. J. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 27: 183-195

- Spears, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J. Nutrition.* 133:506S-1509S.
- Spears, J. W., Kegley, E. B., Mullis, L. A. 2004. Bioavailability of copper from tribasic copper chloride and copper sulfate in growing cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116:1-13.
- Sprinkle, J. E., Cuneo, S. P., Frederinck, H. M., Enns, R. M., Schafer, D. W., Carstens, G. E., Daugherty, S. B., Noon, T. H., Rickert, B. M., y Reggiardo, C. 2006. Effects of a long-acting, trace mineral, reticulorumen bolus on range cow productivity and trace mineral profiles. *J. Anim. Sci.* 84:439-1453.
- Vargas, E., Álvarez, H. A., Cervantes, C. 1998. Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. *Revista latinoamericana de microbiología.* 40 (1):53-71.
- Velásquez, A., Pichard, G. 2010. Effects of rumen fluid pre-incubation *in vitro* proteolytic activity of enzymatic extracts from rumen microorganisms. *Animal Feed Sci. Technology.* 164(4):75-82.
- Walker, N. D. 2009. Nutrients requirements and metabolism of rumen microorganisms. <http://www.rumen-health.com/rumen/index2.html>. 29 febrero 2012
- Wallace, R. J. 1996. Ruminant microbial metabolism of peptides and amino acids. *J. Nutrition.* 126:1326S-1334S.
- Wang, R. L., Wei, Z., Zhu, X. P., Zhi, J. H. 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

- Yue, Zheng-Bo., Yu, Han-Qing., Wang, Zhi-Liang. 2007. Anaerobic digestion of cattail with rumen culture in the presence of heavy metals. *Bioresource Technology*. 98: 781–786
- Zanton, G. I., Gabler, M. T., Heinrichs, A. J. 2007. Manipulation of soluble and rumen undegradable protein in diets fed to postpubertal dairy heifers. *J. Dairy Sci*. 90:978-986.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., Dolfing, J., Eshuis, E. J., Scholten-Koerselman, I. J. 1979. Inhibitory Effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology*. 5:139-146.
- Zhang, W., Wang, R., Zhu, X., Kleemann, O. D., Yue, C., Jia, Z. 2007. Effects of dietary copper on ruminal fermentation, nutrient digestibility and fibre characteristics in cashmere goats. *J. Anim. Sci*. 20(12):1843-1848