

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COMITANCILLO

TESIS PROFESIONAL

**“ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y DETECCIÓN DE LAS COMUNIDADES
BACTERIANAS EN ENSILADOS DE DIFERENTES ESPECIES
FORRAJERAS DE CORTE”**

QUE PRESENTA:

GUADALUPE ARENA ORTIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA AGRÓNOMA
CON ESPECIALIDAD EN ZOOTECNIA**

SAN PEDRO COMITANCILLO, OAX. NOVIEMBRE DEL 2015



SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Comitancillo

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

San Pedro Comitancillo, Oax. **24/11/2015**

No. DE OFICIO: DEP.299/15

**C. GUADALUPE ARENA ORTIZ
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN AGRONOMÍA
P R E S E N T E**

Habiendo analizado la Tesis Profesional de Titulación Integral titulada: **“ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y DETECCIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN ENSILADOS DE DIFERENTES ESPECIES FORRAJERAS DE CORTE”** Que presenta ante la comisión revisora, y previo dictamen de la misma, para obtener el título de Ingeniería en Agronomía con especialidad en Zootecnia, comunico a usted que dicho documento cubre satisfactoriamente los requisitos de forma y contenido, por lo que se autoriza su edición.

ATENTAMENTE

“ESPÍRITU TECNOLÓGICO, REFLEJO DE TRABAJO Y LIBERTAD”

**ING. JESÚS SANTOS OSORIO
JEFE DEL DEPTO. DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

SEP
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE COMITANCILLO
DEPTO. DE DIVISIÓN DE
ESTUDIOS PROFESIONALES

C.c.p. Archivo.
JSO/ccm



Carretera Ixtaltepec – Comitancillo Km. 7.5
San Pedro Comitancillo, Oax. C.P. 70750
Tel (01 971) 717 21 09 y (01 971) 717 21 10, e-mail: itcomitancillo@yahoo.com.mx.
www.itcomitancillo.edu.mx



ESTE PROYECTO PARA TITULACIÓN INTEGRAL FUE APROBADO POR LA COMISIÓN REVISORA DE TITULACIÓN DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COMITANCILLO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA SUSTENTAR EL EXAMEN PROFESIONAL DE **GUADALUPE ARENA ORTIZ** PARA LA CARRERA DE:

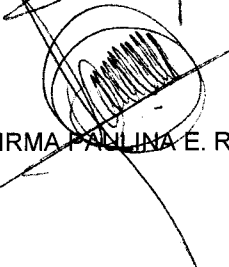
ING. EN AGRONOMIA CON ESPECIALIDAD EN ZOOTECNIA

PREVIA REVISIÓN DE FORMA Y CONTENIDO POR EL COMITÉ DE ASESORÍA DESIGNADO CON ANTERIORIDAD POR LA DIRECCIÓN DEL PLANTEL

COMISIÓN REVISORA


M.C. ZULMA CASTILLEJOS ANTONIO

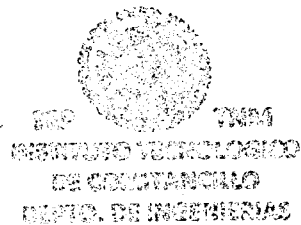

M.C. JUAN RENDON CRUZ


M.C. IRMA PAULINA E. RIVERA NUÑEZ


ING. SUGEISY L. JIMENEZ ANTONIO

Vo. Bo.


M.C. IRMA PAULINA E. RIVERA NUÑEZ
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS





“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Anexo III

Formato de liberación del proyecto para Titulación Integral

San Pedro Comitancillo, Oax., **23/noviembre/2015**

OFICIO No. DI. 483/2015.

ASUNTO: Liberación de proyecto de titulación integral

ING. JESUS SANTOS OSORIO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
PRESENTE.

Por este medio le informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para Titulación Integral.

Nombre del egresado:	GUADALUPE ARENA ORTIZ
Carrera:	ING. EN AGRONOMIA CON ESPECIALIDAD EN ZOOTECNIA
No. de control:	09800315
Nombre del proyecto:	"ANALISIS BROMATOLOGICO Y DETECCION DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN ENSILADOS DE DIFERENTES ESPECIES FORRAJERAS DE CORTE"
Producto:	TESIS PARA TITULACION INTEGRAL

Aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
"ESPÍRITU TECNOLÓGICO, REFLEJO DE TRABAJO Y LIBERTAD"

M.C. IRMA PAULINA E. RIVERA NUÑEZ
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS

M.C. ZULMA CASTILLO EJOS ANTONIO ASESOR	M.C. JUAN RENDON REVISOR 1	M.C. IRMA PAULINA E. RIVERA NUÑEZ REVISOR 2	ING. SUGER L. JIMENEZ ANTONIO REVISOR 3
---	-------------------------------	--	---

C.p. Archivo.
IPERN/urs



DEDICATORIA

A mis abuelos Miguel Ortiz y Esther Aguilar por ser el máximo ejemplo de superación, trabajo, honestidad y formalidad, y porque donde quiera que se encuentren, sé que están felices de este logro.

A mi madre Leticia E. Ortiz Aguilar, porque es mi heroína y por enseñarme a perder el miedo ante cualquier obstáculo o adversidad.

A Mariana, Emilio, Sofía y a mi ahijado Alfonso, porque quiero ser un ejemplo de esfuerzo y perseverancia.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser mi primer maestra, por todo el apoyo en todos mis años de estudiante. por no dejarme perder la fe en mí y por todo su apoyo moral y económico durante todo el proceso que se llevó la elaboración de este trabajo.

A mi hermana Leticia, por ser una mujer admirable, por nunca soltarme la mano y por guiarme en todo momento.

A mi madre y hermanos Lety y Manuel por ser mi porra personal para no desistir en este proceso.

A mi esposo Federico Ortega, por apoyarme siempre en mi crecimiento profesional, por tu peculiar manera de amarme y ser mi compañero. Por ser mi primer maestro de Agronomía y Veterinaria, y sobre todo, por dejarme creer que todo es posible.

To Robert Putnam, because without you, anything of this would be possible, for you lovely support, for your economic help, for your love, for your company, for being my hero and protector. And for make me believe in all moment that I can against all.

A mi papá.

A mi asesora interna M.C. Zulma Castillejos Antonio, por aceptarme como asesorada, por creer en este proyecto, por guiarme y acompañarme en este proceso, por su paciencia y por su característica forma de hacernos poner los pies sobre la tierra.

Al personal de la U.M.D.I. Sisal, Yucatán, de la U.N.A.M., quienes me apoyaron y guiaron pacientemente durante el periodo de experimentación y obtención de resultados para este trabajo de tesis, gracias a la Dra. Ma. Leticia Arena Ortiz por aceptarme como alumna y por el apoyo académico y económico. A la Dra. Gabriela Gaxiola, al Dr. Juan Carlos Maldonado, y en especial a la M.C. Karla Susana Escalante, por guiarme de forma tan eficaz, paciente y profesional.

Al M.C. Juan Rendón Cruz y al M.V.Z. Antonio Ordaz por aceptarme y hacer posible mi traslado del Tecnológico de Conkal al Tecnológico de Comitancillo permitiéndome así, continuar con mi superación académica.

A mis queridos y admirados profesores del Tecnológico de Comitancillo, Oaxaca, por su eterno apoyo, paciencia y por los conocimientos que me brindaron en el

transcurso de mi carrera. En especial al Ing. Leandro Marcos y al M.C. Pedro Márquez.

A la Dra. Alejandra Moreno del Laboratorio de Suelo, Agua y Planta del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, por su apoyo y trato amable, al personal involucrado en el proceso de los análisis bromatológicos, por su apoyo y enseñanzas express con el equipo de laboratorio y por recibirme todos los días con ese trato cálido y amable que caracteriza a la gente de Yucatán.

A todo el personal administrativo y jefes de departamento del Instituto Tecnológico de Comitancillo que tuvieron que lidiar conmigo y mis peticiones, y que pacientemente me atendieron.

A la M.C. Irma Paulina E. Rivera Núñez, Jefa del Departamento de Ingenierías, por ser pieza fundamental en mi proceso de convalidación, por todo su apoyo académico y por dirigirse a mí y atender mis necesidades siempre de forma íntegra y profesional. Y por ser mi amiga.

Al Ingeniero Luis A. Ramos, por su cariño y amistad, por acompañarme y guiarme en el último recorrido tortuoso de este proceso, por ser un revisor paciente, y la parte conciente de mi cerebro mientras estuve perdida o derrotada.

A la Ingeniera Nayeli Rosas “La Millán”, por ser un ejemplo de lucha y persistencia. Por enseñarme que no importa qué, para adelante es el camino.

Al Ingeniero Omar Rocha y a Ana Cristal Orozco por el material aportado para el proceso experimental, pero sobre todo por su amistad y todo su apoyo moral.

A la familia Chiu de Tolosita, Oaxaca, por proporcionarme parte del material vegetal para realizar este trabajo. En especial a Carlos Chiu y a Ezequiel “Cheke” por su energía y mano de obra, y por ser una súper mancuerna de buen humor que hicieron menos denso el camino.

Y gracias a todas las personas que se convirtieron en obstáculos, que insistieron en entorpecer mi crecimiento profesional, que me maltrataron o intentaron lastimarme y hacerme desistir, a todas ellas gracias también por ayudarme a desarrollar un alto sentido de paciencia, persistencia, inteligencia y astucia.

INDICE

	Pág.
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE ANEXO.....	vii
CAPITULO I INTRODUCCIÓN	8
1.1 OBJETIVOS.....	11
1.2 HIPÓTESIS.....	12
CAPITULO II FUNDAMENTO TEÓRICO	13
2.1 La importancia de las gramíneas forrajeras.....	13
2.1.1 Características de las gramíneas forrajeras sometidas a estudio.....	14
2.1.1.1 Cubano verde (<i>Pennisetum purpureum x P. Glaucum</i>).....	14
2.1.1.2 King grass (<i>Saccarum sinense</i>).....	15
2.1.1.3 Cubano Morado (<i>Pennisetum purpureum</i>).....	15
2.1.1.4 Tanzania (<i>Panicum maximum cv. Tanzania</i>).....	16
2.1.1.5 Mombasa (<i>Panicum maximum cv. Mombasa</i>).....	17
2.1.1.6 Maíz Zapalote chico (<i>Zea mays L.</i>).....	18
2.2 Conservación de forrajes por medio del ensilado.....	19
2.2.1 Proceso de ensilado.....	19
2.2.1.1 Fases y microorganismos que intervienen en el proceso de ensilado.....	20
2.2.1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	22
2.2.1.3 BAL Heterofermentativas y homofermentativas.....	23

2.2.2 Uso de aditivos en el ensilado.....	23
2.2.2.1 Melaza.....	25
2.2.3.2 Maíz molido.....	25
2.2.3.3 Ácido fosfórico.....	26
2.3 Análisis bromatológicos en ensilados.....	26
2.3.1 Proteína cruda.....	27
2.3.2 Fibra detergente Neutra (FDN) y Fibra detergente Ácida (FDA).....	28
2.3.3 Humedad.....	28
2.3.4 Cenizas.....	29
2.4 ADN Metagenómico.....	29
2.5 Técnicas de biología molecular.....	30
2.6 Índices de diversidad.....	31
2.6.1 Índice de Shannon-Weaver.....	32
2.7 Investigaciones realizadas sobre análisis bromatológicos y detección de comunidades bacterianas en ensilados de distintas especies forrajeras.....	32
CAPÍTULO III PROCEDIMIENTO.....	41
3.1 Elaboración de ensilados.....	41
3.1.1 Especies forrajeras utilizadas.....	41
3.1.2 Preparación de material a ensilar.....	42
3.1.3 Aplicación de aditivos.....	43
3.1.4 Periodo de maduración.....	43
3.2 Descripción de tratamientos.....	43
3.3 Toma de muestras.....	44
3.4 Conservación de muestras.....	44

3.5 Análisis Bromatológico.....	45
3.5.1 Determinación de Humedad según la norma AOAC-934.01	45
3.5.2 Determinación de Cenizas según la norma AOAC-934.03	45
3.5.3 Determinación de Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA) Método de Van Soest.....	46
3.5.4 Proteína con el método Kjeldahl.....	46
3.6 Detección de comunidades bacterianas.....	47
3.6.1 Extracción de ADN metagenómico.....	47
3.6.1.1 Metodología.....	48
3.6.2 Visualización de ADN.....	49
3.6.3 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	49
3.6.4 DGGE.....	50
3.6.5 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	51
3.7 Análisis de la información.....	52
3.7.1 Análisis de resultados del análisis bromatológico.....	52
3.7.2 Dendrograma (Método del vecino más cercano).....	52
3.7.3 Índice de Shannon-Weaver.....	53
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
4.1 Resultados.....	54
4.1.1 Contenido Nutricional.....	54
4.1.2 Extracción de ADN metagenómico.....	56
4.1.3 Amplificación por PCR.....	57
4.1.4 DGGE Electroforesis de gel con gradiente desnaturizante	58
4.1.5 Riqueza de especies.....	59
4.1.6 Diversidad bacteriana.....	60

4.1.7 Dendrograma.....	62
4.1.8 Índice de Shannon-Weaver.....	64
4.2 Discusión.....	71
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
5.1 Conclusiones.....	73
5.2 Recomendaciones.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXO.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Fotografía del gel de extracción de ADN metagenómico.....	57
2. Fotografía del gel resultante del PCR.....	58
3. Fotografía del gel de DGGE con conteo de bandas	59
4. Número de OTU's por muestra de ensilado.....	60
5. Dendrograma de índices de diversidad.....	64
6. Abundancia relativa de ensilado de Cubano Morado con aditivo...	66
7. Abundancia relativa de ensilado de Cubano Morado sin aditivo....	67
8. Abundancia relativa del ensilado de Cubano Verde sin aditivo.....	67
9. Abundancia relativa de ensilado de Cubano Verde con aditivo.....	68
10. Abundancia relativa de ensilado de maíz Zapalote chico.....	68
11. Abundancia relativa de ensilado de Tanzania con Mombasa con aditivo.....	69
12. Abundancia relativa de ensilado de King grass sin aditivo.....	69
13. Abundancia relativa de ensilado de King grass con aditivo.....	70
14. Abundancia relativa de ensilado de Tanzania con Mombasa sin aditivo.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Cuadro con material y equipo para extracción de ADN metagenómico.....	47
2. Cuadro con los resultados del análisis bromatológico expresado en porcentaje.....	56
3. Resultado de la secuenciación.....	61
4. Datos de diversidad de especies identificadas.....	62
5. Índice de Shannon.....	65

ANEXO

Proceso de ensilado.....	80
Extracción de ADN metagenómico y Electroforesis (DGGE).....	82

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la ganadería en la región del Istmo de Tehuantepec Oaxaca, demanda una creciente producción de forrajes para cubrir las necesidades alimenticias del ganado. Entre las condiciones biofísicas y socioeconómicas imperantes en la región, cabe mencionar la incidencia de vientos fuertes durante la mayor parte del año, el incremento constante de las áreas ensalitradas, la existencia de suelos con texturas pesadas (arcillosos) difíciles de labrar, la escasez de mano de obra y las tradiciones y costumbres regionales son factores que influyen en que el desarrollo óptimo de los cultivos agrícolas sea limitado (SARH, 1983). El ensilado de cultivos forrajeros podría aportar una importante contribución para optimizar el funcionamiento de los sistemas de producción animal en zonas tropicales y subtropicales (Wilkins et al.,1999, citados por Oude et al., 2000).

La elaboración de ensilado es una práctica que se realiza en todo el mundo con el objetivo de preservar los alimentos ya sean granos, forrajes o subproductos para ser almacenados y que estos conserven todo su valor nutritivo para luego ser proporcionados para la alimentación animal (González, 2013).

Ciertos cultivos muestran deficiencias en algunos componentes nutritivos esenciales para una buena dieta para rumiantes. Al suplir los elementos deficitarios con uno o varios aditivos en el momento de ensilar se mejora el valor nutritivo del forraje (Glewen y Young, 1982, citados por Oude et al., 2000).

Para detectar el valor nutritivo de los forrajes o cualquier alimento destinado a la dieta animal es necesario hacer un análisis proximal o bromatológico que consiste en hacer el análisis químico y físico, para evaluar que los alimentos aportados cumplan con los requerimientos nutricionales del animal (Shimada, 2009)

Dentro de los silos se encuentran bacterias ácido lácticas (BAL) ejerciendo diferentes funciones en el proceso fermentativo del forraje. Las BAL están constituidas por un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, con un metabolismo estrictamente fermentativo (Holzapfel et al., 2001), presentan forma de cocos o bacilos anaerobios que producen mayoritariamente ácido

láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos, así como un bajo contenido de guanina y citosina (Axellsson, 1998).

Existen diferentes técnicas para detectar que tipos de bacterias se encuentran en determinado hábitat, entre ellas las técnicas moleculares que son rápidas y proveen un perfil de la diversidad genética de una comunidad bacteriana. Codificando el gen SSU-ARN se refleja la relación evolutiva de microorganismos y la secuencia de esos genes permite agrupar e identificarlos (Woese, 1987; Schäfer y Muyzer, 2001, citado por Avilés 2011). Entre las técnicas moleculares que emplean la amplificación de genes del RNAs se encuentran los métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tales como DGGE (Electroforesis de geles con gradiente desnaturizante), entre otras (Sanz y Köchling, 2007; Cedeño, 2005b, citados por Avilés, 2011).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Realizar el análisis bromatológico y detección de las comunidades bacterianas en ensilados de diferentes especies de gramíneas forrajeras de corte en San Pedro Comitancillo, Oaxaca.

1.1.2 Objetivo específico

Realizar el análisis bromatológico a ensilados elaborados con diferentes aditivos.

Detectar las comunidades bacterianas que existen en cada uno de los ensilados sometidos a estudio.

1.2 Hipótesis

Ha: Existe diferencia en el valor nutricional y en la biodiversidad bacteriana en los diferentes tipos de ensilado sometidos a evaluación.

Ho: No existe ninguna diferencia en el valor nutricional ni biodiversidad bacteriana entre los diferentes tipos de ensilados sometidos a evaluación.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 La importancia de las gramíneas forrajeras

Las gramíneas forrajeras, son uno de los grupos vegetales más importantes desde el punto de vista económico. El valor nutritivo de los forrajes está determinado por la presencia de altos porcentajes de sustancias nutritivas, como proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos que son necesarios para la salud, crecimiento y productividad de los animales, así como también por las adaptaciones biológicas que permiten su fácil y rápida reproducción vegetativa. En general, las gramíneas presentan una mayor cantidad de carbohidratos mientras que las leguminosas poseen más proteínas. Sin embargo, la calidad, cantidad y distribución de estos nutrientes en las plantas están influidos por factores físicos como las condiciones climáticas imperantes, la fertilidad del suelo y la época del año, así como por factores biológicos dentro de los que destaca la edad de la planta (grado de madurez), la intensidad del pastoreo y la

actividad competitiva de las malezas (Dávila y Valdés, 1995, citados por Jiménez et al., 2014).

2.1.1 Características de las gramíneas forrajeras sometidas a estudio

2.1.1.1 Cubano verde (*Pennistenum purpureum* x *P. Glaucum*)

El cubano verde es un híbrido de *Pennistenum purpureum* x *P. Glaucum*, producto del cruzamiento entre el pasto cubano CT – 169 y el cultivar de millo perla Tifton. Este fue obtenido en la estación experimental en Tifton de la Universidad de Georgia, Estados Unidos de América. Se caracteriza por una alta proporción de hojas, las cuales son largas y anchas y además no presentan pelos o vellosidades, el rendimiento de materia verde en algunas zonas experimentales llega a ser de 45.125 toneladas por hectárea con 26 % de materia seca y 11 % de proteína. La ausencia de vellosidades permite que sea cortada manualmente, por lo que se ha popularizado entre los pequeños productores. Es una buena opción para la engorda en corral en pequeñas cantidades y para la producción de forraje bajo riego. También se puede utilizar ensilado. Se recomienda dejarlo crecer desde noviembre y comenzar a usarlo en febrero siguiente. Esto permite disponer de un importante volumen de biomasa en el potrero que puede ser utilizado en la época seca (INIFAP, 2012).

2.1.1.2 King grass (*Saccarum sinense*)

Rodríguez, (1984) citado por Álvarez et al., 2014, menciona que es un híbrido entre *Pennisetum purpureum* y *P. Thyphoides*, conocido como pasto Napier; pasto híbrido elefante o pasto híbrido *Pennisetum*. La hibridación de estos pastos ocurrió naturalmente. El King Grass tiene un crecimiento erecto de sus macollos y alcanza alturas de 4-5 m, produce 30-50 retoños, los tallos de 1.4-2.4 cm de diámetro presenta pigmentaciones, los entrenudos con un largo entre los 7 y 25 cm están cubiertos completamente por las vainas de las hojas. Los retoños principalmente producen 20-30 hojas lanceoladas con superficies pubescentes y con dimensiones de 85 x 3.4 cm. La fertilización nitrogenada incrementa la producción; pero esta tiende a bajar conforme aumenta la edad de la planta por el incremento del tallo y la disminución de hojas. Los rangos van de 20 a 43 t MS/ha/año, con un manejo de cortes entre las 4 y 8 semanas de edad. Los rendimientos son muy variables y dependen de las condiciones climáticas como temperatura, duración e intensidad de luz y distribución de las lluvias y humedad; fertilidad de suelos manejo y nivel de fertilización utilizada.

2.1.1.3 Cubano Morado (*Pennisetum purpureum*)

Es una especie de la familia *Poaceae* nativa de las planicies tropicales de África

(Zimbawe) clasificada como *Pennisetum purpureum*. Es de un color verde amarilloso, pasando por un verde intenso, o un verde oscuro, sólido o con vetas moradas predominantemente púrpuras. Es una planta perenne de 1.80 a 2.00 m de altura, con las hojas aserradas de 30 a 120 cm de longitud y 2 a 4 cm de ancho. El nombre hierba de elefante deriva del hecho de que es el alimento favorito de estos animales. Tiene un vigoroso sistema de raíz. A veces en la parte basal del tallo le brotan estolones que echan raíces. El tallo es ramificado. La inflorescencia es una espiga falsa de hasta 30 cm de largo, densa, generalmente de color amarillo o marrón; y que en ocasiones puede presentarse de color violáceo. Crece altitudes desde 0 hasta 2000 msnm en regiones con precipitaciones pluviales superiores a 1500 mm; no obstante, su profundo sistema radicular le permite mantenerse en los periodos de sequía. Prospera mejor en suelos profundos y fértiles desde arcillosos hasta arenosos (INIFAP, 2012, citado por Álvarez et al., 2014).

2.1.1.4 Tanzania (*Panicum máximum cv. Tanzania*)

Perenne de porte erecto tipo macollo, su altura varía entre 1 y 1.5 m, posee hojas vellosas, largas y decumbentes. Su inflorescencia se presenta en forma de panícula, cuya floración responde a la época de lluvias. El rendimiento de cosecha de semilla es de 132 kg/ha de semilla (CORPOICA, 2014, citado por Jiménez et al., 2014).

Es un pasto exigente en Fósforo y Potasio, principalmente en la fase de establecimiento; exige suelos de fertilidad natural alta. Buena ganancia de peso animal, alta producción de hijas en su follaje (80%), y alto rendimiento de materia verde. Tanzania produce 60% más de forraje que el Guinea común. Es completamente tolerante a mosca pinta. Requiere una precipitación mínima de 800 mm/año. Produce 130 t/Ha/año de materia verde 26 t M.S/Ha/año. Resiste bien al pisoteo y tiene buena resistencia al fuego y a la sequía. Su resistencia al frío y al encharcamiento es baja. Palatabilidad y digestibilidad excelentes. La época de siembra es durante la estación lluviosa, al voleo o en surcos separados 60 cm y 20 cm entre plantas, con una profundidad de hasta 2 cm. Germinación de 10 a 20 días después de la siembra (Guiot, 2001, citado por Jiménez et al., 2014).

2.1.1.5 Mombasa (*Panicum máximum* cv. *Mombasa*)

Gramínea perenne de porte erecto, crece en macollas hasta 3 m y fuertemente cespitosa; hojas largas, anchas, toscas. La principal característica el cultivar es su alta tasa de rebrote y mayor relación hoja – tallo. Florece abundantemente; inflorescencia en forma de panícula y tiene semilla pequeña. Su rendimiento de semilla viable es alto (CORPOICA, 2014, citado por Jiménez et al., 2014).

Requiere suelos de mediana fertilidad natural. Se adapta a un rango de pH entre 5.8. Se desarrolla de los 0 a los 2500 msnm. Requiere precipitaciones de 800 mm en adelante. Tiene un contenido de proteína de 10.13 %. Digestibilidad de 55.62 %. Producción de materia seca de 33 t / Ha / año. Ganancias por hectárea de hasta 720 kg de carne en pastoreo. Utilización para pastoreo y corte. Densidad de siembra de 8.10 kg/Ha. Fertilización en siembra de 60-60-30 y de mantenimiento de 50 kg (Guiot, 2001, citado por Jiménez et al., 2014).

2.1.1.6 Maíz Zapalote chico (*Zea mays* L.)

Esta variedad de maíz presenta plantas pequeñas muy precoces, con cubierta de brácteas (totomoxtle) más marcada con respecto a cualquier otra raza, y con distribución geográfica en el Istmo de Tehuantepec (tierras bajas costeras de Oaxaca y Chiapas, México). La importancia de la raza Zapalote chico radica en su precocidad, lo que permite obtener al menos dos cosechas en el mismo terreno por año, así como su aporte a la dieta de los habitantes de la cultura zapoteca, ya que a los 60 días después de la siembra se obtienen “elotes” (mazorca tierna de maíz en estado lechoso o masoso) y a los 70 días se obtiene “maíz nuevo”. A los 80 días de la planta se despunta para favorecer el secado de la mazorca y a los 90 días ya se tiene maíz seco (Wellhausen et al., 1951, citados por Martínez et al., 2013).

2.2 Conservación de forrajes por medio del ensilado

2.2.1 El proceso de ensilado

El ensilaje es un método para conservar verde el forraje. Mediante un proceso de fermentación anaerobia controlada, se mantiene estable la composición del material ensilado durante largo tiempo a través de la acidificación del medio. El silo, a su vez, es el depósito o almacén en el cual el material a ensilar es confinado con el objetivo de llevar a efecto la fermentación. El alimento a ensilar, que se comprime con el fin de evitar la presencia de oxígeno y su posible descomposición, experimenta una serie de transformaciones bioquímicas que permiten conservarlo a través del tiempo gracias a la acción de las enzimas en la planta, que tienen lugar en los procesos respiratorios y posteriormente en el metabolismo bacteriano de los carbohidratos y proteínas del material ensilado (Valencia, et al. 2011).

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción.

Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso de ensilaje se puede dividir en cuatro fases (Weinberg y Muck, 1996; Merry et al., 1997, citados por Oude et al., 1999).

2.2.1.1 Fases y microorganismos que intervienen en el proceso de ensilado

Oude et al., (2000), describe el proceso de ensilado en las siguientes fases:

Fase aeróbica. En esta fase- que dura sólo pocas horas- el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidratasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6, 5-6,0).

Fase de fermentación. Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico. Dura de varios días hasta varias semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones al momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad de las bacterias ácido lácticas proliferará y se convertirá en la población predominante. A causa

de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0.

Fase estable. Mientras se mantenga el ambiente sin aire, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este periodo en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidratasas, y microorganismos especializados como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo.

Fase de deterioro aeróbico. Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo (p. ej. Roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje. El deterioro aeróbico ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire.

2.2.1.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos. Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos, entre otras fuentes. Además de contribuir a la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina (Ramírez et al., 2011).

2.2.1.3 Bacterias ácido lácticas (BAL) Heterofermentativas y Homofermentativas

Existen diversos géneros de BAL; sin embargo, éstas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de la glucólisis (Axelsson, 1998). Por su parte las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fofogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos, como acetato, etanol y CO₂ (Ramírez et al., 2011).

2.2.2 Uso de aditivos en el ensilado

El bajo valor de MS (materia seca) y CHS (carbohidratos hidrosolubles) de los pastos tropicales tiene como resultado una mala fermentación del material verde recién cortado. El proceso de marchitez podría ser beneficioso pero las condiciones climáticas inestables requerirían un período prolongado de maduración, lo cual puede derivar en una fermentación mala a causa de la

proteolisis producida por enzimas endógenas; a su vez se refleja en una proporción más baja de "proteína verdadera" en el forraje y en consecuencia, una proporción más alta de N amoniacal en el ensilaje. El uso de ciertos aditivos puede ser una buena alternativa para reemplazar el proceso de marchitez, particularmente con ciertos pastos con tallos gruesos y hábito erecto (*Pennisetum* spp., *Panicum* spp.) que producen una gran cantidad de biomasa, difícil de pre-acondicionar y manipular lo que hace problemática la mecanización y eleva los costos de mano de obra (Valencia et al., 2011).

Entre aditivos se manifiestan diferencias tales como la efectividad general, la adecuación para determinado tipo de forraje y la facilidad para su manejo y aplicación. La aplicación de técnicas apropiadas durante la cosecha y el ensilado no son suficientes para impedir que la fermentación inicial del ensilaje se realice en forma inadecuada. Esto puede ocurrir por presencia escasa de microorganismos ácido lácticos apropiados o por una baja concentración de carbohidratos hidrosolubles o ambos. En tales condiciones, para inducir una buena fermentación es preciso aumentar el contenido de azúcares, ya sea agregándolos directamente (por ejemplo usando melaza) o introduciendo enzimas que puedan liberar otro tipo de azúcares presentes en el forraje (Oude et al., 2000).

2.2.2.1 Melaza

La melaza es utilizada como aditivo desde hace mucho tiempo, se agrega a los forrajes tropicales a niveles entre 5 y 8 % , mientras que en los climas templados es suficiente para promover el desarrollo de niveles adecuados de ácido láctico entre 0,7 y 2 %. La importancia de utilizar una mayor cantidad de melaza en el trópico es debido a la necesidad de compensar el bajo contenido de azúcares en los forrajes, aunado a mayores pérdidas de carbohidratos por respiración y fermentación aeróbica producto de las altas temperaturas (Pezo, 1981; Salsbury et al., 1949, citados por Betancourt et al., 2003).

2.2.2.2 Maíz molido

El maíz molido se utiliza como un conservador estimulante de la fermentación láctica, aparte de ser rico en almidón, también sirve como una aportación proteica. El almidón, procedente fundamentalmente de los cereales, no es directamente utilizado por las bacterias lácticas, para ello necesita ser transformado previamente en azúcares más sencillos, mediante el ataque enzimático por amilasas. En los granos de cereales, la amilasa está siempre presente pero su acción es nula sobre los granos de almidón enteros, por lo tanto cuando el grano se muele, la amilasa puede actuar localmente de forma limitada según el grado de penetración de la enzima en el mismo. En los

cereales los granos de almidón intactos están rodeados de una membrana protectora de proteína que es preciso romper previamente, ya sea de forma mecánica o por hidratación. Los cereales contienen como media 50-55 % de almidón y 6-8 % de azúcares fermentables (Cañequé y Sancha, 1998).

2.2.2.3 Ácido fosfórico

La adición de un ácido fuerte a la masa de alimento ensilado provoca una acidificación artificial del medio que hace disminuir rápidamente el pH, limitando así la acción de las enzimas que atacan a las proteínas, e impidiendo el desarrollo de fermentaciones butíricas, favoreciendo a su vez la acción de las bacterias lácticas. El ácido fosfórico (H_3PO_4) se emplea en dosis de 1.2-1.5 litros por tonelada métrica de alimento, su principal ventaja es que suplementa el contenido de fósforo del ensilado (Cañequé y Sancha, 1998).

2.3 Análisis bromatológicos en ensilados

El análisis bromatológico es una herramienta eficaz para conocer el valor nutritivo de los forrajes ensilados ya que el valor energético, el valor nitrogenado y la ingestibilidad de los forrajes conservados vienen determinados en función de los que presenta el forraje verde en el momento de su recolección y de las

alteraciones producidas en los mismos, ligadas a las técnicas de conservación (Cañeque y Sancha, 1998).

2.3.1 Proteína cruda

El análisis proteico de los alimentos, proporciona valores asociados a la ganancia de peso de los animales, puesto que durante la digestión, las moléculas proteicas de la dieta se rompen en unidades más pequeñas, y una vez reabsorbidas, se reagrupan para formar las nuevas proteínas de los músculos y los tejidos (Zea y Díaz, 1990). Este análisis es conocido como la determinación de proteína cruda, debido a que comienza con la obtención de nitrógeno para obtener el porcentaje de proteína cruda. Este factor está relacionado con el hecho de que la proteína, en términos generales, contiene un 16 % de nitrógeno, por lo que el factor se obtiene de la relación $100/16$, en el procedimiento conocido como Método Kjeldhal, todo el nitrógeno presente en la muestra, exceptuando los nitratos y nitritos, se convierten en amonio que a su vez es liberado del medio de reacción en forma gaseosa y atrapado con un ácido débil para su titulación. Esto implica que el nitrógeno determinado de esta manera, y expresado como proteína cruda, estaría disponible para los animales (González, 2013).

2.3.2 Fibra detergente Neutra (FDN) y Fibra detergente Ácida (FDA)

Con el objeto de hacer evaluaciones más precisas de los alimentos con alto contenido en fibra como son los forrajes, Van Soest y sus colaboradores propusieron el método llamado fracciones de fibra. Primeramente se rompen las paredes celulares por medio de un tratamiento con una solución neutra de un detergente, para quedar como remanente la llamada fibra detergente neutra (FDN); su complemento es el material que desaparece, el contenido celular, que se presupone, tiene una alta digestibilidad. Después la hemicelulosa se digiere en una solución ácida detergente, al residuo se le llama fibra detergente ácida (FDA) o complejo lignocelulósico; a continuación ésta se somete a un tratamiento con una solución fuertemente oxidante de KMnO_4 (permanganato de potasio) que disuelve a la lignina, y se obtiene entonces la celulosa como remanente, la cual se estima por incineración. En cada uno de los pasos indicados, el contenido de un nutrimento específico se estima a través de su desaparición (Shimada, 2009).

2.3.3 Humedad

Todos los alimentos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y 95 % en los alimentos naturales. El

agua puede decirse que existe en dos formas generales; “agua libre” y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad y es estimada en la mayor parte de los métodos usados para el cálculo del contenido en agua. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligadas a las proteínas (Ranganna, 1977).

2.3.4 Cenizas

La cantidad de cenizas representa el contenido total de minerales en los alimentos, es decir son el residuo inorgánico que queda tras eliminar totalmente los compuestos orgánicos existentes en la muestra (AOAC, 2015)

2.4 ADN Metagenómico

Al conjunto de los genomas de microorganismos en una muestra de un nicho ecológico determinado, se le llama metagenoma (Handelsman et al., 2002., citado por Escalante et al., 2004). El ADN metagenómico representa todo el acervo genético de la comunidad (Atlas y Bartha, 2008).

2.5 Técnicas de biología molecular

Una forma de abordar el estudio de los microorganismos en ecosistemas específicos es a través de sus comunidades o consorcios. El uso de las técnicas moleculares ha facilitado la identificación y clasificación de los microorganismos, por lo que hoy es posible estudiarlos en nivel de comunidad (Atlas y Bartha, 2008; Souza et al., 2008, citados por Sánchez, 2010).

Los avances más importantes en microbiología, biotecnología y ecología microbiana en los últimos años proceden de la aplicación de técnicas moleculares para la detección de microorganismos en muestras ambientales. El desarrollo de dichas técnicas permite detectar poblaciones microbianas concretas y sus actividades sin necesidad de aislar y cultivar los microorganismos (Handelsman, 2004, citado por Sánchez, 2010).

Las técnicas que utilizan ácido nucleicos son rápidas y permiten estudiar la diversidad genética de una comunidad bacteriana. Un marcador utilizado es el gen SSU-ARN (del inglés, smallsubunitribosomal) el cual por sus características permite agrupar e identificar microorganismos (Woese, 1987; Schäfer y Muyzer, 2001, citados por Avilés, 2011).

La DGGE una de las técnicas moleculares utilizadas para el estudio de las comunidades bacterianas se basa en la diferente movilidad de los fragmentos de ADN de acuerdo a su disociación (melting). En un gel desnaturalizante se pueden, separar fragmentos de ADN de organismos que difieren en una sola base en su secuencia (Sanz y Koöchling, 2007, citados por Avilés 2011).

2.6 Índices de diversidad

Algunos índices matemáticos describen la riqueza y la distribución de especies en la comunidad; son los índices de diversidad de especies, y se utilizan para describir el conjunto de las poblaciones de una. Los índices de diversidad relacionan el número de especies y la importancia relativa de las especies individuales. Los principales componentes de la diversidad de especies son la riqueza de especies o variedad, y la uniformidad, o equitabilidad. La riqueza de especies puede expresarse mediante relaciones simples entre el número total de especies y el número total de organismos. La equitabilidad es una medida de la proporción de individuos dentro de cada especie e indica si existen poblaciones dominantes (Atlas y Bartha, 2008).

2.6.1 Índice de Shannon-Weaver

Una medida de diversidad muy utilizada es el índice de Shannon-Weaver, también conocido como índice de Shannon. Éste índice general de biodiversidad es sensible a la riqueza y a la abundancia relativa de las especies (Atlas y Bartha, 2008).

2.6 Investigaciones realizadas sobre análisis bromatológicos y detección de comunidades bacterianas en ensilados de distintas especies forrajeras.

El objetivo de Teles, et al. (2010) en el estudio “Características químicas y bromatológicas de silos de pasto elefante adicionado con tallos deshidratados de marañón”, fue evaluar el valor nutritivo del ensilado de pasto Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.). El trabajo se llevó a cabo en la Hacienda Experimental Valle de Curu, en Pentecoste, Ceará, Brasil. Para elaborar los ensilados, el pasto fue cortado y picado con una cortadora de motor y adicionando con distintos porcentajes (0, 4, 8, 12 y 16 %) de tallos deshidratados de marañón (*Anacardium occidentale*) – DCS. Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Utilizaron veinte tambos de plástico de 210 litros como unidades experimentales, en los que se colocó el pasto después de habersele agregado los distintos niveles de DCS según el

tratamiento, posteriormente fueron compactados y sellados manualmente. Después de 21 días se recolectaron las muestras de cada silo para conocer su contenido nutricional. Se determinó la materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), hemicelulosa, extracto etéreo (EE), carbohidratos totales (CT), carbohidratos no fibrosos (CNF), detergente neutro en nitrógeno insoluble (NDIN,% N total), detergente ácido en nitrógeno insoluble (ADIN, % N total), valores de pH, nitrógeno amoniacal (en el porcentaje total del nitrógeno N-NH₃,% N total), ácido láctico, ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico. Algunos de los valores que se observaron en la composición química del ensilado de pasto elefante sin aditivo (DCS) fueron; FDN 73.92 %, FDA 48.54 %, y PC 5.88 %.

Guerra et al., (2007), realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de melaza y estiércol bovino en la composición química y los valores energéticos del silo de maíz y pasto. El trabajo se realizó en el laboratorio de bromatología y nutrición animal de la Facultad de Agronomía en la Universidad Autónoma de Sinaloa, México. Evaluando seis tratamientos, los cuales fueron; T1 consistió en silo de maíz al 100 %, T2, Silo de maíz más estiércol bovino con una proporción de 85:15, T3 Silo de maíz más estiércol bovino con una proporción de 75:25, T4 Silo de pasto Sudan al 100 %, T5 Pasto sudan más estiércol bovino con una proporción de 80:20, T6 Pasto Sudan más estiércol bovino, más melaza en una proporción de 75:20:05. Se observó un

incremento en la PC ($P < 0.05$) en el silo de maíz como resultado de la adición del estiércol bovino. La composición química de los tratamientos fue variable. En el T1 (maíz al 100 %) se obtuvieron los valores MS 93.73, PC 14.40, FDN 64.65, FDA 49.55 notándose la variación en comparación al T3 (Maíz 85 % y estiércol 15 %) donde MS 93.67, PC 13.00, FDN 50.17, FDA 47.34, siendo estos dos tratamientos (T1 y T3) de los que se obtuvieron más bajos resultados de FDA y FDN, y también resultados bajos entre las variables de MS. La PC fue el valor más alto obtenido en los tratamientos (4 y 6) del pasto Sudan T4 (Sudan al 100 %) PC 14.95 y T6 (Sudan al 75 %, Estiércol 20 % y Melaza al 05 %) PC 14.40. Se observó también que la FDN fue más alta en los tres tratamientos que contenían Sudan aún con la adición de melaza. El maíz en sí dio mejores valores en cuando a FDA y FDN se refiere. Se observó también que la adición de estiércol bovino incrementó los niveles de PC. Obteniéndose también resultados similares entre el silo de maíz y el pasto sudan adicionado con melaza.

Araque (1995) con el objetivo de evaluar el contenido nutricional en ensilado del pasto de corte King Grass adicionado, suministró excremento de pollo y además utilizó como aditivos harina de maíz y melaza, dicha investigación fue llevada a cabo en el área de Guacas de Rivera, Venezuela. Como unidad experimental se utilizó un silo aéreo tipo bunker, con capacidad aproximada de 60 toneladas. El pasto King Grass (*Pennisetum purpureum*) fue previamente

establecido y fertilizado con la fórmula 15 - 15 - 15 a razón de 350 kg / ha. Al momento de la cosecha, el pasto contaba con una edad de 50 días y una altura promedio de 1,70 metros, el cual fue analizado químicamente según metodología de la AOAC. Cuando se inició el proceso del ensilaje, fue agregado excremento de pollos 30 kg, melaza 30 kg y harina de maíz 20 kg por cada tonelada de pasto King. Los tratamientos fueron To: Pastoreo (Testigo); T1: To + Silaje. El forraje del King grass sin aditivo fue analizado para la posterior comparación de resultados, donde los valores obtenidos fueron: MS 24.00, PC 7.60, Cenizas 12.41. El material después de ensilado durante 60 días, fue analizado para proteína cruda, materia seca, grasa, fibra y cenizas. Donde se obtuvieron como resultados los siguientes valores; MS 23.10, PC 9.20, Cenizas 14.20, Grasa 2.05, Fibra 28.20, Ca 1.10, P 0.46, K 1.80, Mg 0.21. De manera general se observó que todos los valores obtenidos gracias a la adición del excremento de pollo, melaza y harina de maíz al forraje de King grass, fueron superiores en comparación a los valores obtenidos del análisis del ensilado de King Grass sin aditivo.

En estudios realizados por Dormond et al., (2011) con el objetivo de evaluar la respuesta de la cáscara de banano maduro (CBM) como material de ensilaje en combinación con pasto King grass llevado a cabo en el Laboratorio de la Estación Experimental de Ganado Lechero Alfredo Volio Mata (EEGLAVM), de la Universidad de Costa Rica, fue utilizado un diseño experimental de bloques al

azar, con un arreglo factorial 4 x 6 (4 tiempos de fermentación por 6 mezclas de CBM (5, 20, 40, 60, 80 y 100 %), 3 repeticiones por tratamiento. A lo largo del proceso se midieron parámetros químicos entre los cuales destacó el comportamiento de la PC (PKG con 0% de CBM y 5 % de melaza a los 21 días de fermentación = 13.95 % de PC), donde se observó que los niveles de PC disminuyeron de 14,95 % hasta 8,67 %, inversos al % CBM (0 % al 100 %), a pesar de que ambos materiales poseen en forma individual porcentajes de PC semejantes (10.45 % y 9.56 % respectivamente). Al día 63 de fermentación, las mezclas 0 % y 10 % experimentaron un aumento ($p < 0,05$) en el porcentaje de proteína (5 % y 1,7 % respectivamente), que pudo deberse al aumento de la concentración por la pérdida de efluentes y por el efecto favorable de los CNE (carbohidratos no estructurales) que disminuyen el contenido de nitrógeno amoniacal, lo cual ayudó a la conservación de la proteína original y a aumentar la masa microbiana de alto valor proteico (Vargas et al, 1981; Chacón, 1987). La MS se incrementó ($p < 0,05$) de 9,65 % a 0 días a 13,08 % a los 63 días, la cual se estabilizó a los 21 días (12,5 %-21 días; 12,5 % - 63 días). Tanto el pasto como la cáscara presentaron porcentaje de material descompuesto parecido, lo cual indicó que la CBM no necesita carbohidratos adicionales para su fermentación, contrario al PKG al cuál se le agregó 5 % de melaza para su fermentación.

Gonçalves, et al. (2011) evaluaron la composición químico bromatológica y la

digestibilidad aparente de diez híbridos de maíz (DK265bm3, DK265, HS6, HATV2, HTV27, anjou285, Mexxal, Pistache y Buxxil) los cuáles fueron cultivados en El Instituto Nacional de la investigación Agronómica en la Unidad de Genética y de Mejoramiento de Plantas Forrajeras en Luisignan, Francia, se utilizó un diseño de bloques al azar con diez tratamientos y tres repeticiones con parcelas de 150 m². Cosechando 152 días después de la siembra, cuando los granos se encontraban en un estado de maduración ideal para el ensilado. Fueron ensilados en silos experimentales con capacidad de 1 tonelada. Después del tiempo de maduración fue tomada una muestra de cada silo, que se secó en estufa a 60°C por 72 horas y en seguida molida a 1mm para posteriores análisis de PC, azúcares solubles, cenizas, hemicelulosa, FDN y FDA. Obteniendo que los niveles más altos de PC los obtuvieron el maíz HS6 8.07 % y el DK265 7.78 %. Los valores más altos de FDN se obtuvieron del maíz HS6 44.83 % y el maíz HS5 40.89 %. Los maíces con valores más altos de FDA fueron el HS6 con 26.03 % y el maíz pistache 25.94 %.

Brusetti et al., (2008) utilizaron diferentes técnicas para estimar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas las cuales fueron evaluadas en silos preparados en cuatro diferentes cultivares de maíz, tres convencionales y uno transgénico (cv. Tundra, event Bt-176) dicho estudio fue llevado a cabo en la Universidad de Estudios de Milano, Milano Italia. Las plantas fueron cultivadas en invernaderos y cosechadas después de 30 días de crecimiento. Las

muestras del material ensilado fueron colectadas de forma sucesiva durante la fermentación y analizadas para el conteo bacteriano por varias técnicas de huellas de bases de DNA. El conteo bacteriano fue similar entre cultivares para el total de bacterias ácido lácticas (BAL) cultivables. Análisis posteriores de la composición bacteriana en 388 muestras de BAL por el ITS PCR seguido por la secuenciación del gen 16S rRNA no reveló diferencias entre cultivares. En contraste, los métodos de huellas moleculares indicaron que en los diferentes silos o cultivares hospedan diferentes comunidades bacterianas, dentro de las cuales se encontraron *Weisella confusa*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidolactico*, *Lb. perolens*, *Lb. brevis*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecium*, *W. quimichii*, *Lb. paraplantarum*, *Bacillus megaterium*.

El trabajo de investigación llevado a cabo por Wang et al., (2014) se hizo para evaluar el manejo actual de la práctica del ensilado de maíz en China, donde muestras de silo en un bunker fueron recolectadas de 14 granjas con un radio de 500 km en Beijing, China, para el análisis de los productos fermentativos y las comunidades bacterianas. Los valores de MS que contenían fueron bajos a 250 g/kg en todo el forraje (St) y en todo el maíz procedente del ensilado (Wc), los niveles de pH alcanzaron 4.48 (forraje) y 3.37 (grano) respectivamente. Solo tres de 14 silos exhibieron un radio de >1.0 de láctico a acético ácido, indicando que la presencia del ácido acético es predominante en la fermentación. Aunque el contenido de propanediol fue mínimo en la mayoría de los casos. En

contraste tres silos de (St) tuvieron gran contenido de ácido butírico, y dos de esos tres silos presentaron también alto contenido de propanol. El análisis que se hizo de electroforesis con un gradiente de desnaturalización demostró que las comunidades bacterianas fueron similares en 10 de las 14 muestras de silo. Las bandas indicaron la presencia de *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus acetotolerans* y *Acetobacter pasteurianus* en ambos silos de St y Wc, reportando altos contenidos de ácido acético encontrado sobre las muestras de silo.

Por otro lado Li et al., (2011) monitorearon las comunidades bacterianas del ensilado de maíz almacenado en un bunker de silo inoculado con 3 diferentes tipos de BAL (bacterias acidolácticas), dicho trabajo fue llevado a cabo en la Universidad de Okoyama, en Okoyama Japón. Las muestras del material ensilado fueron colectadas en 2008 y 2009 de tres granjas. El ensilado fue preparado inoculando las bacterias ácido lácticas, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus buchneri*. Ocho muestras fueron colectadas por cada bunker para silo; 4 de la zona del final “fondo” del bunker y 4 de la zona más cercana al exterior del bunker. Las comunidades bacterianas variaron más en las muestras que se tomaron en el 2008, en comparación a las muestras que fueron tomadas en el 2009. En ambos años además de las bacterias inoculadas se encontraron otras, como la *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus panis* y *Acetobacter pasteurianus*. En el 2008 fueron detectadas

Stenotrophomonas maltophilia y *Lactobacillus reuteri*. En 2009 fueron detectadas *Lactobacillus reuteri*, *Acinetobacter sp.* Y *Rahnella sp.* Demostrando así, que las diferencias entre las comunidades bacterianas pueden indicar una relación entre la locación de las muestras y los productos de la fermentación.

CAPÍTULO III

PROCEDIMIENTO

3.1 Elaboración de ensilados

3.1.1 Especies forrajeras utilizadas

Las gramíneas forrajeras que fueron seleccionadas para el presente trabajo fueron, Cubano Morado (*Pennisetum purpureum*), Cubano Verde (*Pennisetum purpureum* x *P. Glaucum*), King Grass (*Saccharum sinense*), Tanzania (*Panicum máximum* cv. *Tanzania*), Mombasa (*Panicum máximum* cv. *Mombasa*) y Maíz zapalote chico (*Zea mays* L.). Los pastos King Grass, Cubano Morado y Cubano Verde se obtuvieron en Tolosita, Oaxaca, los pastos Tanzania y Mombasa fueron obtenidos del banco de germoplasma del Instituto Tecnológico de Comitancillo de San Pedro Comitancillo, Oaxaca, el maíz Zapalote Chico se obtuvo en Ciudad Asunción Ixtaltepec, Oaxaca.

Cada una de las variedades de gramíneas fueron ensiladas después del corte en el lugar de procedencia.

3.1.2 Preparación del material a ensilar

Para la conservación del ensilado se utilizaron bolsas de plástico de 80 x 50 cm calibre 600.

En cuanto al maíz, el forraje fue picado a mano con machete para posteriormente ser ensilado sin utilizar ningún aditivo.

El forraje de las otras especies fue picado a un tamaño de partícula de 1 a 2 cm de largo con una picadora de motor marca THZ 500. Una vez picado, se fueron rellorando las bolsas, compactando cada capa con un grosor aproximado de 12 cm. En el caso de las bolsas que llevaron tratamiento con aditivo, una vez compactada cada capa, se fue agregando cada uno de los aditivos de forma uniforme (Figura A1). Una vez llegado al límite de relleno de las bolsas, estas fueron compactadas una vez más y se extrajo el aire con ayuda de una aspiradora de la marca Koblenz, posteriormente fueron selladas.

3.1.3 Aplicación de aditivos

Cada uno de los aditivos fue esparcido de forma uniforme entre cada una de las capas de forraje durante el llenado de las bolsas, la cantidad de cada uno de los aditivos entre capa y capa fue; 168 gr de maíz molido, 5.3 oz de melaza al 4% diluida en agua, y se roció cada capa con un aspersor que contenía 5 ml de H₃PO₄ (ácido fosfórico) al 85% en 1 l de agua (Figura A2).

3.1.4 Periodo de maduración

El tiempo de maduración para cada microsilo fue de 21 días a partir de su elaboración. Durante este periodo fueron almacenados en un lugar seco, fresco y oscuro.

3.2 Descripción de tratamientos

T₁ = Cubano morado + melaza al 4 % + maíz molido + ácido fosfórico al 85 %

T₂ = Cubano morado sin aditivo

T₃ = Cubano verde sin aditivo

T₄ = Cubano verde + melaza al 4 % + maíz molido + ácido fosfórico al 85 %

T₅ = Maíz Zapalote Chico

T₆ = Mezcla de Tanzania y Mombasa + melaza al 4 % + maíz molido + ácido fosfórico al 85 %

T₇ = King grass + melaza al 4 % + maíz molido + ácido fosfórico al 85 %

T₈ = King grass sin aditivo

T₉ = Mezcla de Tanzania y Mombasa

3.3 Toma de muestras

Se tomaron 9 muestras de cada uno de los silos después del periodo de maduración al que fueron sometidos (21 días). Cada una de las bolsas de microsilo fue abierta del centro de la misma y se tomaron muestras del interior (Figura A3).

3.4 Conservación de muestras

De las 9 muestras obtenidas de cada silo, 3 fueron conservadas con etanol al 75%, 3 fueron sometidas a congelación, y 3 fueron embolsadas y selladas herméticamente para transportarlas en fresco (Figura A4).

3.5 Análisis bromatológico

3.5.1 Determinación de Humedad bajo la norma AOAC-934.01

Método mediante el cual se obtiene el contenido de materia seca en plantas y alimentos. Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición de la Unidad de Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) de la UNAM campus Sisal, Yucatán, donde se procedió a mantener 3 g de cada muestra en un horno a 105 °C por 24 horas obteniendo el resultado a partir de la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{\% de Humedad} &= \frac{\text{Peso perdido en el secado (g)} \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}} \\ &= \frac{(\text{PC} + \text{Pmh}) - (\text{PC} + \text{Pms}) \times 100}{\text{g muestra}} \end{aligned}$$

Dónde: PC= peso del crisol

Pmh= peso de muestra húmeda

Pms= peso de muestra seca

3.5.2 Determinación de Cenizas bajo la norma AOAC-934.03.

Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición de la UMDI, UNAM, donde se utilizaron crisoles con 3 g de cada muestra manteniéndolos en una mufla a 500 °C por 12 horas.

Obteniendo el resultado a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

3.5.3 Determinación de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácido (FDA)

Para el análisis de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se utilizó el método de Van Soest el cual se aplica para determinar los componentes de la pared celular en alimentos vegetales fibrosos utilizando un aparato de digestión ANKOM (analizador de fibra) (Figura A5). Dicho análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de análisis de suelo, agua y planta del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán.

3.5.4 Proteína con el método Kjeldahl

Para el análisis de Proteína se desarrolló el procedimiento en el Laboratorio de análisis de suelo, agua y planta de Conkal donde se analizó el nitrógeno total expresado como

proteína en muestras foliares mediante el método de Kjeldahl (1883) , determinando el contenido de nitrógeno total en forma de amonio de las muestras.

3.6 Detección de comunidades bacterianas

3.6.1 Extracción de ADN metagenómico

El método de extracción de ADN metagenómico utilizado en el presente trabajo estuvo basado en adsorción de sílice y precipitación con etanol (Rojas et al., 2008, citado por Escalante, 2014), el cual funcionó para todos los tejidos (Cuadro 1). Dicho trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética molecular de la UMDI.

Cuadro 1. Material y equipo y para extracción de ADN metagenómico (Escalante,2014).

Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Acetato de Potasio 5M • Agua destilada estéril • Buffer TE • Buffer TEN • Dodecil Sulfato de sodio (SDS) al 20% (p/v) • Etanol al 70% (v/v) • Lizosima • Oxido de silicio (SiO₂) al 4% (p/v) • Proteinasa K (solución de 20 mg/ml) • Solución de RNAsa (2mg7ml) 	<ul style="list-style-type: none"> • Balanza Analítica • Baño de calentamiento a 30°C • Baño de calentamiento a 37°C • Baño de calentamiento a 65° C • Baño de calentamiento a 55° C • Baño de hielo/alcohol • Cronómetro • Centrífuga refrigerada • Microespátula • Micropipeta de 1000µl con puntas. • Micropipeta de 200µl con puntas. • Micropipetas de 10µl con puntas. • 4 tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, por muestra. • Vortex

3.6.1.1 Metodología

1. Se pesaron de 0.1 a 0.2 g de cada una de las muestras de los silos.
2. Se añadió 1 ml de buffer TEN, y se maceró la muestra con ayuda de un pistilo para tubos de 1.5 ml y se agregó 20µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Figura A6)
3. Se incubó durante 1 hora a 55° C (Figura A7).
4. Se añadió 20µl (Figura A8) de la solución de lisozima (10 mg/ml en buffer TE) y se incubó a 37° C por una hora, a los 30 minutos de adicionaron 10µl de RNasa (2mg/ml). Se agitó por inversión cada 10 minutos.
5. Transcurrido el tiempo se colocó viales por 10 minutos en un baño de hielo/alcohol y luego se incubó 5 minutos en un baño a 65° C (Figura A9) Repitiendo 3 veces el mismo ciclo.
6. Se añadieron 100µl de SDS al 20% (p/v) (Figura A10) y se agitó en el vortex por 1 minuto.
7. Se incubó a 30° C por treinta minutos.
8. Se centrifugó a 10000 xg a temperatura ambiente.
9. Se pasó el sobrenadante a nuevos viales y se les añadió 500µl de potasio 5M.
10. Se incubó 5 minutos a 65° C y 20 minutos en un baño de hielo/alcohol.
11. Se centrifugó 30 minutos a 12000 xg a 4° C.
12. Se pasó el sobrenadante (Figura A11) a un nuevo vial y se añadieron 200µl de la suspensión 4% (p/v).
13. Se agitó por inversión durante 3 minutos.

14. Se centrifugó 2 minutos a 11000 xg a temperatura ambiente.
15. Se lavó la pastilla (Figura A12) dos veces con 1 ml. De etanol 70% (v/v) sin agitar y se centrifugó cada vez 2 minutos a 11000 xg a temperatura ambiente.
16. Se dejó evaporar el alcohol manteniendo los tubos abiertos por 2 minutos sobre la mesa.
17. Se re-suspendió la pastilla en 60µl de agua destilada estéril.
18. Se incubó 5 minutos a 55° C Con agitación ocasional.
19. Se centrifugó 5 minutos a 10000 xg a temperatura ambiente.
20. Se pasó el sobrenadante a un nuevo vial cuidando de no tomar sílice.
22. Se guardaron los tubos en congelación (-20 o - 80° C), para su uso posterior.

3.6.2 Visualización de ADN

Para visualizar el ADN se realizó una electroforesis en geles de agarosa (Figura A13) al 2% en donde se observó ADN libre de contaminación con ARN y no degradado.

3.6.3 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

El análisis de las comunidades bacterianas presentes en las diferentes muestras de ensilado se realizó utilizando las regiones variables del gen 16S ARNr mediante el uso de cebadores (iniciadores o primers), una secuencia rica en GC (guanina, citosina) fue

agregada en el extremo 5', comúnmente llamada GC-clamp (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989, citados por Avilés, 2011), la secuencia rica en GC actúa como un alto dominio de melting que previene que dos hebras de ADN se disocien completamente en una sola hebra, el tamaño del GC-clamp puede variar entre 30 y 50 nucleótidos (Muyzeret al.,1997). El equipo empleado para la PCR fue un termociclador IQ 5 de la casa comercial BIO RAD®.

3.6.4 DGGE (Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante)

Los productos de la PCR fueron desnaturalizados en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante. Para la electroforesis se empleó el equipo Dcode de la casa comercial BIO RAD® (Figura A 14). Cada juego de cebadores tienen un porcentaje de desnaturalización específico, en este caso se hizo una DGGE para los amplicones que resultaron de la PCR, en la literatura se establece que el porcentaje de desnaturalización es de 40 a 60% (Nikolausz *et al.*, 2005; El Fantroussi *et al.*, 1999; Befring *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2008, citados por Avilés, 2011).

La electroforesis fue corrida a 60 °C por 20 horas a 70 volts en una solución buffer de TAE 1 X, posteriormente el gel fue teñidos con SYBR GREEN® (INVITROGEN) por 60 minutos. Pasado el tiempo de incubación en el SYBR el gel de DGGE fue digitalizado por medio de un fotodocumentador Quantityone marca BIO RAD®. Los patrones de

bandas serán analizados por su intensidad en pixeles y por presencia o ausencia para realizar los análisis que se describen posteriormente. La recuperación del ADN del DGGE se llevó a cabo cortando cada banda del gel, las bandas fueron colocadas en tubos eppendorf y re-suspendidas en 50 µl de agua estéril, se dejaron eluir 24 horas en refrigeración, posteriormente se realizó una PCR con los cebadores correspondientes al grupo que se realizó el DGGE, los productos de la PCR de la reamplificación de las bandas fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la casa comercial Promega.

En el caso de la electroforesis del DGGE se calcularon índices de diversidad de acuerdo a la intensidad de pixeles de cada banda y cada banda se considera un Unidad Taxonómica Operacional (OTU, es el elemento que se va a clasificar, según Sneath y Sokal, 1973).

3.6.5 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

La última etapa de los productos de la purificación del DGGE fue que se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, la cual consistió en la comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo en bases de datos, las secuencias de Actinobacterias y bacterias ácido lácticas se analizaron en el software en línea Rapid Annotationusing Subsystem Technology (MG-RAST), con los siguientes

parámetros: valor de E: 1e-05; tamaño mínimo del alineamiento: 100 pb; base de datos: Ribosomal Database Project (RDP).

3.7 Análisis de la Información

3.7.1 Análisis de resultados del análisis bromatológico

Los resultados obtenidos (en porcentajes) de los análisis bromatológicos fueron analizados detectando y comparando a las muestras de ensilado que presentaron el mayor valor nutritivo y según su tratamiento.

3.7.2 Dendrograma (Método del vecino más cercano)

Para el análisis de las comunidades bacterianas se hizo un Análisis Cluster para identificar a los tratamientos que presentaron similitud en cuanto a la biodiversidad presente en las muestras analizadas.

3.7.3 Índice de Shannon-Weaver

Se utilizó el índice de Shannon-Weaver para medir la riqueza y abundancia relativa de las especies bacterianas existentes en las muestras de los diferentes tratamientos de ensilado que fueron analizados. Esta medida se calculó en base a las bandas de los perfiles obtenidos del DGGE, tomando en consideración el número y la intensidad relativa (medida en pixeles) de las bandas en una línea individual, calculándola con la siguiente ecuación:

$$H^1 = -\sum P_i (\ln P_i) \quad \text{Donde } P_i \text{ es la intensidad relativa de las bandas en un perfil}$$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Contenido nutricional

En el Cuadro 2 se muestran los resultados del análisis bromatológico realizado a las nueve muestras de ensilados, dónde se pueden observar los porcentajes de Fibra Detergente Neutro, Fibra Detergente Ácida, Proteína, Cenizas y Humedad.

Los ensilajes que presentaron mayor contenido de Fibra detergente neutra (FDN) fueron a los que no se les aplicó aditivos, como el de Mombasa y Tanzania sin aditivos con 80.79 %, Cubano Morado sin aditivos 78.86 % y King Grass sin aditivos 78.53 %.

Los tratamientos con menor FDN fueron el King Grass con aditivos 48.99 % de y el Cubano Verde con aditivos 47.06 %.

El ensilado con mayor porcentaje de Fibra Detergente Acida (FDA) fue el ensilaje de Tanzania y Mombasa sin aditivos con 58.84 % y el de menor porcentaje en esta variable fue el King Grass sin aditivos con 42.46 %.

Los ensilados de pastos con mayor contenido de PC fueron el de Cubano Morado con aditivos 8.25 % y Cubano Verde con aditivos 7.25 %. El mayor contenido de PC se presentó en el ensilado de Maíz zapalote chico con 9.68 %.

Se presentó mayor porcentaje de humedad en ensilado de King Grass sin aditivos con un 80.86 % y el que presentó menor porcentaje de humedad fue el de Tanzania y Mombasa con aditivos con un 71.68 %.

En la prueba de cenizas, el que presentó mayor porcentaje fue el Cubano Verde sin aditivos 2.27 % y el de menor porcentaje fue el Tanzania y Mombasa sin aditivos 1.92 %.

Cuadro 2. Análisis Bromatológico de los ensilados expresados en porcentaje.

TRATAMIENTO	FDN	FDA	PROTEINA	CENIZAS	HUMEDAD
MAIZ ZAPALOTE	55.19	45.10	9.68	2.21	75.04
KING GRASS SIN ADITIVOS	78.53	42.26	5.94	2.24	80.86
KING GRASS CON ADITIVOS	48.99	46.59	5.65	2.11	76.92
CUBANO VERDE CON ADITIVOS	47.06	46.36	7.25	2.20	79.32
CUBANO VERDE SIN ADITIVOS	63.90	56.84	7.07	2.27	79.40
CUBANO MORADO CON ADITIVOS	58.87	45.87	8.25	2.19	72.50
CUBANO MORADO SIN ADITIVOS	78.86	61.30	3.86	2.10	78.81
TANZANIA Y MOMBASA CON ADITIVOS	69.58	49.14	5.35	2.08	71.68
TANZANIA Y MOMBASA SIN ADITIVOS	80.79	58.84	4.60	1.92	72.56

4.1.2 Extracción de ADN metagenómico

Para visualizar el ADN se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2 % (Figura 1) en donde se observó ADN libre de contaminación con ARN y no degradado. Sagova et al., (2008) citados por Avilés, 2011, mencionan que diferentes rendimientos de ADN se pueden deber a la sensibilidad o la tasa de agresividad de los métodos individuales de extracción en la evaluación de la comunidad microbial; esto se debe a que diferentes partículas se adhieren al

ADN y a la presencia de otros organismos lo cual tiene que ver con la sensibilidad del método de extracción.

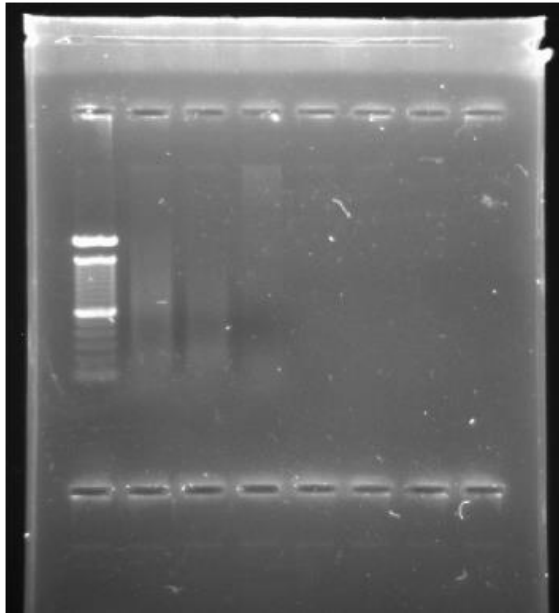


Figura 1. Gel resultante de la extracción de ADN metagenómico

4.1.3 Amplificación por PCR

Los productos de la PCR se amplificaron al ser desnaturalizados y los perfiles de bandas que se obtuvieron caracterizan el número, posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas (Avilés, 2011) como se muestra en la figura 2.

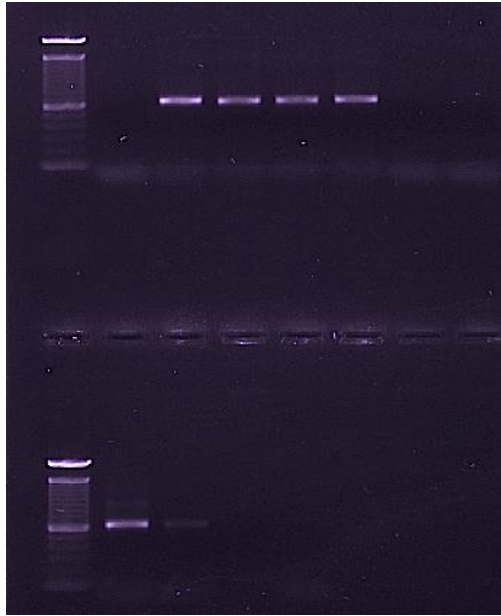


Figura 2. Amplificación por PCR

4.1.4 Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Se realizó una DGGE a los amplicones obtenidos para tener un estimado de la diversidad bacteriana presente en los distintos tipos de silo con los que se trabajó, con un porcentaje de desnaturalización del 35 % al 55 %, en donde se pudo observar en cada banda la biodiversidad que se obtuvo de cada muestra.

En la DGGE de los silos en sus diferentes tratamientos se obtuvieron 17 OTU's (Unidad Taxonómica Operacional) distintos, en donde se observó que el ensilado del Cubano Morado sin aditivos tuvo la mayor diversidad con 13 OTU's, y el Zapalote chico así como el Cubano Verde con aditivos presentaron

la menor diversidad con 3 OTU's, (Figura 3) su identificación es; MA. Cubano Morado con Aditivos, MS. Cubano morado sin aditivos, VS. Cubano Verde sin aditivos, VC. Cubano verde con aditivos, MZ. Maíz Zapalote Chico, TMC. Tanzania y Mombasa con aditivos, KC. King Grass con aditivos, KS. King Grass sin aditivos, TMS. Tanzania y Mombasa sin aditivos.

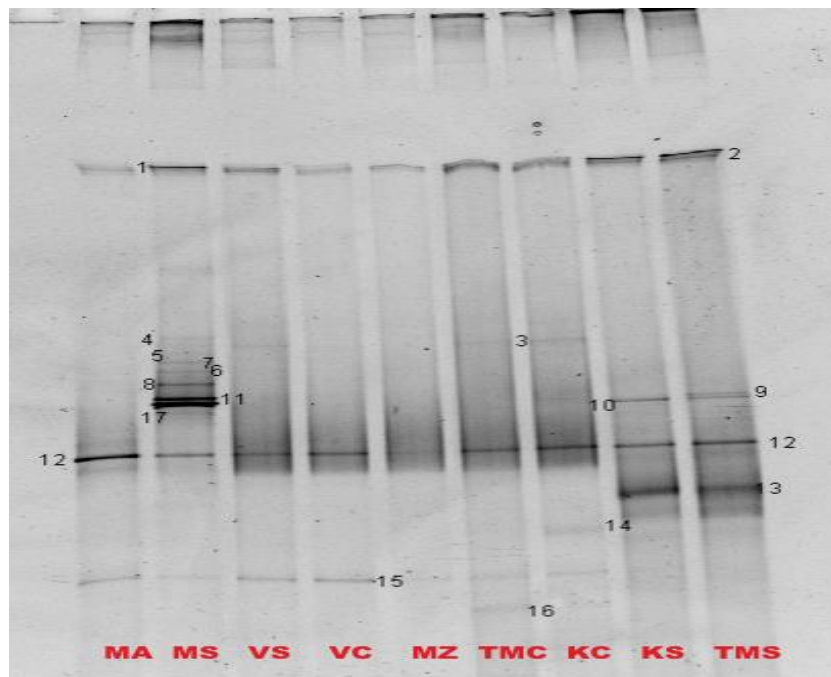


Figura 3. Conteo de bandas de cada una de las muestras de silo

4.1.5 Riqueza de especies

En la figura 4 se muestra la cantidad de unidades taxonómicas operacionales (OTU's) que se detectaron de cada muestra de material ensilado, obteniendo

que; MA 5 OTU's, MS 11 OTU's siendo ésta la de mayor diversidad bacteriana, VS 4 OTU's, VC 3 OTU's, MZ 3 OTU's, TMC 5 OTU's, en la muestra de KGC 5 OTU's, KGS 6 OTU's, y en la muestra de TMS 7 OTU's.

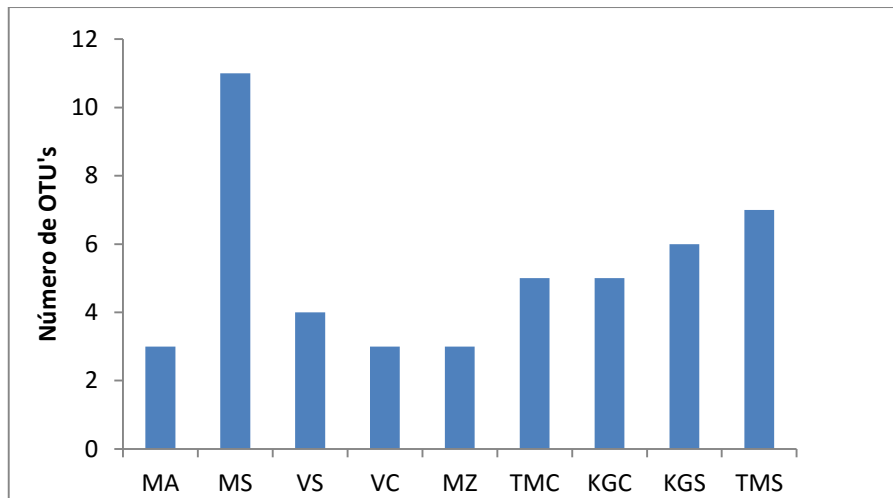


Figura 4. Número de OTU's por cada muestra de silo.

4.1.6 Diversidad Bacteriana

De los productos que se purificaron y se enviaron a secuenciar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, se identificaron los siguientes grupos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la secuenciación

No. De OTU	Bacterias identificadas
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i>
4	<i>Clostridium sp</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i>
5	<i>Clostridium sp</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i>
6	<i>Clostridium sp</i>
7	<i>Clostridium sp</i>
8	<i>Clostridium sp</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i>
9	<i>Lactobacillus hamsteri</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus sp</i>
10	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Clostridium sp</i>
11	<i>Clostridium sp</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i>
12 a	<i>Lactococcus lactis</i>
12 b	<i>Lactococcus lactis</i>

Se encontró similitud de organismos, estando presente en todas las muestras la bacteria *Lactococcus lactis*. En 7 de las 9 muestras se identificó a la *Clostridium sp*. y en 5 de las 9 muestras se identificó a la *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*.

Posteriormente, se hizo la identificación del tipo de bacteria de cada banda perteneciente a las diferentes muestras de silo obteniendo como resultado que de las bacterias que se pudieron identificar, el ensilaje con mayor diversidad

fueel del King Grass con aditivo, y se puede verificar en la siguiente tabla (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tabla con los datos de la diversidad de especies identificadas

Diversidad de especies	Muestras de silo								
	CMCA	CMSA	CVSA	CVCA	MZCH	TMCA	KGCA	KGSA	TMSA
<i>Clostridium sp</i>		+	+						
<i>Lactobacillus plantarum</i>			+			+	+		+
<i>Lactobacillus pentosus</i>			+			+	+		
<i>Lactobacillus hamsteri</i>							+		+
<i>Lactobacillus crispatus</i>							+		+
<i>Lactobacillus sp</i>							+		+
<i>Clostridium acetobutylicum</i>		+							
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium tyrobutiricum</i>								+	

Identificación de muestra: **CMCA** Cubano morado con aditivos, **CMSA** Cubano morado sin aditivos, **CVSA** Cubano verde sin aditivos, **CVCA** Cubano verde con aditivos, **MZCH** Maíz Zapalote Chico, **TMCA** Tanzania y Mombasa con aditivos, **KGCA** King grass con aditivos, **KGSA** King grass sin aditivos, **TMSA** Tanzania y Mombasa con aditivos.

4.1.7 Dendograma (Método del Vecino más cercano)

En la figura 5, se observa el análisis del vecino más cercano para la DGGE

obtenido de los distintos tratamientos de material ensilado donde se pudo observar que existe relación entre el tipo de tratamiento y la biodiversidad.

En el dendograma se puede observar que se formaron 5 grupos con similitudes en tratamiento e índice de diversidad.

Los tratamientos 4 (Cubano verde con aditivos) y el 5 (maíz Zapalote chico) formaron un grupo al ser los de menor diversidad.

El segundo grupo es conformado por los tratamientos 1 (Cubano morado con aditivos), 3 (Cubano verde sin aditivos), 6 (Tanzania y Mombasa con aditivos) y 7 (King grass con aditivos) observando que a tres de estos cuatro tratamientos si se les aplicó aditivos.

El siguiente grupo lo conforman los tratamientos 8 (King grass sin aditivo) y 9 (Tanzania y Mombasa sin aditivo) a ambos tratamientos no se les aplicó aditivo y solo presentan una unidad taxonómica operacional de diferencia.

Los tratamientos 6 (Tanzania y Mombasa con aditivos), 7 (King grass con aditivos) y 8 (King grass sin aditivos) formaron el cuarto conglomerado.

El quinto grupo que presentó similitud por el mayor índice de diversidad y por ser tratamientos a los que no se les aplicó aditivos lo conforman los tratamientos 2 (Cubano Morado sin aditivos), 8 (King grass sin aditivo) y 9 (Tanzania y mombasa sin aditivo).

Índices de diversidad

Dendrograma, Método Vecino más Cercano

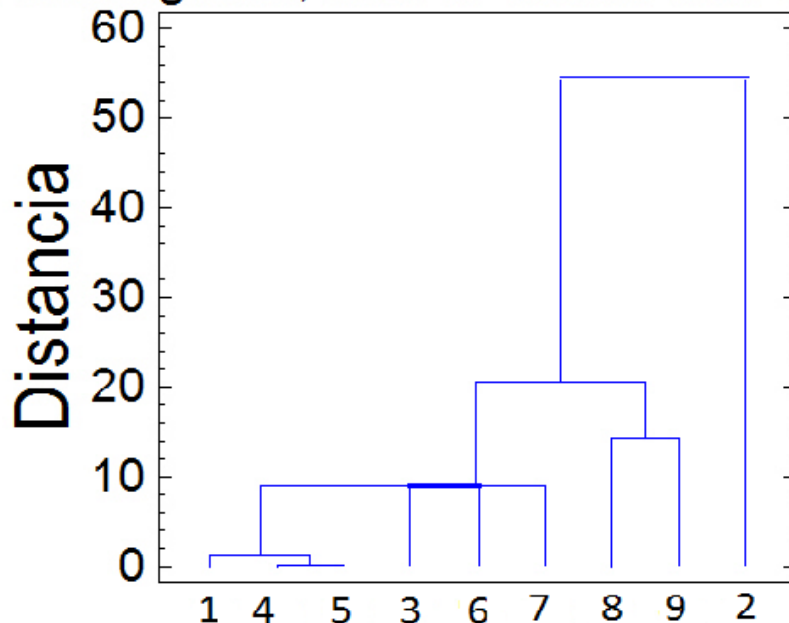


Figura 5. Dendrograma de índices de diversidad bacteriana resultante del DGGE. Identificación: 1= Cubano Morado con Aditivos, 4= Cubano Verde con Aditivos, 5= Maíz Zapalote Chico, 3= Cubano Verde sin Aditivos, 6= Tanzania y Mombasa con Aditivos, 7= King grass con Aditivos, 8= King grass sin Aditivos, 9= Tanzania y Mombasa sin Aditivos, 2= Cubano Morado sin Aditivos.

4.1.8 Índice de Shanon-Weaver

En el cuadro 5 se observan los índices de abundancia relativa de cada uno de los tratamientos en base al índice de Shannon-Weaver (H'). Observando que los tratamientos con mayor abundancia relativa son el CMSA $H' = 39.11$, TMSA

$H' = 24.85$, $KGSA H' = 21.36$ y los tratamientos con menor abundancia relativa son el $CVCA H' = 10.71$, el $MZCH = H' 10.71$ y el $CVSA H'=14.26$.

Cuadro 5. Índice de Shannon estimado para cada tratamiento.

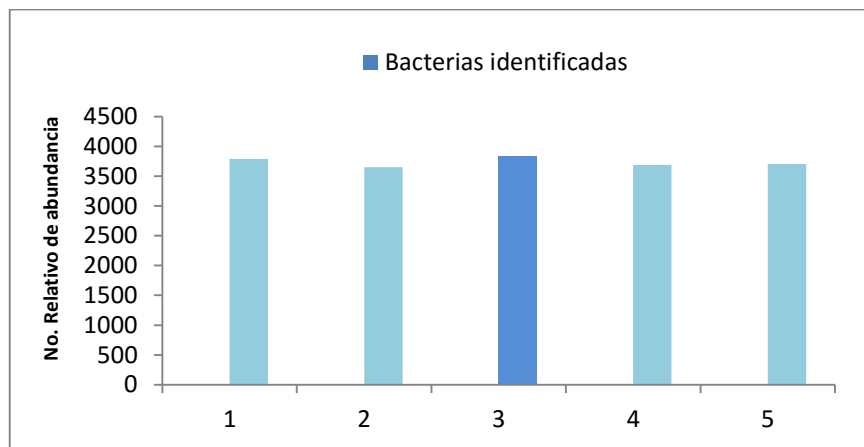
TRATAMIENTO	DIVERSIDAD (H')
CMCA	17.85
CMSA	39.11
CVSA	14.26
CVCA	10.70
MZCH	10.71
TMCA	17.84
KGCA	17.81
KGSA	21.36
TMSA	24.85

CMCA Cubano morado con aditivos, **CMSA** Cubano morado sin aditivos, **CVSA** Cubano verde sin aditivos, **CVCA** Cubano verde con aditivos, **MZCH** Maíz Zapalote Chico, **TMCA** Tanzania y Mombasa con aditivos, **KGCA** King grass con aditivos, **KGSA** King grass sin aditivos, **TMSA** Tanzania y Mombasa con aditivos.

En las figuras 6 a la 14 se puede observar en cada una el Número relativo (medido en pixeles, los cuales se utilizan como auxiliares representativos de una aproximación para dar idea de la abundancia de un organismo, en este caso, las bacterias detectadas) de abundancia de cada bacteria detectada

(OTU) en las muestras de material ensilado, se obtuvo un conteo relativo de cada una de ellas ya sea que hayan sido identificadas o no identificadas (Cuadro 4 con los resultados de la secuenciación). En cada gráfica se toma en cuenta el orden (de izquierda a derecha) de aparición de las bandas por cada tratamiento durante la DGGE (Figura 3).

En la figura 6 se observa que la OTU con mayor número relativo de abundancia fue perteneciente a la única bacteria identificada (Barra 3), la *Lactococcus lactis*.



. Figura 6. Número relativo de abundancia en el ensilado de Cubano Morado con aditivos.

En la figura 7, se puede observar que el ensilado del Cubano Morado sin aditivos fue el ensilado con el mayor número de OTU's así como de bacterias identificadas, todas pertenecientes al género *Clostridium* siendo la de mayor número relativo de abundancia la OTU perteneciente a la Barra 2.

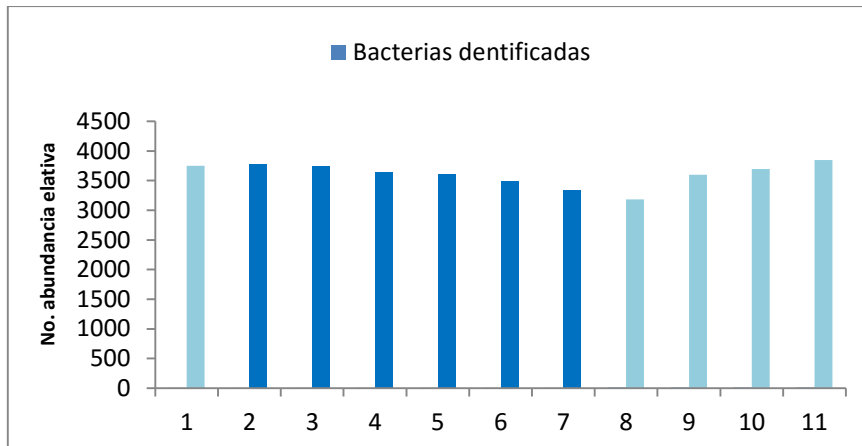


Figura 7. Número relativo de abundancia en el ensilado de Cubano Morado sin aditivos.

En la figura 8 se observa que las bacterias identificadas fueron la *Lactobacillus plantarum* siendo esta la de mayor número relativo de abundancia (Barra 2), y la *Lactococcus lactis* (Barra 3)

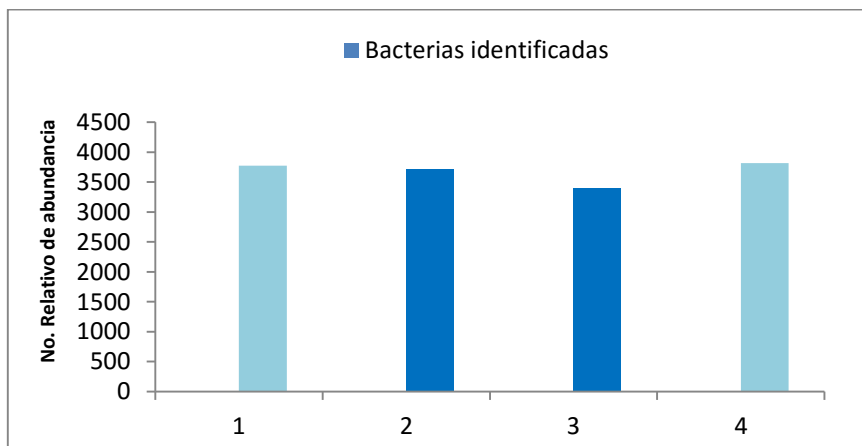


Figura 8. Número relativo de abundancia del ensilado de Cubano Verde sin Aditivo.

En la figura 9 se logra observar que la OTU con menor número relativo de abundancia fue perteneciente a la única bacteria identificada (Barra 2), la *Lactococcus lactis*.

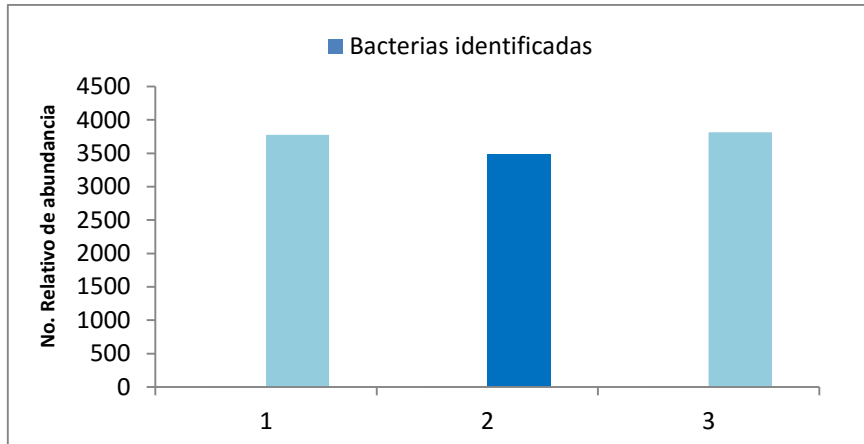


Figura 9. Número relativo de abundancia del silo de Cubano Verde con Aditivos.

En la figura número 10 se puede observar que la OTU con menor número relativo de abundancia fue perteneciente a la única bacteria identificada (Barra 2), la *Lactococcus lactis*.

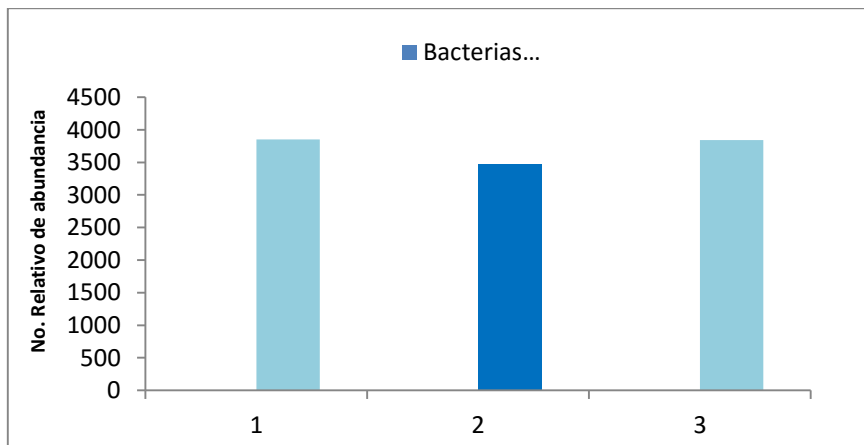


Figura 10. Número relativo de abundancia en ensilado de Maíz Zapalote Chico.

En la figura 11, se observa que en el ensilado de Tanzania y Mombasa con aditivos la única bacteria identificada fue la *Lactobacillus plantarum* quedando en tercer lugar en cuanto al número relativo de abundancia (Barra 2).

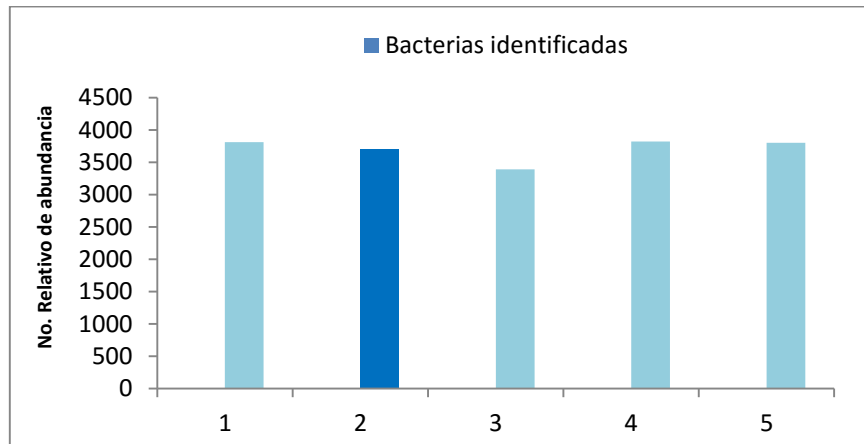


Figura 11. Número relativo de abundancia en ensilado de Tanzania y Mombasa con aditivos.

En la figura 12, la bacteria identificada fue la *Lactobacillus plantarum* (Barra 2), quedando en cuarto lugar respecto al número relativo de abundancia.

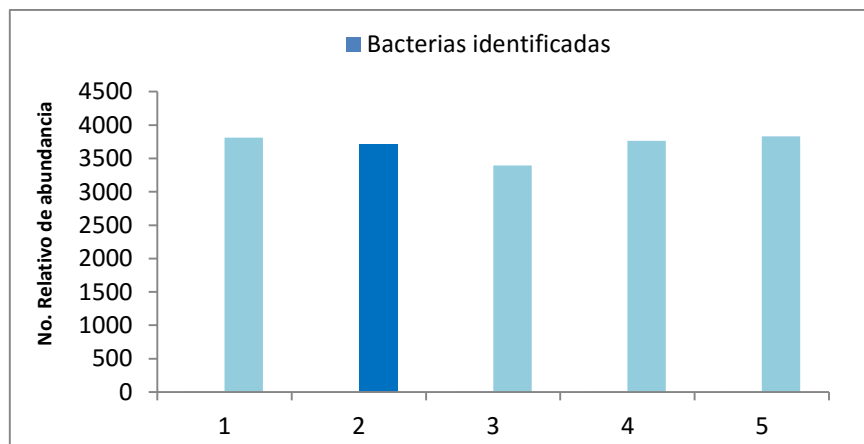


Figura 12. Número relativo de abundancia del ensilado de King grass con aditivos.

En la figura 13 se puede observar que las bacterias detectadas en este silo fueron la *Clostridium tyrobutiricum* (Barra 2) siendo ésta también la de mayor número relativo de abundancia con respecto a las demás. Y la otra detectada fue la *Lactococcus lactis* (Barra 3) quedando en segundo lugar en cuanto al número relativo de abundancia.

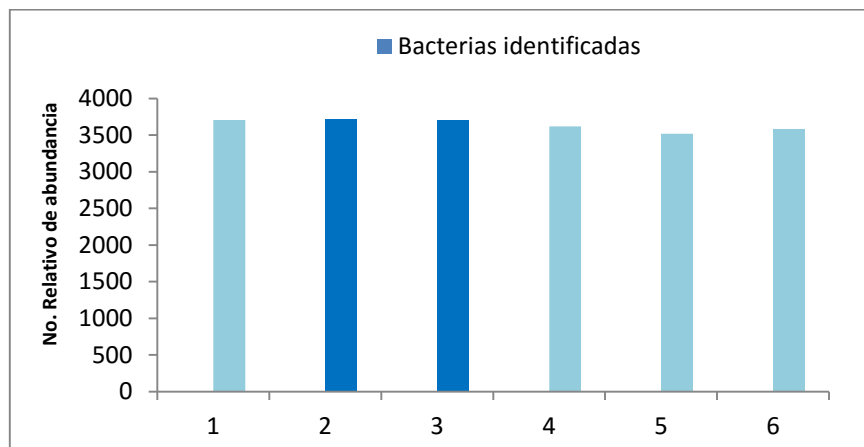


Figura 13. Número relativo de abundancia en el ensilado de King grass sin aditivos.

En la figura 14 se puede observar que la bacteria identificada con mayor Número Relativo de abundancia en comparación con las demás, fue la *Lactococcus lactis* (Barra 3). La otra bacteria identificada fue la *Lactobacillus hamsteri* (Barra 2).

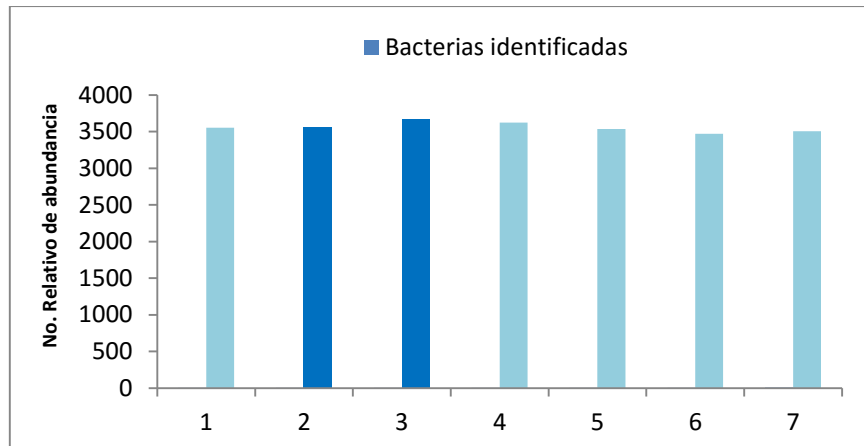


Figura 14. Número relativo de abundancia en el ensilado de Tanzania y Mombasa sin aditivos.

Los tipos de bacterias que se detectaron con mayor frecuencia fueron las *Clostridium sp*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hamsteri* y *Lactococcus lactis*, todas ellas microorganismos benéficos asociadas con el proceso de ensilaje con actividades como; fijación de nitrógeno, productoras de proteínas heterólogas, fermentadoras de glucosa y productoras de ácido láctico.

4.2 Discusión

En cuanto al análisis bromatológico se observó que los tratamientos a los que se les agregó aditivos presentaron un porcentaje más elevado de PC y disminución en el porcentaje de FDN en comparación a los ensilados a los que no se les aplicó ningún aditivo. Así mismo Teles et al., (2010) también obtuvieron diferencia en cuanto a los valores de PC (aumento) y FDN

(disminución) al adicionar con tallos deshidratados de marañón al silo de *Pennisetum purpureum*.

De igual forma, Guerra et al., (2007), en el estudio que realizaron para evaluar el efecto de adición de melaza y estiércol bovino en silos de maíz observaron aumento en los niveles de PC y disminución en los porcentajes de FDN. Cabe mencionar que el resultado que obtuvieron en el análisis de PC que llevaron a cabo los autores antes mencionados, fue menor (9.60 %) que al obtenido en el presente estudio (9.68 %).

Dentro de las comunidades bacterianas hubo similitud de especies (en los 9 tratamientos) como las bacterias ácido lácticas (BAL) *Lactococcus lactis* y la *Lactobacillus plantarum*, al igual que Wang et al., (2013), la *Lactobacillus plantarum* fue también detectada en la mayoría de las muestras de ensilado que analizaron. Por otro lado, Wang et al., (2013) y Ly et al., (2011) no reportan en los resultados de los análisis efectuados al ensilado de maíz haber detectado a la BAL *Lactococcus lactis*, la cual, si estuvo presente en este estudio al analizar las muestras de ensilado de maíz Zapalote chico.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se demostró que si existe diferencia numérica en el valor nutricional y en la biodiversidad bacteriana entre los diferentes tipos de ensilados y sus tratamientos.

Del análisis bromatológico se obtuvo que a los ensilados de las gramíneas a las que se les aplicó aditivos, aumentaron los niveles de proteína, sobre todo en los pastos Cubano Morado y Cubano Verde.

Se observó que los ensilados con mayor Fibra Detergente Neutra fueron la

mezcla de Tanzania y Mombasa sin aditivos, Cubano Morado sin aditivos y King Grass sin aditivos.

En cuanto a las comunidades bacterianas, se concluyó que la presencia de las clases de bacterias encontradas fue un indicador de que los ensilados llevaron el proceso fermentativo correcto, no hubo contaminación ni se detectaron microorganismos indeseables. Se detectó que las gramíneas con mayor comunidad bacteriana son el Cubano Morado sin aditivos, el King Grass con aditivos y la mezcla de Tanzania y Mombasa sin aditivos. Es importante señalar que la biodiversidad bacteriana se vio disminuida en presencia del aditivo en algunos silos como fue el caso del Cubano Morado y el Cubano Verde.

5.2 Recomendaciones

1. Como complemento y seguimiento a este estudio es recomendable realizar algunas pruebas de preferencia y análisis de consumo en rumiantes.

2. Es importante continuar con las investigaciones realizadas en este trabajo, ensilando gramíneas forrajeras de otras especies y con aditivos diferentes a los utilizados en este estudio.

3. Se sugiere que se haga una clasificación en base al funcionamiento de las bacterias involucradas en el proceso fermentativo que puedan ser aisladas para su uso individual.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez H. G., Cabrera R. A. y Cabrera R. E. 2014. Evaluación de la productividad de 5 gramíneas forrajeras de corte en San Pedro Comitancillo, Oaxaca. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico de Comitancillo. San Pedro Comitancillo Oaxaca. pp. 28-31
- AOAC international 2015. Oficial methods of analysis. http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC
- Atlas R. M. y Bartha R. .2008. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. España. Addison Wesley. Pp. 191.192
- Araque H. C. 1995. Evaluación del King grass ensilado con excremento de pollo (yacija) en el engorde de mautes. Zootecnia Tropical.13 (1) pp. 3-16
http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt1301/texto/evaluaciondelking.htm
- Avilés G. 2011. Estudio de la microbiota del sistema digestivo en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán. pp. 31-33.
- Axelsson L. 1998. Lactic Acid Bacteria. Classification and Physiology. New York. Editorial Marcel Dekker. pp. 617
- Betancourt M., Martínez de A., Bravo J., Razz R. y Clavero T. 2003. Efecto de la melaza, ácido fórmico y tiempo de fermentación sobre el contenido de proteína cruda y nitrógeno amoniacal en silaje de *Leucaena leucocephala*. Revista Zootecnia Tropical. 21 (3) sin pp.http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079872692003000300005&script=sci_arttext
- Brusetti L.; Borin S.; Rizz A.; Mora D.; Soriini C. y Daffonchio D. Exploration of methods used to describe bacterial communities in silage of maize (*Zea mays*) cultivars. Environmental Biosafety Magazine. 2008. 1(7):25-33.www.ebr-journal.org

- Cañeque M. Y Sancha S. 1998. Ensilado de Forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes. España. Editorial Grupo Mundi-Prensa. pp. 31-32.
- Dormond H.; Rojas A.; Boschini C.; Mora G. y Sibaja G. Evaluación preliminar de la cascara de banano maduro como material de ensilaje, en combinación con pasto King grass. (Nota Técnica) InterSedes. 2001. 12(23) pp.17-31
<http://www.redalyc.org/pdf/666/66622603002.pdf>
- Escalante K. 2014. Manual de Técnicas Moleculares. Universidad Nacional Autónoma de México. Sisal Yucatán. México.
- Gonçalves G.; Barriere Y.; Emile J.C.; Cabreira C. y Cavalcanti O. (2011). Valor nutritivo de silagem de dez híbridos de milho. Nota Científica. Animal Sciences. 33(3) pp. 255-260.
- Guerra J.E.; Riveros B.J.; Gastelum M.A.; Córdova A.; Rodríguez J.; Soto L.E.; Moreno J.; López L.; Corrales A. y Baca S. Chemical composition and energetic value of corn and sudan grass silage added with molasses and bovine faeces. ISAH.2007. Tartu, Estonia.
http://www.isah-soc.org/documents/2007/TARTU_2007/Proc_ISAH_2007_Volume_I/21_Guerra%20Liera.pdf
- González A. 2013. Evaluación de la composición nutricional de miscrosilos de King Grass y Pasto Saboya en dos estados de madurez con 25% de contenido ruminal de bovinos faenados en el Camal Municipal del Canton Quevedo, Ecuador. Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador. pp. 10-15.
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/1633>
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important Features of probiotic microorganisms in food and Nutrition. American Journal of clinical nutrition, 73 (2) pp. 365-373
- Jiménez T. A., Antonio B. E., Paredes A. E. y Ortiz R. R. 2014. Efecto de cuatro frecuencias de corte en el comportamiento agronómico de gramíneas forrajeras tropicales, en San Pedro Comitancillo, Oaxaca. Memoria de Residencia. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Comitancillo.
- Li Y. y Nisinho N. (2011). Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus Buchneri*. Journal of applied Microbiology. 110 (6): 1561-1570. 10.1111/j.1365-2872.2011.05010.x
- Martínez A. I., Pérez R. R. y Santiago S. M. 2013. Diagnóstico, moni toreos de campo e identificación del cultivo de maíz criollo para su conservación dentro del área de influencia de las regiones prioritarias Istmo Oaxaqueño y Yautepec-Istmo. Memoria de Residencia.

Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Comitancillo.

- Muyzer, G., De Waal E.C. and Utterlinden, A.G. 1997. Profiling of complex Microbial Populations by Denaturing gradient gel electrophoresis Analysis of Polymerase Chain reaction Amplified Genes Encorin for 16SrRna. Appl. Environ. Microbiol. 59 (3) pp. 695-700
- Oude E.; Driehuis F.; Gottschal J.C. y Spoelstra S.F. 2000. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Memoria de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. <http://www.fao.org/docrep/005/x8486s/x8486s00.htm>
- Ramírez R. J., Rosas U. R., Velázquez G. M., Ulloa J. y Arce R. F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente. 2 (7) sin pp. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Ranganna S. 1977. Manual of analysis of fruits and vegetable products. New Delhi, India. Mac Graw Hill. https://books.google.co.in/books/about/Manual_of_Analysis_of_Fruit_and_Vegetabl.html
- Sánchez Z. J. 2010. Caracterización de la población microbiana del tracto digestivo del cerdo pelón mexicano consumiendo dietas altas en fibras. Protocolo de Investigación. Posgrado institucional en ciencias agropecuarias y manejo de recursos Naturales Tropicales. Universidad Autónoma de Yucatán. Pp. 15-17
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (1983). Guía para la asistencia técnica agrícola área de influencia del campo agrícola experimental Istmo de Tehuantepec. (Quinta edición). Oaxaca, México.
- Shimada A. 2009. Nutrición Animal. Segunda edición. México, Distrito Federal Editorial trillas. pp. 26-47 y 221-230.
- Sneath, P.H., and Sokal, R. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco. Freeman. <https://books.google.com.mx/books?id=W8CrAgAAQBAJ&pg=PA63&lpg=PA63&dq=sneath+and+sokal+otus&source>
- Teles M.; Neuman J.; Coutinho A.; Duarte M.; De souza M. Y Braga R. 2010 Chemical and bromatological characteristics of elephant grass silages with the addition of dried cashew stalk. Revista Brasileira de zootecnia. 39(2). <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000900007>
- Valencia C.; Hernández B. y López de B. El ensilaje, qué es y para qué sirve. Revista de Divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. La ciencia y el hombre. 24 (2) sin pp. <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/ensilaje/>

Wang C.; Han H.; Gu X.; Yu Z. Y Nishino N.; A survey of fermentation products and bacterial communities in corn silage produced in silage bunkers in China. Anim. Sci. J. 2014. 85 (1):36-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638801>

Zea S. J. y Díaz D. M. 1990. Producción de carne con pastos y forrajes. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. pp.109

ANEXO

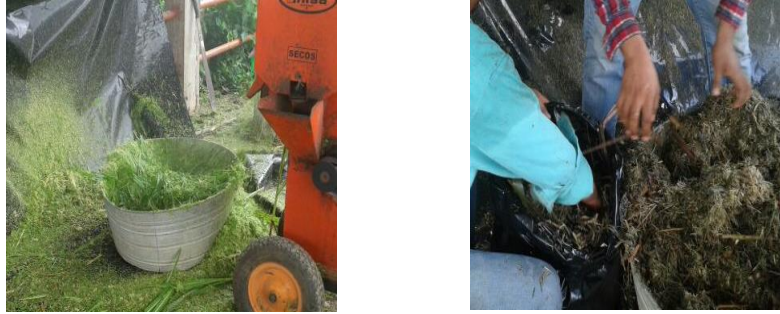


Figura A1. De izquierda a derecha; Picado del forraje, llenado y compactación de las bolsas



Figura A2. Aplicación de aditivos.



A3. Toma de Muestras.



Figura A4. Conservación de muestras. De izquierda a derecha; Muestras con etanol al 75%, Muestras que se conservaron en fresco, Muestras congeladas.



Figura A5. Maceración de la muestra en buffer TEN.



Figura A6. Incubación de muestras en un baño seco digital de la marca Labnet.

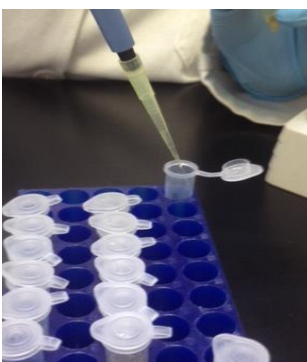


Figura A7. Se añadió 20 μ l de lizosima

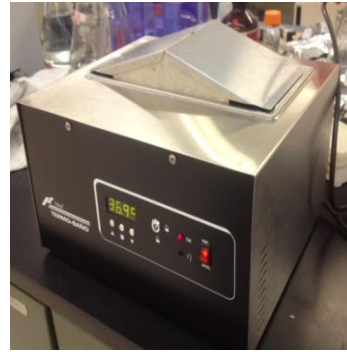
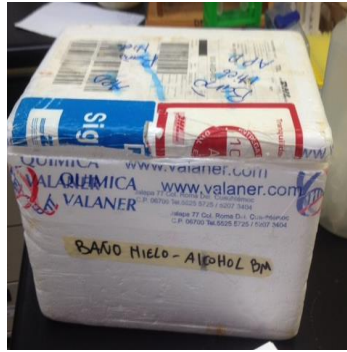


Figura A8. De izquierda a derecha, hielera para baño de Hielo/alcohol. Termo baño para incubación de muestras.

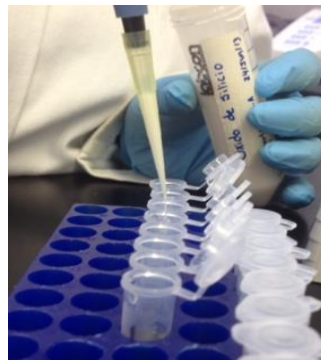


Figura A9. Aplicación de SDS.



Figura A10. Cambio de sobrenadante a viales nuevos.



Imagen A 11. Lavado de pastilla.



Imagen A 12. De izquierda a derecha, equipo y reactivos para gel de agarosa, llenado de pozas para electroforesis, gel-resultado de la electroforesis.

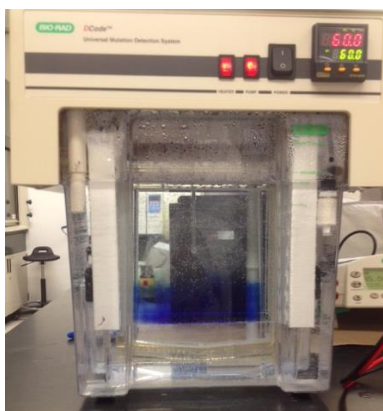


Imagen 11. Equipo para DGGE.