

**Methodological aspects for the sustainability evaluation
of agrosilvopastoral systems**

Nahed, T. J. / 3

**Abnormalities of testicular and scrotal development
in bulls of three breeds in southeast México**

Silva, C.; Delgado, R.; Magaña, J. y Reyes, A. / 21

**Pest control of jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)
with *Gliricidia sepium* (Jacq.) in Chiautla de Tapia, Puebla**

*Aragón-García, A.; Torija-Torres, A.; Avelleira-Cortés, R.;
Tapia-Rojas, A. M.; Contreras- Mora, I. R. y López-Olguín, J. F. / 33*

**Population bacteria H2-Utilizing, from gastrointestinal
tract of *Struthius camellus* (Var. domesticus)**

*Miramontes-Carrillo, J. M.; Ibarra, A. J.; Ramírez, R. M.;
Ibarra, A. F. J.; Miramontes, V. A. L. y Lezama, G. R. / 43*

***In vitro* biological control of tomato *Lycopersicon
esculentum* Mill fungous diseases**

*Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Martínez-Rojero, R. D.;
Ariza-Flores, R. Barrios-Ayala, A. y Rebolledo-Martínez, A. / 55*

Editorial

Cumplir un quinquenio de trabajo editorial representa una enorme satisfacción profesional, pues significa dar resultados de las metas trazadas. Cinco años que, como suele decirse, se escriben fáciles y se resumen de igual manera, pero en ellos se encuentra concentrada la energía —como en un grano de maíz— de un grupo de profesionales que han creído en este proyecto.

Dentro de las metas planteadas sobresalen varios aspectos: contribuir con el desarrollo de la ciencia a través de su difusión, forjando así un espacio generoso, pero a la vez, estricto en sus estándares de calidad, y abierto a las sugerencias para su mejora continua, firme en su propósito de mantener la visibilidad de la revista, con un espíritu de permanente desarrollo y claro en sus orígenes. Muestra de ello es su portada, que le ha dado frescura y un sello particular a la revista.

Asimismo, en este quinto año de su segunda época, tenemos sucesos relevantes de este proyecto académico. Haremos una breve recapitulación de los más importantes y, a su vez, queremos dar la primicia de uno de ellos.

Con el primer número de este año logramos la presencia de nuestra página electrónica (www.ucol.mx/revaiia), con ella se cristalizó un sueño planteado desde los inicios en que asumimos la responsabilidad de Rev. AIA; bajo el entendido de que es un proceso de incesante desarrollo, el cual, esperamos consolidarlo aún más con el tiempo; por ello, decidimos presentarla y exponerla virtualmente a la comunidad de usuarios de la red para recibir sus comentarios y, desde luego, difundir con mayor rapidez nuestra publicación cuatrimestral.

Por otro lado, la aceptación en REDALyC (Red de Revistas Científicas de América Latina y El Caribe, España y Portugal) de la Universidad Autónoma del Estado de México, le ha dado también una importante visibilidad, pues las estadísticas generadas en este sitio, dan muestra de este proceso, mismas que pueden ser consultadas en la siguiente dirección electrónica: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/estadisticas/Ins/EstRevRedE.jsp?iCveEntRev=837>

En ella verán que, de mayo a octubre de 2008 se indicaron 822 descargas de la revista. Dicha estadística cubre la siguiente numerología; por meses: mayo 37, junio 30, julio 32, agosto 64, septiembre 170 y octubre 489 descargas; esto significa un incremento lineal en cuanto a esas descargas realizadas, provenientes, sobre todo de México, con 52%, un 20% de Latinoamérica y 20% de origen indefinido. Tales estadísticas son lógicamente entendibles, pues aunque la revista fue aceptada el 14 de agosto de 2007 en REDALyC, fue hasta el 6 de mayo de 2008 en donde se dio de

alta el primer número. Y sabemos que, comparadas con otras revistas, pueden parecer inferiores los resultados obtenidos, pero como decía Kapitsa: “Sólo el que no hace nada, no se equivoca”.

En este recuento debo indicar el aspecto económico, apartado por demás quisquilloso en nuestras condiciones y latitudes, pero podemos estar contentos de salir airosos en estos cinco años, dado que en este último año recibimos financiamiento de la SEP a través del fondo PIFI, como lo señalamos en su oportunidad.

En cuanto a la primicia que queremos dar a conocer es un aspecto que nos llena de orgullo, pues estamos proponiendo un sistema híbrido de presentación de la revista, en donde se combina la presentación impresa con los artículos en formato digital (CD), desarrollado por la Coordinación General de Publicaciones de la propia Universidad de Colima, a cargo de su directora, la licenciada Guillermina Araiza Torres, ya que dicho factor aplicado a Rev. AIA le está dando un toque especial e innovador, pues permitirá tener una mayor difusión y visibilidad, elementos que han marcado nuestro rumbo editorial desde que asumimos la dirección de esta revista.

Finalmente, este espacio editorial lleva una muestra de profundo agradecimiento a todos aquellos que han colaborado en reiniciar, mantener, desarrollar, proyectar y difundir *Avances en Investigación Agropecuaria* desde Colima, para México, Latino América y el mundo, con la firme idea de trabajar en que más colegas se adhieran a este proyecto en pro de la ciencia.

José Manuel Palma García

Director Rev. AIA

Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill

In vitro biological control of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill
fungal diseases

Michel-Aceves, A. C.;^{1*} Otero-Sánchez, M. A.;¹ Martínez-Rojero, R. D.;¹ Ariza-Flores, R.² Barrios-Ayala, A.² y Rebolledo-Martínez, A.³

¹Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO). Av. Vicente Guerrero No. 81, primer piso. Iguala, Guerrero. México. (C. P. 40000).

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero), Campo Experimental Chilpancingo. Av. Ruffo Figueroa S/N Col. Burócratas, C. P. 39090. Chilpancingo, Gro., México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Veracruz), Campo Experimental Cotaxtla, Km 34 Carr. Veracruz-Córdoba Apdo. Postal 429 C. P. 91700. Veracruz, Ver., México.

*Correspondencia: amichelaceves@yahoo.com.mx

Resumen

El objetivo fue obtener e identificar aislados nativos de *Trichoderma* spp. en suelos sembrados con tomate en Tlayacapan, Morelos (México), con problemas de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*; asimismo, determinar su capacidad antagonística *in vitro*. *Trichoderma* se aisló directamente del suelo por el método de dilución en placa con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). La capacidad antagonística se evaluó mediante el método del papel celofán y la clase de antagonismo con la técnica de cultivos duales. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de Tukey. Se obtuvieron 20 aislados de *Trichoderma*. El rango de porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos por los aislados varió desde 38.8 a 81.3% en *A. solani*; y desde 16.3 a 85.5% en *P. infestans*. Se seleccio-

Abstract

The objective was to obtain and identify native isolates of *Trichoderma* spp. from soils cultivated with tomato in Tlayacapan, Morelos, México with incidence of *Alternaria solani* and *Phytophthora infestans*; also, to determine their *in vitro* antagonistic capacity. *Trichoderma* was isolated directly from the soil by the dilution method in Petri dish with potato-dextrose-agar (PDA) medium culture. The antagonistic capacity was evaluated throughout the cellophane technique and antagonism class with the dual cultures technique. Analyses of variance were used and mean separation was achieved using the Tukey test. 20 isolates of *Trichoderma* were obtained. The percentage of inhibition of the growth mycelium of plant pathogen for the isolates varied from 38.8 to 81.3% in *A. solani* and from 16.3 to 85.5% in *P. infestans*.

naron 10 aislados que inhibieron al menos el 65% del crecimiento, que pertenecen a las especies: *T. harzianum* (Thz), *T. longibrachiatum* (Tl) y *T. koningii* (Tk). Los aislados Tl-17, Tl-19, Tl-20, Tl-21, Thz-16 y Tk-4, seleccionados contra *A. solani*, presentan antagonismo clase 1, sobrecreciendo al fitopatógeno y esporulando sobre él. Los aislados Thz-17, Thz-18, Tl-17, Tl-18 y Tl-19 seleccionados contra *P. infestans*, presentan antagonismo clase 2 y Thz-19 antagonismo clase 3. Por su acción antagónica *in vitro* sobre *P. infestans* y *A. solani*, puede considerarse a *Trichoderma* como agente promisorio en el control biológico de las enfermedades que ocasionan estos fitopatógenos.

Palabras clave

Trichoderma harzianum, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*. Tizón tardío de la papa, Tizón temprano de las solanáceas.

Ten isolates that inhibited at least 65% of the growth were selected: *T. harzianum* (Thz), *T. longibrachiatum* (Tl) and *T. koningii* (Tk). The isolates Tl-17, Tl-19, Tl-20, Tl-21, Thz-16 and Tk-4, selected against *A. solani*, presented antagonism class 1 by over-growing the plant pathogen and sporulating on it. The isolates Thz-17, Thz-18, Tl-17, Tl-18 and Tl-19 selected against *P. infestans*, present antagonism class 2 and Thz-19 antagonism class 3. For its antagonistic action *in vitro* on *P. infestans* and *A. solani*, *Trichoderma* can be considered as a promissory agent in the biological control of the diseases caused by these plant pathogens.

Key words

Trichoderma harzianum, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, Potato late smut, Solanaceous early smut.

Introducción

Los problemas fitosanitarios constituyen el principal limitante del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en las zonas productoras de México; por su importancia económica destacan las enfermedades fungosas; en particular, el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary y el tizón temprano, ocasionado por *Alternaria solani* [Ellis y Martin], los cuales afectan ramas, pecíolos, hojas tallos y frutos, causando una disminución considerable de la producción [Fraire, 1993]. Tradicionalmente el control de estos patógenos ha sido por agroquímicos, los cuales se aplican a la semilla, follaje y al suelo, con resultados favorables; sin embargo, su uso trae como consecuencia efectos nocivos sobre el ambiente debido a su residualidad, lo que provoca que se acumulen en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales; además, generan resistencia por parte de los fitopatógenos, sin olvidar el detrimento que causa en la salud humana. Lo anterior justifica plenamente la búsqueda de agentes de control biológico (CB) como una alternativa viable al uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura.

El CB ideal considera que el antagonista se introduce solamente cuando hay necesidad de una mayor efectividad; la población antagonista no necesita ser más grande

que aquella que suprime adecuadamente al inóculo primario del patógeno o al progreso de la enfermedad; por lo tanto, para utilizar agentes de CB y tener una mayor efectividad en el registro, el mejor aliado en el control de enfermedades de plantas es contar con una gran variedad de microorganismos nativos factibles de utilizarse. Tanto los hongos como las bacterias son reconocidos por ser participantes comunes para suprimir naturalmente fitopatógenos en los cultivos, los cuales limitan la severidad de las enfermedades; por ello, es importante obtener, propagar y evaluar aislados nativos adaptadas a las condiciones ambientales para un determinado lugar. Los hongos más utilizados y conocidos en CB pertenecen a los Hyphomycetes; entre ellos, los géneros *Trichoderma*, *Penicilium* y *Gliocladium*. El género *Trichoderma* está catalogado entre los agentes de control biológico más eficientes debido al amplio espectro antagonista que presentan; las enzimas extracelulares que producen con actividad antibiótica, el micoparasitismo y por la habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas, entre otros mecanismos de acción [Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Benítez *et al.*, 2004].

Trichoderma spp., se utiliza como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp., entre otros [Zeilinger y Omann, 2007] y ha demostrado efectividad al reducir *in vivo* hasta un 65% la tristeza causada por *Phytophthora capsici* en pimiento [Ezziyani *et al.*, 2004]. Considerando lo anterior, el uso de *Trichoderma* spp. es una alternativa con potencial para el control de muchas enfermedades; sin embargo, es importante obtener y evaluar aislados nativos con suficiente capacidad antagonica para controlar a los fitopatógenos en la misma localidad referida. En este sentido, los objetivos de investigación fueron: a) Obtener e identificar aislados nativos de *Trichoderma* spp. procedentes de suelos cultivados con tomate en Tlayacapan, Morelos (México). b) Evaluar su capacidad antagonica *in vitro* sobre *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani*. Y, finalmente: c) Seleccionar los aislados más agresivos y clasificar el tipo de antagonismo.

Materiales y métodos

Localización. La investigación se realizó en el Centro de Estudios Profesionales (CEP) del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO); el cual está ubicado en el Km. 14.5 de la carretera Iguala-Cocula, México, a 18° 19' latitud norte y 99° 39' longitud oeste; a 640 m de altitud. En esta región el clima es el más seco de los sub-húmedos; la precipitación media anual es de 767 mm; y la temperatura media anual es de 26.4°C [García, 1973].

Aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp. Las muestras de suelo se colectaron en un cultivo de tomate en Tlayacapan, Morelos (México), durante el ciclo otoño-

invierno; donde las plantas presentaban los síntomas típicos del tizón temprano y el tizón tardío con una severidad del 70%, aproximadamente. En el sitio experimental primero se colectaron 5 submuestras de 1 kg de suelo, bajo los lineamientos del método cinco de oros, las cuales se mezclaron y se homogenizaron, tomándose 1 kg como representativo del lugar. La colecta fue ubicada en los primeros 20 cm de profundidad, eliminado la materia orgánica superficial. El suelo se depositó en bolsas de plástico y se transportó al laboratorio de Fitopatología del CEP-CSAEGRO y se mantuvo en refrigeración a 4° C hasta su utilización. El suelo de esta localidad se caracteriza por presentar textura franco arenosa, con una materia orgánica de 1.21% y el pH de 4.6. Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron directamente del suelo por el método de dilución placa [Nelson *et al.*, 1983]. El suelo fue diluido 1/1000 (p/v) y una alícuota de 0.5 ml de esa suspensión se dispersó uniformemente sobre la superficie de una caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las placas se incubaron a 27°C ± 1, con 12 h luz / oscuridad y 40% de humedad relativa, durante ocho días. En total se utilizaron 20 cajas Petri por la muestra de suelo colectada.

La colonia de *Trichoderma* se reconoció por su forma de crecimiento característico de parches o cojines verdes de conidias. Posteriormente, se aislaron y purificaron las colonias que aparecieron durante los cinco y siete días, después de la siembra; las colonias de 10 días se observaron al microscopio compuesto, corroborando que presentaran las características de género, como es conidióforo hialino, muy ramificado, no verticilado; fiálides individuales o en grupos, conidias hialinas de una célula, ovoides nacidas en pequeños racimos terminales [Barnett y Hunter, 1998]. Los aislados se mantuvieron a 25°C en tubos inclinados con PDA, hasta su uso.

Las especies *T. harzianum* (Th), *T. longibrachiatum* (Tl) y *T. koningii* (Tk), se identificaron con base en las claves de Rifai (1969) y con las siguientes características: Conidióforo emanado o indefinidamente dispuesto en pústulas planas. Conidias globosas a subglobosas u ovoides, menor que 3.5mm x 2.5mm corresponde a Th [Bissett, 1991]. Fiálides frecuentemente surgidas solas, particularmente hacia el ápice del conidióforo y es ramificado; produce fiálides intercalares. Conidióforo escasamente ramificado; fiálides casi cilíndricas apenas o no todas constreñidas en la base, conidia más larga que 4.0 x 2.5mm más o menos ovoide, variable en tamaño, pero usualmente más corto que 5mm corresponde a Tl [Bissett, 1984]. Fiálides surgidas en falsos verticilos, conidióforo con ramas cortas y raramente ramificado, no produce fiálides intercalares. La conidia con paredes lisas, principalmente globoso y mayor que 3.5mm de diámetro, corresponde a Tk [Bissett, 1984].

Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos. Se colectó material vegetativo enfermo, en parcelas de tomate de los productores del municipio de Tlayacapan, Morelos (México), con síntomas típicos de *A. solani* y *P. infestans*; se guardaron en bolsas de plástico y se trasladaron al laboratorio de fitopatología del CEP-CSAE-

GRO. Bajo condiciones asépticas se sembró en medio de cultivo PDA, trozos de hoja y raíz; de las colonias fungosas que se originaron, se transfirieron puntas de hifas para obtener cultivos puros. La identificación se basó en las características morfológicas, para lo cual se tomaron en cuenta el color y la forma de las colonias, la septación y la ramificación de las hifas, estructuras reproductivas [Barnett y Hunter, 1998; Romero, 1988], así como las principales características taxonómicas que permiten la identificación de cada hongo fitopatógeno.

Evaluación de la capacidad antagónica de Trichoderma spp. Se utilizó la técnica del papel celofán [Dennis y Webster, 1971a] para seleccionar aquellos aislados de *Trichoderma* que presentaran capacidad antagónica *in vitro*, al inhibir o retardar el crecimiento del micelio de *A. solani* y *P. infestans*. Se cortan círculos de 8.5 cm de diámetro de papel celofán, los cuales se esterilizan antes de colocarlos bajo condiciones asépticas dentro de la caja Petri, sobre el medio de cultivo PDA; posteriormente, se inoculó cada caja, depositando en la parte central del papel celofán con un disco de 5 mm de diámetro, de cada uno de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp., de cultivos de ocho días de edad (en promedio) crecidos en PDA. Después de la inoculación con el antagonista, las cajas se incubaron a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, con un periodo de luz fluorescente de 12 h, en un periodo de 1 a 2 días; transcurrido ese tiempo, el papel celofán se retiró con el crecimiento de *Trichoderma*, extrayéndolo cuidadosamente para evitar que alguna espora del hongo se quedara adherida a las paredes de la caja Petri o al medio de cultivo, y por lo consiguiente, continuara creciendo sobre el PDA.

Una vez retirado el papel celofán con el crecimiento de *Trichoderma*, se inoculó en el centro de esa misma caja Petri, colocando un disco de 5 mm de diámetro del fitopatógeno *A. solani* y/o *P. infestans*, según el caso. Se midió diariamente el diámetro de la colonia del hongo expresado en mm, hasta que el testigo llenó la caja Petri. Para cada fitopatógeno se tuvieron 21 tratamientos, que corresponden a las 20 aislados de *Trichoderma* y el testigo que, según el caso, *A. solani* y *P. infestans*, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones.

La variable en estudio fue el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de los fitopatógenos, el cual se calculó con base en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(D1-D2)/D1] \times 100$$

En donde: D1 = diámetro de la colonia de *A. solani* y/o *P. infestans* creciendo en cajas con PDA libre de inhibidores y D2 = diámetro de la colonia fungosa de *A. solani* y/o *P. infestans* creciendo en cajas con PDA, donde anteriormente creció *Trichoderma* spp., sobre el papel celofán, impregnando al medio de cultivo de enzimas y metabolitos secundarios producidos por este hongo inhibidor [Worasatit *et al.*, 1994].

Se seleccionaron para las siguientes pruebas *in vitro*, los aislados que inhiban 65% y 70% el crecimiento de micelio de *A. solani* y/o *P. infestans*, respectivamente.

Tasa de crecimiento y esporulación. Se sembró, en el centro de cajas Petri con PDA, un disco de 5 mm de diámetro de cultivos activos de 10 días de edad crecidos en PDA y se incubó a 25°C, 12 h luz/oscuridad y 40% de humedad relativa. Se midió el crecimiento radial diariamente con una regla graduada en mm hasta que se cubriera totalmente la superficie del medio. Se formaron 12 tratamientos que corresponden a: 10 de los aislados seleccionados de *Trichoderma* spp. y los dos fitopatógenos, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. La capacidad de esporulación se estimó visualmente después de 6 días de incubación. Se utilizó una escala arbitraria de la siguiente manera; muy abundante: cuando cubría del 80-100% la superficie del medio; abundante: cuando cubría alrededor del 50-79%; intermedia: cuando cubría aproximadamente del 11-49%; escasa: cuando se observó menos del 1-10% de esporulación en la superficie; y nula: cuando no se observó esporulación.

Clase de antagonismo de Trichoderma spp. sobre A. solani y P. infestans en cultivos apareados. Para evaluar y clasificar el tipo de antagonismo, según Bell *et al.* [1982], se utilizó la técnica del cultivo apareado [Cherif y Benhamou, 1990], midiendo la zona de interacción entre cada una de los aislados de *Trichoderma* con cada uno de los fitopatógenos. En cajas Petri con PDA se depositaron, en un extremo de la caja, discos de micelio de 5 mm de diámetro con colonias de 10 días de edad, crecidas en PDA de uno de los fitopatógenos (*A. solani* o *P. infestans*) y dos días después, a 4 cm de distancia, se colocaron discos de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* spp., con micelio de colonias de 10 días de edad, crecidas en PDA, incubándose a 25°C, 12 h luz/oscuridad y 40% de humedad relativa.

Se tomaron lecturas cada 24 horas para determinar el número de días al primer contacto entre las hifas de los dos hongos, la zona de intersección y a los 15 días después de la siembra de *Trichoderma* se clasificó el antagonismo, según la escala propuesta por Bell *et al.* [1982], donde: 1 = *Trichoderma* sobrecrece completamente al fitopatógeno y cubre totalmente la superficie del medio; 2 = *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio; 3 = *Trichoderma* y el fitopatógeno colonizan cada uno, aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro; 4 = el fitopatógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma*; y 5 = el fitopatógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa la superficie total del medio. Se evaluaron 6 tratamientos en el ensayo con *Phytophthora* y 6 en el de *Alternaria*, que correspondieron a los aislados de *Trichoderma* seleccionados para cada fitopatógeno, los cuales fueron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar, con 4 repeticiones.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), con el paquete estadístico SAS [1988]. En el caso de las variables con valores en porcentaje, antes de someterlos al ANOVA y prueba de Tukey, se transformaron mediante la fórmula $\sqrt{x+0.5}$.

Resultados

Se obtuvieron 20 aislados de *Trichoderma* spp., a pesar de presentar poca cantidad de materia orgánica y pH ácido. Todos los aislados de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento del micelio de *A. solani* (Fcal.=19.28; $P \leq 0.0001$) y *P. infestans* (Fcal.=6.60; $P \leq 0.0001$); los valores fluctuaron significativamente entre 38.8% a 81.3% y 16.3% a 85.5%, respectivamente; y en este caso, de las 20 aislados evaluadas, al menos 10 inhibieron el crecimiento de ambos hongos en un 65%. Se seleccionaron 6 aislados contra *A. solani* y 6 contra *P. infestans*; los aislados 2 y 6 fueron los únicos que lograron inhibir el crecimiento de ambos fitopatógenos (cuadro 1).

Cuadro 1. Inhibición de *A. solani* y *P. infestans* por *Trichoderma* spp., a los 12 días de incubación.

Aislado	Inhibición de la colonia (%)			
		<i>A. solani</i>		<i>P. infestans</i>
1	*	73.8	ef ^z	41.9 abcd ^z
2	* / **	67.8	def	75.2 cde
3	*	81.3	f	53.6 bcde
4	**	44.2	bc	85.5 e
5		61.4	cde	63.6 cde
6	* / **	66.5	def	82.5 de
7	**	49.3	bcd	79.1 cde
8	*	66.5	def	58.3 bcde
9		55.7	bcde	44.1 bcde
10	**	62.9	cdef	70.5 cde
11		38.8	b	16.3 ab
12		51.2	bcd	60.0 cde
13		44.8	bc	43.8 bcde
14		55.4	bcde	46.6 bcde
15		48.4	bcd	51.1 bcde
16	**	62.9	cdef	74.7 cde
17	*	73.2	ef	37.2 abc
18		58.7	cde	65.0 cde
19		43.7	bc	49.4 bcde
20		52.4	bcd	51.9 bcde
Testigo		0.0	a	0.0 a
			$P \leq 0.0001$	$P \leq 0.0001$

^z Medias dentro de columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$).

* Aislado seleccionado contra *A. solani*; ** Aislado seleccionado contra *P. infestans*.

De los aislados seleccionados se identificaron tres especies: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* Rifai y *T. koningii* Oudem (cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación de los aislados seleccionados.

<i>Aislado</i>	<i>Simbología</i>	<i>Especie</i>
1	Thz-16	<i>Trichoderma harzianum</i>
2	Tl-17	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
3	Tk-4	<i>Trichoderma koningii</i>
4	Tl-18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
6	Tl-19	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
7	Thz-17	<i>Trichoderma harzianum</i>
8	Tl-20	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
10	Thz-18	<i>Trichoderma harzianum</i>
16	Thz-19	<i>Trichoderma harzianum</i>
17	Tl-21	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

La tasa de crecimiento diario y la capacidad de esporulación de los aislados de *Trichoderma* spp., *A. solani* y *P. infestans*, se muestran en el cuadro 3. El análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas para el primer ($F_{cal.}=48.16$; $P \leq 0.0001$) y segundo día de evaluación ($F_{cal.}=804.04$; $P \leq 0.0001$). Los aislados 4 (Tl-18), 6 (Tl-19), 2 (Tl-17) y 8 (Tl-20) presentaron las mayores tasas de crecimiento con 52.3, 51.3, 47.5 y 44.3 mm/día, respectivamente, con esporulación abundante; estos mismos aislados fueron las que llenaron la caja a las 48 horas, con 85 mm. El aislado 17 (Tl-21), presentó esporulación escasa, y los aislados 10 (Thz-18), 7 (Thz-17) y 3 (Tk-4), muy abundante. Los valores más bajos correspondieron a los fitopatógenos con 5.0 y 14.25 mm/día, para *A. solani* y *P. infestans*, respectivamente.

Cuadro 3. Tasa de crecimiento diario y esporulación de *Trichoderma* spp., *P. infestans* y *A. solani*, a los 6 días de incubación.

No.	Aislado	1er día (mm)	2º día (mm)	Esporulación
4	Tl-18	52.3 a ^z	85.0 a ^z	Abundante
6	Tl-19	51.3 a	85.0 a	Abundante
2	Tl-17	47.5 a	85.0 a	Abundante
8	Tl-20	44.3 ab	85.0 a	Abundante
17	Tl-21	32.0 bc	77.3 b	Escasa
10	Thz-18	23.3 cd	48.5 cd	Muy abundante
7	Thz-17	21.8 cd	49.8 cd	Muy abundante
3	Tk-4	17.0 de	52.0 c	Muy abundante
1	Thz-17	16.3 de	46.3 de	Abundante
	<i>P. infestans</i>	14.3 de	42.8 e	
16	Thz-19	6.8 e	33.5 f	Abundante
	<i>A. solani</i>	5.0 e	7.5 g	

^z Medias dentro de columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$)

Thz = *T. harzianum*; Tl = *T. longibrachiatum*; Tk = *T. koningii*.

Esporulación: muy abundante = 80-100% de la superficie del medio; abundante = 50-79%; intermedia = 11-49%; escasa = 1-10%.

Los resultados de la interacción de los cultivos apareados se presentan en el cuadro 4. Tanto en *A. solani* como en *P. infestans*, a pesar de que se le dieron dos días de ventaja por su lento crecimiento en comparación con *Trichoderma*, los días a primer contacto entre hifas, el comportamiento fue muy heterogéneo y altamente significativo, los valores variaron de 2.0 a 3.0 días con *A. solani* (Fcal.=23.40; $P \leq 0.0001$) y 1.0 a 2.0 días con *P. infestans* (Fcal.=631.58; $P \leq 0.0001$). La mayoría de los aislados de *Trichoderma* presentaron zona de sobrecrecimiento visible con las hifas de *A. solani* y *P. infestans*. Entre mayor es el área de sobrecrecimiento, mayor es la agresividad por parte del hongo antagonico. La cepa 6 (Tl-19), presentó la mayor zona de traslape con 56.0 mm en *A. solani*, estadísticamente iguales a las demás (Fcal.=1.38; $P \leq 0.2787$) y los aislados 7 (Thz-17) y 10 (Thz-18), con 24.8 y 22.3 mm, respectivamente, en *P. infestans*, estadísticamente diferentes a las otras (Fcal.=167.55; $P \mu 0.0001$).

En *A. solani* todas los aislados seleccionados se ubicaron en la clase 1 de antagonismo y fueron capaces de sobrecrecer y esporular sobre el fitopatogéno; el aislado 3 (Tk-4), que fue el mayor porcentaje de inhibición del micelio y es considerado excelente antagonista. Para *P. infestans* todos los aislados se ubicaron en la clase 2, excepto el 16 (Thz-19), el cual mostró antagonismo clase 3. Destaca el aislado 4 (Tl-18), con el mayor porcentaje de inhibición del micelio y menor número de días al primer contacto entre hifas.

Cuadro 4. Efecto de seis aislados de *Trichoderma* sobre el desarrollo de *A. solani* y *P. infestans* en cultivos duales, a los 6 días de incubación.

No.	Aislado	Días al primer contacto entre hifas	Zona de sobrecrecimiento (mm)	Clase de antagonismo ^y
<i>A. solani</i>				
3	Tk-4	3.0 a ^z	54.8 a ^z	1
1	Thz-16	3.0 a	54.3 a	1
17	Tl-21	2.0 b	53.5 a	1
2	Tl-17	2.2 b	53.5 a	1
8	Tl-20	2.0 b	54.8 a	1
6	Tl-19	2.0 b	56.0 a	1
<i>P. infestans</i>				
6	Tl-19	2.0 a	10.3 b	2
7	Thz-17	2.0 a	24.8 a	2
16	Thz-19	2.0 a	5.5 c	3
10	Thz-18	2.0 a	22.3 a	2
4	Tl-18	1.0 b	11.3 b	2
2	Tl-17	1.0 b	10.8 b	2

^y Clase de antagonismo, según Bell *et al.* (1982). (1 = *Trichoderma* sobrecrece al patógeno y cubre toda la superficie del medio; 2 = *Trichoderma* sobrecrece 2/3 partes de la superficie del medio, detiene su crecimiento del fitopatógeno y lo puede sobrecrecer; 3 = *Trichoderma* coloniza la mitad de la superficie del medio y ningún organismo es dominante.

^z Medias dentro de columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$). Thz = *T. harzianum*; Tl = *T. longibrachiatum*; Tk = *T. koningii*.

Discusión

Un factor que puede afectar la densidad de población de *Trichoderma* spp. en el suelo, es la época del año cuando se colecta la muestra [Widden y Abitbol, 1980]; se han aislado poblaciones altas durante primavera-verano, comparado con el otoño-invierno en zonas templadas de suelos forestales. En el presente estudio, a pesar de que se colectó en invierno en una zona tropical, las poblaciones estimadas son similares a lo reportado por Roiger *et al.* [1991], quienes colectaron durante el otoño en una zona templada. Al respecto, Michel-Aceves *et al.* [2001], en otoño-invierno obtuvieron 106 aislados nativos, colectadas en 15 huertas comerciales de mango del Estado de Guerrero y 10 del Estado de Colima. Hernández [2005] en Tlaxmalac y Huitzaco, Guerrero, obtuvo durante la primavera en 15 parcelas, donde se cultiva cacahuete, 10 y 2 aislados, respectivamente. En este contexto, Arzate-Vega *et al.* [2006], obtuvieron 25 aislados en 15 huertas de plátano en la región de Costa Grande de Guerrero, particularmente en la zona platanera de Tenexpa, Guerrero.

Trichoderma spp. ha demostrado su eficiencia en el control de fitopatógenos que atacan partes aéreas y de la raíz de las plantas [Nelson, 1991]. Los valores obtenidos de inhibición son superiores a los obtenidos por Michel-Aceves *et al.* [2001; 2005a], quienes al evaluar el efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma* spp, sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, los valores máximos de inhibición fueron del 47.6% y 73.0%. Michel-Aceves *et al.* [2005b], en otra investigación, reportan un porcentaje de inhibición de 77.8%, para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [Synder y Hansen]. En un trabajo similar Arzate *et al.* [2006], al evaluar a *Trichoderma* spp., sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, seleccionaron 6 de 25 aislados que inhibieron al menos el 45% el crecimiento del micelio del fitopatógeno.

En otros trabajos con otros hongos fitopatógenos de partes aéreas y almacén se han reportado altos porcentajes de inhibición [Harman *et al.*, 1996; Castoria *et al.*, 1997; Elad, 2000]; al respecto, Michereff *et al.* [1995], al evaluar sobre una enfermedad foliar causada por *Curvularia eragrostidis* en el cultivo del Yam (ñame), indican una inhibición del 62 a 89%. En general, los resultados obtenidos concuerdan con las conclusiones de Siwek *et al.* [1997], en el sentido de que las enzimas líticas producidas por las cepas de *Trichoderma* spp., son las responsables de la inhibición *in vitro* y la producción de dichas enzimas participan también en el micoparasitismo y contribuyen al control biológico del patógeno. Además, permite hipotetizar potencial en el control del fitopatógeno bajo condiciones de invernadero y campo.

Con base en las especies identificadas, se tiene una amplia variación específica e intra específica, lo cual puede explicar la gran capacidad de adaptación de este grupo de hongos y que están adaptadas al agroecosistema de tomate en el Municipio de Tlayacapan, Morelos. Resultados similares fueron reportados por Roiger *et al.* [1991], en huertas de manzana y árboles forestales asociados a la presencia de *Phytophthora cactorum* [Lebert y Cohn] J. Schrot., agente causal de la pudrición de la corona en manzano, como un recurso de biocontrol; ellos identificaron 5 especies: *T. hamatum* [Bonord.] Bainier, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. virens* [Miller *et al.*] y *T. viride* Pers.:Fr. En este sentido, Michel-Aceves *et al.* [2001], también reportan la identificación de aislados obtenidos en huertas de mango asociadas a la presencia de *F. subglutinans* y *F. oxysporum*, agentes causales de la “escoba de bruja” del mango; entre ellas: *T. harzianum*, *T. logibrachiatum*, *T. koningii*, *T. virens* y *T. minutisporum* Rifai.

La tasa de crecimiento de *Trichoderma* y de los fitopatógenos, permite determinar si en los cultivos apareados se debe sembrar uno de ellos antes (1 o 2 días) para conocer todo el potencial de los metabolitos secundarios de los hongos [Cherif y Benhamou, 1990]. La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del

micelio [Dennis y Webster, 1971b]. En otras investigaciones de cultivos apareados entre *Trichoderma* spp. y varios fitopatógenos se han encontrado diferencias en el grado de antagonismo [Hadar *et al.*, 1979, Michel-Aceves *et al.*, 2005a y b, Arzate-Vega *et al.*, 2006].

El fenómeno de que los aislados de *Trichoderma* tuvieran contactos rápidamente hifas de *P. infestans* y *A. solani*, entre 1 y 3 días, indican que existe agresividad; en este sentido, Benhamou y Chet [1993], quienes reportan valores similares con contacto desde el segundo día después de la inoculación entre *T. harzianum* y *R. solani*, lo que muestra gran agresividad del antagonista y susceptibilidad del fitopatógeno. Sin embargo, se pueden obtener resultados diferentes, como los encontrados por Michel-Aceves *et al.* [2005a], quienes reportan días a primer contacto desde 3.7 hasta 10.7 en *F. subglutinans*. El sobrecrecimiento es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes; ésta es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio [Dennis y Webster, 1971b].

Los resultados obtenidos en la clasificación de antagonismo en ambos fitopatógenos son similares a Dennis y Webster [1971b] y Silva-Hanlin y Menezes [1997], con la mayoría de las cepas agresivas, donde generalmente el fitopatógeno sobrecrece al antagonista. Al respecto, Ribamar y Oliveira [1998], reportan clasificación antagónica de 1, 2 y 3 contra *C. gloeosporioides*. En este sentido, Michel *et al.* [2005a], reportan contra *F. subglutinans* y *F. oxysporum* clases de antagonismo 1, 2 y 3; en *Fs* se obtuvo menor número de cepas con antagonismo 1, en comparación con *Fo*. Asimismo, en otra investigación, Michel *et al.* [2005b], clasificaron el antagonismo de 20 aislados de *Trichoderma* contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* y todas resultaron clase 1; mientras que con *S. rolfii*, sólo 3 fueron clase 1 y 2, y en las demás cepas el fitopatógeno fue más agresivo. Todos los aislados con antagonismo clase 1 y 2 se consideran antagonistas muy eficientes y con potencial de biocontrol suficiente para seguir evaluándose bajo condiciones de invernadero y campo.

Conclusiones

Se obtuvieron 20 aislados y se identificaron tres especies: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. koningii*, de las cuales 10 aislados se seleccionaron por su capacidad antagónica contra ambos fitopatógenos. Los aislados Tk-4 y Tl-18 presentaron mayor capacidad inhibitoria contra *A. solani* y *P. infestans*, respectivamente. Los resultados *in vitro* indican que se tienen aislados de *Trichoderma* spp., que por su antagonismo sobre *A. solani* y *P. infestans* pueden ser agentes potenciales en el biocontrol de las enfermedades que estos fitopatógenos ocasionan.

Literatura citada

- Arzate-Vega, J.; Michel-Aceves, A. C.; Domínguez-Márquez, V. M. y Santos-Eméstica, O. A. 2006. *Antagonismo de Trichoderma spp., sobre Mycosphaerella fijiensis Morelet, agente causal de la sigatoca negra del plátano (Musa sp.) in vitro e invernadero*. Rev. Mex. Fitopatol. 24: 98-104.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. (4th Ed). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 pp.
- Bissett, J. 1984. *A revision of the genus Trichoderma. I. Section Longibrachiatum sect. nov.* Can. J. Bot. 62: 924-931.
- Bissett, J. 1991. *A revision of the genus Trichoderma. III. Section Pachybasium*. Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
- Bell, D. K.; Wells, H. D. and Markham, C. R. 1982. *In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens*. Phytopathology 72: 379-382.
- Benhamou, N. and Chet, I. 1993. *Hyphal interactions between Trichoderma harzianum and Rhizoctonia solani: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process*. Phytopathology 83: 1062-1071.
- Benítez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C. and Codon, A. C. 2004. *Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains*. Int. Microbiol. 7(4): 249-260.
- Castoria, R.; De Curtis, F.; Lima, G. and De Cicco, V. 1997. *B-1,3 glucanase activity of two saprophytic yeast and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest disease*. Postharv. Biol. & Technol. 12:293-300.
- Cherif, M. and Benhamou, N. 1990. *Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a Trichoderma sp. on Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici*. Phytopathology 80: 1406-1414.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971a. *Antagonistic Properties of species-groups of Trichoderma. I: Production of non-volatile antibiotics*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 57: 25-39.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971b. *Antagonistic Properties of species-groups of Trichoderma. III: Hyphal interactions*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 57: 363-369.
- Elad, Y. 2000. *Biological control of foliar pathogens by means of Trichoderma harzianum and potential modes of action*. Crop Protection 19:709-714.
- Ezziyyani, M.; Pérez-Sánchez, S. C.; Sid Ahmed, A.; Requena, M. E. y Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum como biofungicida para el control de Phytophthora capsici en plantas de pimiento (Capsicum annum L.)*. Anales de Biología 26:35-45.
- Fraire, S. L. 1993. *Extractos vegetales en el control del tizón temprano Alternaria solani y el tizón tardío Phytophthora infestans en jitomate, en laboratorio, campo y vivero*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 23 de Oaxaca, Oax. 106 pp.
- García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen*. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 246 pp.
- Hadar, Y.; Chet, I. and Henis, Y. 1979. *Biological control of Rhizoctonia solani damping-off with wheat bran culture of Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64-68.
- Harman, G. E.; Latorre, B.; Agosin, E.; San Martín, R.; Riegel, D. G.; Nielsen, P. A.; Tronsmo, A. and Pearson, R. C. 1996. *Biological and integrated control of Botrytis bunch rot of grape using Trichoderma spp.* Biol. Control 7: 259-266.
- Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I. and Lonto, M. 2004. *Trichoderma species-Opportunistic, avirulent plant symbionts*. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.
- Herández, N. M. M. 2005. *Control biológico de Sclerotium rolfsii Sacc. en el cultivo de cacahuete (Arachis hypogaea L.) con Trichoderma spp.* Tesis de Maestría. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Maestría en Ciencias en Producción Agrícola. UAG. Iguala, Guerrero, México. 107 pp.
- Howell, C. R. 2003. *Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolutions of current concepts*. Plant Dis. 87(1):4-10.

- Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Martínez-Rojero, R. D.; Rebolledo-Domínguez, O.; Lezama-Gutiérrez, R. y Ariza-Flores, R. 2005a. *Actividad micoparasítica in vitro de Trichoderma Pers.: Fr. spp., sobre F. subglutinans (Wollenweb. y Reinking) P.E. Nelson, T. A. Toussoun y Marasas y F. oxysporum Schlechtend.: Fr. Rev. Mex. Fitopatol. 23(3). 253-261.*
- Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Rebolledo-Domínguez, O.; Lezama-Gutiérrez, R. y Ochoa-Moreno, M. E. 2005b. *Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por Trichoderma spp., en la inhibición de Fusarium subglutinans y F. oxysporum in vitro. Rev. Chapingo Serie Horticultura 11(12). 273-278.*
- Michel-Aceves, A. C.; Rebolledo-Domínguez, O. y Lezama-Gutiérrez, R. 2001. *Especies de Trichoderma en suelos cultivados con mango afectados por "Escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre Fusarium oxysporum y F. subglutinans. Rev. Mex. Fitopatol. 19 (2): 154-160.*
- Nelson, E. B. 1991. *Current limits to biological control of fungal phytopathogens.* In: Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants. Arora, D. K.; Rai, B.; Mukerji, K. G.; Knudsen, G. R. (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 327-355.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification* (1a. Ed.). Pennsylvania: Pennsylvania State University Press.
- Rifai, M. A. 1969. *A revision of the genus Trichoderma.* Mycological papers, 116:1-56.
- Roiger, D.J.; Jeffers, S. N. and Caldwell, R. W. 1991. *Occurrence of Trichoderma species in apple orchard and woodland soils.* Soil Biol. Biochem. 23: 353-359.
- Romero, C. S. 1988. *Hongos fitopatógenos.* Chapingo, México, 347 pp.
- SAS, Institute, Inc. 1988. *SAS user's guide: Statistics.* Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC, USA. 1028 pp.
- Silva-Hanlin, D. M. W. and Menezes, M. 1997. *Antagonistic potential of Trichoderma species in controlling Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum, the causal agent of cotton wilt.* Arq. Biol. Tecnol. 40: 927-940.
- Siwek, K.; Scott, E. S. and Harris, A. 1997. *Role of antibiosis in biological control of Pythium ultimum by binucleate Rhizoctonia.* Australasian Plant Pathology Society. Eleventh Biennial Conference 29 Sept.- 2 Oct. 1997 p. 252. Perth, Australia.
- Widden, P. and Abitbol, J.J. 1980. *Seasonality of Trichoderma species in a spruce forest soil.* Mycologia 72: 775-784.
- Worasatit, N.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L. and Rowland, C. 1994. *Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot wheat among single-spore isolates of Trichoderma koningi.* Mycol. Res. 98: 1357-1363.
- Zeilinger, S. and Omann, M. 2007. *Trichoderma biocontrol: Signal transduction Pathways involved in host sensing and mycoparasitism.* Gen Reg. Syst. Biol. 1:227-234.

Recibido: Septiembre 26, 2008

Aceptado: Noviembre 25, 2008

Indicaciones para los autores

Los autores que tengan interés en publicar algún artículo en *Avances en Investigación Agropecuaria* (AIA) deberán ajustarse a los siguientes lineamientos: publicarán artículos científicos originales e inéditos relacionados con las ciencias agrícolas o pecuarias, que de preferencia sean investigaciones inéditas en el trópico de aplicación práctica a la problemática.

Las contribuciones quedarán dentro de las categorías siguientes:

- Trabajos científicos originales
- Publicaciones por invitación
- Estudios recapitulativos o de revisión
- Notas técnicas

Se entiende como trabajo científico original aquella publicación redactada en tal forma que un investigador competente y suficientemente especializado en el mismo tema científico sea capaz, basándose exclusivamente en las indicaciones del texto, de:

- Reproducir los experimentos y obtener los resultados que se describen con un margen de error semejante o menor al que señala el autor.
- Repetir las observaciones y juzgar las conclusiones del autor.
- Verificar la exactitud de los análisis y deducciones que sirvieron al autor para llegar a conclusiones.

Se entiende como una publicación por invitación aquella producida por un científico que por su reconocimiento internacional sea invitado por el editor de la revista a presentar un tema de particular interés sobre sus experiencias en investigación original o sobre una o varias informaciones científicas nuevas. La redacción es responsabilidad exclusiva del autor, pero deberá pasar por el Comité Editorial de la revista. El trabajo no proporciona suficientes datos para que se puedan reproducir experimentos, observaciones y conclusiones.

Se entiende como estudio recapitulativo o de revisión el trabajo cuyo fin primordial es resumir, analizar o discutir informaciones ya publicadas, relacionadas con un solo tema.

Se entiende como notas técnicas a los escritos cuya redacción será de un máximo de seis páginas, así como no más de dos cuadros o gráficas. El texto no requerirá de separación en párrafos ni de subtítulos, aunque tendrá que estructurarse. Deberá contener: un resumen y un *abstract* de no más de cien palabras; una introducción breve en la que se resaltará claramente el objetivo del trabajo; se continuará con los materiales y métodos; en el caso de los resultados y discusión preferiblemente estarán combinados

para evitar repeticiones; las conclusiones o recomendaciones deberán estar consideradas en el texto, anotadas de forma clara y precisa. Las referencias en el texto y en la literatura citada no podrán ser excesivas, ya que la importancia de las notas técnicas son la originalidad y la síntesis.

Crterios para la presentación de originales

1. La revista acepta trabajos en español o inglés, en el cual deberá presentarse un resumen no mayor de 250 palabras en inglés y español, así como un máximo de 12 cuartillas por artículo (incluido resumen y literatura citada).

2. Deberán enviar el original vía internet al correo electrónico revaia@ucol.mx o aiaagropecuarias@yahoo.com.mx, o bien en formato CD-ROM al domicilio de AIA; en ambos casos observando las siguientes características: en procesador de palabras *Word*, con tipografía Times New Roman 12 puntos, a espacio sencillo. El formato de los textos debe estar en .rtf o .doc. Es preferible evitar el uso de estilos confusos en *Word* (es decir, no darle características de diseño al texto, ni manipular fuentes o tamaños en forma manual). Igualmente, adjuntarán tanto vía electrónica como en CD-ROM, una carta de aceptación de la publicación del texto inédito, cediendo así los derechos de dicha publicación a AIA, así como responsabilizándose del contenido de su artículo. De preferencia deberá ser rubricado por el autor principal.

3. El Comité Editorial se reserva los derechos para la selección y publicación de los mismos.

4. El título de toda comunicación deberá ser tan corto como sea posible, siempre que contenga las palabras clave del trabajo, de manera que permita identificar la naturaleza y contenido de éste, aun cuando se publique en citas e índices bibliográficos. No se deben utilizar abreviaturas en el texto, a excepción de aquellas que se indiquen con paréntesis en la primera cita que se presente en el cuerpo del mismo. A continuación del título irá el nombre del autor(es).

5. En la redacción se respetarán las normas internacionales del *Comité Internacional para las Revistas Médicas*, relativas a las abreviaturas, o seguir la norma de los artículos publicados en *Avances en Investigación Agropecuaria* (AIA), tales como: literatura citada, símbolos, nomenclatura anatómica, zoológica, botánica, química, a la transliteración terminológica, sistemas de unidades, etcétera.

6. Todo trabajo se dividirá en las siguientes secciones:

- Título (en español e inglés, no mayor de 15 palabras)
- Autores (indispensable: el domicilio físico de la institución de donde provenga el autor, así como el correo electrónico del autor y el institucional)
- Resumen en español (un máximo de 250 palabras)

- *Abstract* (en inglés)
- Palabras clave (no incluidas en el título)
- Introducción (concisa, planteando los objetivos)
- Materiales y métodos (breve, pero con los detalles que permitan reproducir las experiencias)
- Resultados
- Discusión
- Conclusiones
- Literatura citada
- Cuadros, figuras y fotos (como se indica en los siguientes párrafos, cada uno por separado).

7. El formato de las ilustraciones debe ajustarse a las extensiones de archivo: “.tif” o “.jpg”.

En el caso de las fotografías (digitalizadas), deberán estar insertadas con claridad, con una resolución mínima de 300 ppp, en formato “.tif”, las cuales quedarán impresas en blanco y negro.

Los cuadros y gráficas deben trabajarse en *Excel* y enviarse también por separado, además de las insertadas en el texto, e igualmente numeradas. En el caso de las gráficas, preferentemente serán en blanco y negro o con tonalidades grises.

Las fórmulas y ecuaciones deben hacerse con un editor de ecuaciones y enviarlas también por separado, en el formato original, o como ilustración, pero con una buena resolución gráfica (300 ppp).

8. La literatura citada sólo deberá contener los trabajos mencionados en el texto y viceversa; se escribirá de la manera siguiente:

Trabajos en revistas

- Apellido del primer autor(es). Se ordenarán alfabéticamente. En caso de que tengan preposiciones (von, van, de, di u otras) se citarán después del apellido y la primera letra de su(s) nombre(s); ejemplo: Berg van den, R. En caso de apellidos compuestos se debe poner un guión entre ambos; ejemplo: Elías-Calles, E.
- Cuando existan dos autores, se anotará la conjunción “y” para especificar que se trata de sólo dos autores; siempre se utilizará un solo apellido por autor. Ejemplo: García-Ulloa, M. y García, J. C.
- Cuando sean más de dos autores, se anotará una coma después de cada apellido, seguido de la(s) letra(s) iniciales de los nombres de los autores, así como un punto y coma entre cada autor; ejemplo: López, B.; Carmona, M. A.; Bucio,

L. y Galina, M. A.

- Año de aparición del trabajo.
- El título del trabajo se anotará íntegramente, en letras cursivas. En el caso de trabajos en español, francés o inglés, los sustantivos se escribirán con minúsculas.
- Nombre de la revista en forma abreviada de acuerdo con el *Comité Internacional para las Revistas Médicas*.
- Número de volumen, número de revista entre paréntesis y enseguida dos puntos.
- Primera y última página del trabajo.
- Ejemplo: Palma, J. M.; Galina, M. A. y Silva, E. 1991. *Producción de leche con (Cynodon plecostachyus) utilizando dos niveles de carga y de suplementación*. Av. de Inv. Agropecuarias. 14(1): 129-140.

En el caso de citar varios trabajos del mismo autor se hará en orden cronológico.

- Cuando del mismo autor aparezcan varios trabajos publicados en el mismo año y con diferentes colaboradores, se citarán de acuerdo con el orden alfabético del nombre del segundo autor.
- Cuando sea el mismo autor y el mismo año se deberá incluir entre paréntesis las letras (a), (b), progresivamente.
- Si se tratara de publicaciones que estén en prensa, habrá de citarse la revista con la anotación (en prensa). Las comunicaciones personales (sólo escritas, no verbales) no deberán figurar en la lista de la literatura citada. Se mencionarán como nota de pie de página.

Libros

Se citarán de igual forma que las publicaciones periódicas, pero se anotará la editorial y el país de publicación después del título. Ejemplo: Reyes, C. P. 1982. *Bioestadística aplicada*. Editorial Trillas. México. 217 pp.

Cuando se trate del capítulo de un libro de varios autores, se debe poner el nombre del autor del capítulo, luego el título del capítulo, después el nombre de los editores y el título del libro, seguido del país, la casa editorial, año y las páginas que abarca el capítulo.

Tesis

Se anotarán igual que las publicaciones periódicas, señalándolo en particular el nivel, licenciatura, maestría o doctorado, la institución y el país. Ejemplos:

Rodríguez, J. P. 1992. *Evaluación del consumo voluntario aparente en ganado de engorda mediante un modelo de simulación*. Tesis de licenciatura. Fes-Cuautitlán, Uni-

versidad Autónoma de México. Cuautitlán, Estado de México. México.

Palma, J. M. 1991. *Producción de leche en el trópico seco utilizando pasto estrella africana (Cynodon plectostachyus) o ensilado de maíz*. Tesis de maestría. FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F.

En caso de libros que incluyan artículos de diferentes autores (anuarios, etcétera) se citará siempre el apellido e iniciales del (de los) autor (es) del artículo en referencia, año, título del trabajo, título de la obra, nombre del (de los) editor (es), número de volumen en caso de que la obra conste de varios volúmenes, páginas, editorial y lugar donde apareció.

Ejemplo: Hodgson, J. 1994. *Manejo de pastos: teoría y práctica*. Editorial DIANA. México, D. F. 252 pp.

Conferencias

Conferencias o discusiones que únicamente se hayan publicado en las memorias del congreso se citarán como sigue:

- Apellido e iniciales del (de los) autor (es)
- Año de su publicación
- Título del trabajo en cursivas
- Nombre del congreso del que se trate
- Lugar donde se llevó a cabo el congreso
- Casa editorial
- Páginas

Ejemplo: Loeza, L. R.; Ángeles, A. A. y Cisneros, G. F. 1990. *Alimentación de cerdos*. Tercera reunión anual del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Estado de Veracruz, Veracruz. En: Zúñiga, J. L. y Cruz, J. A. Editores. pp. 51-56.

Material electrónico

Cuando se emplee una referencia electrónica, se proporcionarán los siguientes campos: autor, fecha, título y anexar la dirección consultada (URL) y la fecha de la consulta.

Los artículos de una revista se anotarán de la siguiente forma: autor, fecha, título, revista, volumen, páginas. Obtenido de la red mundial en (fecha): dirección en la red (URL).

Ejemplo:

Sánchez, M. 2002. Potencial de las especies menores para los pequeños productores. <http://www.virtualcentre.org/es/enl/keynote4.htm> (Consultada el 20 enero de

2003).

Los nombres científicos y otras locuciones latinas se deben escribir en cursivas.

Abreviaturas

Las abreviaturas de uso más frecuente se anotarán de la forma siguiente:

cal	Caloría (s)
cm	Centímetro (s)
°C	Grado centígrado
g	Gramo
ha	Hectárea
h	Hora (s)
i. m.	Intramuscular (mente)
i. v.	Intravenosa (mente)
J	Joule
kg	Kilogramo (s)
km	Kilómetro (s)
l	Litro (s)
log	Logaritmo decimal
Mcal	Megacaloría (s)
MJ	Megajoule
m	Metro (s)
msnm	Metros sobre el nivel del mar
μ g	Microgramo (s)
μ l	Microlitro (s)
μ m	Micrómetro (s) micra(s)
mg	Miligramo (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
min	Minuto (s)
ng	Nanogramo (s)
P	Probabilidad (estadística)
Pág.	Página
PC	Proteína cruda
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pp.	Páginas
ppm	Partes por millón
%	Por ciento (con número)
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo (s)
t	Tonelada (s)
TND	Total de nutrientes digestibles

UA	Unidad animal
UI	Unidades internacionales
vs	Versus
xg	Gravedades

Cualquier otra abreviatura se pondrá entre paréntesis inmediatamente después de la(s) palabra(s) completa(s).

Consideraciones finales

a) El editor someterá todos los trabajos a árbitros de reconocido prestigio en su área de especialidad, nacionales y extranjeros. Los trabajos deberán ser aprobados por dos árbitros. Los autores pueden sugerir al editor, lectores especializados que deberán tener las características señaladas con anterioridad.

b) Los trabajos no aceptados para su publicación se regresarán al autor, con un anexo en el que se explicarán los motivos por los que se rechaza o las modificaciones que deberán hacerse para ser reevaluados.

Aspectos metodológicos en la evaluación de la sostenibilidad de sistemas agrosilvopastoriles*

Methodological aspects for the sustainability evaluation of agrosilvopastoral systems

Nahed, T. J.*

El Colegio de la Frontera Sur.
Carretera Panamericana y Periférico Sur S/N,
San Cristóbal de Las Casas, Chiapas (C. P. 29290)

*Correspondencia: jnahed@ecosur.mx

*Conferencia presentada en el Taller sobre Metodología en Sistemas Agrosilvopastoriles o Agroforestería Pecuaria, 12 de mayo 2008. Dentro de la IV Reunión Nacional en Sistemas Agro-Silvopastoriles. Colima, México.

Resumen

En este artículo se aportan algunos elementos metodológicos para el uso de indicadores orientados a evaluar la sostenibilidad de los sistemas agrosilvopastoriles. Desde el punto de vista teórico se abordan: (I) las bases para la selección y/o construcción de indicadores, (II) los fundamentos generales para evaluar de forma multidimensional a la sostenibilidad, y (III) los procedimientos para el uso de indicadores en la evaluación de la sostenibilidad de sistemas agrosilvopastoriles. Desde el punto de vista práctico, se sintetizan los resultados de la aplicación de la teoría en dos ejercicios de evaluación de la sostenibilidad de sistemas agrosilvopastoriles: (I) uno con ovinos criollos en Los Altos de Chiapas, México, y (II) otro con cabras lecheras en la Sierra Norte de Cádiz, España. Con ello, se pretende motivar a los académicos a identificar, desarrollar, integrar (agregar) y utilizar nuevos indicadores en la perspectiva de evaluar la sostenibilidad de los diversos sistemas agrosilvopastoriles. Dichas evaluaciones: (I) permiten identificar las limitantes, las poten-

Abstract

This article provides some methodological elements for the use of indicators to evaluate the sustainability of agrosilvopastoral systems. From a theoretical point of view, three issues are raised: (I) the basis for the selection and/or construction of indicators, (II) the general grounds for evaluating the sustainability in a multidimensional manner, and (III) the procedures for using indicators in evaluating the sustainability of agrosilvopastoral systems. From a practical point of view, results of applying the theory are synthesized in two exercises evaluating the sustainability of agrosilvopastoral systems, with: (I) creole ovinos in the Chiapas Highlands in Mexico, and (II) dairy goats in the Sierra Norte of Cadiz, Spain. With this, we hope to motivate academics to identify, develop, integrate (aggregate), and utilize new indicators for evaluating the sustainability of diverse agrosilvopastoral systems. Such evaluations: (I) allow for identifying limits, potential, and opportunities of the systems; (II) are a valuable instrument for multi-criteria decision making in the planned de-

cialidades y las oportunidades de los sistemas; (II) son un instrumento valioso en la toma de decisiones multicriterio para el diseño planificado de escenarios deseables; y (III) guían la identificación de intervenciones planificadas en los sistemas para modificar las tendencias actuales no deseables.

Palabras clave

Indicadores, sostenibilidad, análisis multicriterio, ovinos, caprinos, Chiapas, Cádiz.

sign of desirable scenarios; and (III) guide the identification of planned interventions in the systems in order to modify current undesirable tendencies.

Key words

Indicators, sustainability, multicriteria analysis, sheep, goat, Chiapas, Cadiz.

Introducción

Convencionalmente las investigaciones en producción animal contemplan el uso de variables e indicadores limitados, sin una perspectiva y una organización de la evaluación en el contexto de la sostenibilidad. Los indicadores técnicos y económicos utilizados responden al modelo convencional (agroindustrial) de desarrollo ganadero, y con excepción de la ganadería campesina; dicho modelo se ha orientado a lograr los máximos incrementos de producción con la mayor rentabilidad, sin importar la calidad de los productos y los efectos sobre los recursos naturales.

En México prevalece esta tendencia, con la desventaja de que está posicionado como un país abierto, poco competitivo y poco globalizado aún cuando la competitividad es, desde la década de los años noventa, la clave para producir y comercializar productos [Villareal y de Villareal, 2002]. Lograr la competitividad de los sistemas ganaderos en general, y de los sistemas agrosilvopastoriles en particular, significa demostrar las ventajas comparativas de sus tecnologías y sus niveles de producción, de la calidad de sus productos ganaderos y especialmente de la inocuidad para la salud de los consumidores, así como de los beneficios ambientales y sociales que aportan.

Evaluar los sistemas agrosilvopastoriles desde esta perspectiva requiere de una metodología multicriterio o multidimensional para la toma de decisiones en el ámbito tecnológico, económico, ambiental y social [Munda, 2004; Falconi y Burbano, 2004]. En este sentido, el concepto sostenibilidad resulta adecuado, y de manera sintética puede definirse como la habilidad de un sistema para mantener la productividad o utilizar el recurso sin reducir su *stock* físico a lo largo del tiempo, aun cuando sea sometido a estrés o perturbaciones fuertes [Conway, 1987].

Un sistema agrosilvopastoril es sustentable si es capaz de reproducirse a sí mismo por tiempo razonable, y si puede cambiar oportunamente —cuando las condiciones así lo exigen— para seguir funcionando en el largo plazo. Para que esto ocurra, los recursos y procesos ecológicos y sociales que lo hacen funcionar deben ser capaces de

reproducirse, y —por lo tanto— de autorregularse, de coordinarse para ser compatibles, de amortiguar oportunamente las perturbaciones coyunturales adversas, de reorganizarse y de adaptarse cuando se presentan cambios estructurales internos y externos [Nahed *et al.*, 2006b]. Esta definición muy genérica ayuda a saber qué debemos evaluar cuando se pretende analizar la sostenibilidad de un sistema, pero requiere de una metodología para hacer operativo este análisis. Dicha metodología de análisis, síntesis y evaluación se convierte en una valiosa herramienta de planificación, ya que: (I) permite conocer las tendencias de cambio que prevalecen en los sistemas productivos y sus posibles consecuencias, y (II) contribuye a definir escenarios deseables, e identificar una o varias intervenciones planificadas sobre el sistema que puedan modificar sus tendencias actuales no deseables.

En este trabajo se aportan algunos elementos metodológicos para el uso de indicadores orientados a evaluar la sostenibilidad de los sistemas agrosilvopastoriles.

Elementos para la selección y/o construcción de indicadores

Los indicadores constituyen un componente fundamental de toda evaluación. De acuerdo con Chevalier *et al.* [1992], un indicador es una medida de la parte observable de un fenómeno que permite valorar otra porción no observable de dicho fenómeno, por lo que se convierte en una variable proximal que indica determinada información sobre una realidad que no se conoce de forma completa o directa. Es decir, un indicador es la expresión sintética de una gran cantidad de datos, manteniendo la información esencial [Padua, 1979]. Existen indicadores simples (variables) e indicadores complejos (sintéticos, integradores o índices). Los primeros se obtienen directamente de mediciones u observaciones y los segundos son multidimensionales, y se obtienen al combinar varios indicadores simples mediante un sistema de ponderación (suma ponderada) que los jerarquiza [Falconi y Burbano, 2004]. A su vez, existen indicadores objetivos y subjetivos. Los objetivos son los que se cuantifican o miden en forma exacta (son conmensurables, como la biomasa forrajera o la riqueza de especies herbáceas o leñosas) y los subjetivos o cualitativos hacen referencia a información basada en percepciones subjetivas de la realidad (son inconmensurables, es decir, son muy difíciles o imposibles de medir, como el nivel socioeconómico de los ganaderos o la tecnología de la ordeña de las explotaciones lecheras).

Los principales criterios en el uso de indicadores son: (I) tener el menor número de variables para integrar a un indicador siempre que éstas sean representativas de los mismos, y (II) se debe contar con procedimientos específicos de medición para cada indicador. En el caso de indicadores cualitativos, la dificultad reside en que éstos no pueden medirse con escalas sencillas como las lineales, puesto que no existen patrones

de medida universalmente definidos y aceptados, por lo que se puede elegir la escala utilizada en otros trabajos o se construye una nueva, adaptada a las necesidades específicas [Padua, 1979].

Una escala es un continuo de valores ordenados correlativamente, que admite un punto inicial y otro final (generalmente de 0 a 1). Las principales características de las escalas de medición son: (I) los intervalos deben ser mutuamente excluyentes, es decir, cada dato sólo debe pertenecer a una y sólo a una de las categorías de la escala; y (II) las escalas deben ser exhaustivas, es decir, en ellas deben poder ubicarse todos los valores posibles del indicador que se pretende medir [Infante y Zárate, 1990].

La definición operacional de los indicadores o transformación de conceptos a indicadores o a índices (procedimiento para medir o estimar con precisión los datos empíricos correspondientes) parte de la definición teórica de los mismos, así como del conocimiento y la experiencia sobre el tema. Los indicadores complejos o integradores (incluyendo los no físicos o cualitativos que no pueden medirse con escalas lineales) son construidos (operacionalizados) a partir de sus múltiples dimensiones e isomorfismo (semejanza de los rasgos estructurales de un concepto teórico con su definición operacional [Padua, 1979; Hernández-Sampieri *et al.*, 2006]), sustentados en los principios lógico-matemáticos de las escalas de medición apropiadas: nominal, ordinal, de intervalo o de razón [Infante y Zárate, 1990].

En ocasiones existen muchas variables posibles para integrar un mismo indicador y resulta difícil encontrar cuáles son las más apropiadas para describirlo. En otros casos, las variables encontradas no son fáciles de medir y deben ser cambiadas por otras menos confiables pero más accesibles. También puede darse el caso de que algunas variables seleccionadas no midan exactamente el indicador, sino algún aspecto colateral con menor relevancia [Sarandón, 2002].

Tanto la identificación y selección apropiada de indicadores simples o el desarrollo de indicadores complejos requieren de mucho cuidado y experiencia, una aguda intuición, sólidos conocimientos sobre el tema a investigar [Padua, 1979] y sobre todo, mucha apertura a recibir sugerencias. Deben seleccionarse sólo aquellos indicadores de fácil obtención y que muestren alta confiabilidad de la información, dependiendo del nivel de precisión a que se quiera llegar, así como de las capacidades económicas y de los recursos humanos que se tenga.

Fundamentos para evaluar la sostenibilidad

La sostenibilidad es un paradigma que pretende cumplir simultáneamente con objetivos de dimensiones productivas, económicas, sociales, culturales y ecológicas o ambientales [Sarandón, 2002]. Para abordar todas estas dimensiones, la evaluación de la sostenibilidad de un proceso de producción agrosilvopastoril debe hacerse mediante el

enfoque de sistemas dinámicos, y en forma multidisciplinaria [Kaufman y Cleveland, 1995; Belcher *et al.*, 2004]. Para ello, no existen parámetros ni criterios universales, y las herramientas y/o metodologías apropiadas aún están en proceso de desarrollo.

Para que el análisis de sostenibilidad sea operativo, es conveniente caracterizar el comportamiento de un número apropiado de indicadores relevantes. Éstos deben ser adecuados a los objetivos y escala de análisis, integrar variables, ser sensibles a un amplio rango de condiciones y a los cambios en el tiempo, poderse medir de manera fácil y confiable, y ser sencillos de entender [Sarandón, 2002; Maser *et al.*, 1999].

Los indicadores deben poder detectar las propiedades más relevantes de los sistemas agrosilvopastoriles y sus tendencias de cambio; dichas propiedades son atributos o cualidades que los sistemas deben cumplir para ser sostenibles. Algunas de las propiedades básicas descritas por Conway [1987], Marten [1988] y Kaine y Tozer [2005] son productividad, estabilidad, sostenibilidad, equidad, resiliencia y autonomía. En este contexto, Maser *et al.* [1999] proponen El Marco para la Evaluación de Sistemas de Manejo de Recursos Naturales incorporando Indicadores de Sostenibilidad (MESMIS). Este marco integra siete propiedades generales (atributos) que los sistemas deben cumplir para ser sostenibles: productividad, estabilidad, resiliencia, confiabilidad, adaptabilidad (o flexibilidad), equidad y autodependencia (o autogestión), los cuales se definen a continuación [Astier *et al.*, 2008]:

Productividad: es el nivel de bienes y servicios (rendimientos, ganancias, servicios ambientales, etcétera) que brinda el sistema por unidad de tiempo y por unidad de insumo invertido.

Estabilidad: un sistema productivo es estable si tiene mecanismos internos que autorregulan el estado de sus variables críticas, de manera que se mantengan en valores que permiten que el sistema funcione. La estabilidad se pone de manifiesto cuando alguna variable crítica (p. ej. la productividad) es modificada por una perturbación, y ese mismo cambio crea las señales e interacciones sistémicas que hacen que la variable regrese a su estado previo.

Resiliencia: sólo se presenta en sistemas estables. Es la velocidad con la que la variable perturbada regresa a su estado previo. Refleja la eficiencia de los mecanismos de autorregulación del sistema.

Confiabilidad: las perturbaciones pueden llevar a una variable crítica del sistema a estados en los que ya no pueden operar los mecanismos de autorregulación que permiten que dicha perturbación sea reversible. La confiabilidad es la probabilidad de que esto ocurra. Depende de la frecuencia de la perturbación, de la resistencia que ofrece la variable al cambio, y de la amplitud del rango de valores en el que el cambio es reversible.

Adaptabilidad (o flexibilidad): un sistema productivo es adaptable si puede reorganizarse para seguir funcionando cuando experimenta cambios internos o externos irreversibles.

Equidad: un sistema productivo es equitativo si permite distribuir de manera apropiada los beneficios y costos entre los agentes sociales que participan en él (intra e inter-generacionalmente). La equidad no sólo tiene un innegable valor ético sino que es un mecanismo de autorregulación social que contribuye a que el sistema pueda persistir y evolucionar adecuadamente.

Autodependencia (o autogestión): las propiedades previas dependen en buena medida de qué tanto el comportamiento del sistema depende de sus propios recursos, interacciones y procesos internos para autorregularse y evolucionar, y qué tanto depende de condiciones, perturbaciones e intervenciones externas que no controla.

De estas propiedades generales se derivan indicadores específicos, basados en variables tecnológicas, económicas, sociales y ambientales. Los aspectos importantes a considerar para el desarrollo y uso adecuado de tales indicadores son: (I) Antes de elegir indicadores, se debe realizar una caracterización general de los sistemas que se van a evaluar, considerando las áreas de evaluación y la(s) escala(s) espacial(es) pertinente(s). Esta caracterización debe permitir identificar las fortalezas y los puntos vulnerables del sistema; se deben elegir indicadores que permitan caracterizar con mayor precisión dichas fortalezas y debilidades. (II) La escala temporal de la evaluación. El periodo necesario para evaluar si un sistema es sostenible a corto o largo plazo va de 7 a 25 años [Smyth y Dumansky, 1995]. Si en la definición de sostenibilidad se habla de satisfacer las necesidades de las futuras generaciones, el horizonte temporal no debería ser menor a una generación, es decir, 25 años [Sarandón, 2002].

De acuerdo con Masera *et al.* [1999], la evaluación de sostenibilidad debe realizarse en forma comparativa, para lo cual existen dos vías: (I) la comparación longitudinal, que estudia la evolución de un mismo sistema a través del tiempo, de manera retrospectiva o prospectivamente. (II) la comparación transversal, que estudia simultáneamente uno o más sistemas de manejo alternativo, respecto de un sistema de referencia.

La información pertinente puede obtenerse mediante entrevistas a productores, mediciones en campo, recopilación y análisis de la bibliografía, información estadística, o una combinación de ellas. Una vez obtenida la información de los indicadores, se necesita hacer la integración de los resultados mediante procedimientos transparentes que permitan organizarlos, analizarlos y sintetizarlos de forma consistente. Procede realizar la agregación de los indicadores con alguno de los modelos básicos de la evaluación multicriterio (por área de evaluación y por atributo de sostenibilidad), como el del enfoque del punto ideal [Munda, 2004] utilizado en los dos ejemplos que se

presentan en la última sección de este trabajo. De esta forma, es posible hacer explícita —simultáneamente— las potencialidades y las limitaciones del comportamiento de los sistemas evaluados, a fin de emitir un juicio de valor sobre los mismos, y orientar la toma de decisiones acerca de cómo elegir entre ellos, y/o intervenirlos para que logren una mayor sostenibilidad.

Uso de indicadores para evaluar la sostenibilidad de sistemas agrosilvopastoriles

Para el análisis de sostenibilidad de los sistemas agrosilvopastoriles es indispensable incorporar indicadores de regulación tecnológica, económica, social y ambiental de la producción. Las variables tecnológicas y económicas utilizadas convencionalmente en las investigaciones sobre producción y sistemas de producción animal pueden agregarse en un menor número de indicadores manejables y significativos.

Es imprescindible considerar, además, varios indicadores sociales, como: (I) estructura y permanencia de las organizaciones de productores; (II) asesoría y capacitación a los productores; (III) beneficiarios de la familia, entre otros; y ambientales, como: (I) flujo de materiales y energía con sistemas agrícolas y forestales; (II) superficie forestal por unidad animal; y (III) patrones de sucesión vegetal, entre otros. Al respecto, Ronchi y Nardone [2003], señalaron que para identificar si un sistema agrosilvopastoril no está siendo sustentable se pueden usar los siguientes indicadores: degradación del paisaje, degradación de pasturas comunales, abandono de tierras marginales, bajo nivel de integración entre agricultura y ganadería, fragmentación de la tierra, alta dependencia de la compra de forrajes, reducida diversidad e incremento de la especialización en monocultivo, reducción del uso de razas locales, alta incidencia de enfermedades parasitarias y necesidades de tratamientos curativos y preventivos, alta incidencia de mastitis clínica y subclínica, alta incidencia de otras enfermedades, alta variabilidad en la calidad de la leche.

Por otra parte, se mencionan algunos indicadores específicos para evaluar la calidad de la leche: (I) contenido de nutrimentos como grasa, ácidos grasos y proteína; (II) concentración de células somáticas, bacterias, residuos de antibióticos, hormonas y pesticidas.

Es indispensable organizar los indicadores por áreas de evaluación y por atributo de sostenibilidad para cubrir con rigurosidad la multidimensionalidad del concepto de sostenibilidad. En el cuadro 1, se ejemplifica la organización de algunos indicadores de sostenibilidad en sistemas de bovinos lecheros, por área de evaluación para el atributo de estabilidad.

Cuadro 1. Ejemplos de indicadores de sostenibilidad ordenados por área de evaluación para el atributo de estabilidad.

<i>Área</i>	<i>Indicador</i>
Tecnológica	- Consumo en pastoreo/consumo en pesebre - Capacidad de control de enfermedades infecciosas del ganado
Económica	- Margen neto/vaca/año vs. margen neto mínimo económicamente aceptable - Acceso a crédito y seguro contra siniestro
Social	- Grado de satisfacción de los agentes sociales involucrados en la producción - % de explotaciones que continúan a la siguiente generación de productores
Ambiental	- Superficie total/vaca vs. superficie mínima ecológicamente aceptable - Control de cobertura del suelo y erosión

Puesto que la sostenibilidad es un atributo dinámico de un sistema, lo más adecuado es hacer un seguimiento de éste por varios años, y en particular de sus indicadores más relevantes. La evaluación puede hacerse para un solo sistema o comparando dos o más. En ocasiones, por falta de información, tiempo o recursos, se tiene que iniciar la evaluación con datos de un solo año, pero debe tenerse en mente la posibilidad de ampliarla de manera retrospectiva o prospectiva. En la figura 1, se presenta un ejemplo extremo para mostrar las ventajas y desventajas de las diferentes formas de evaluación [Nahed *et al.*, 2006b]. La línea horizontal punteada representa el umbral, o nivel más bajo aceptable de un indicador crítico. En este ejemplo heurístico se usa el margen neto mínimo por cabra y año (50 €) para que un sistema caprino en Andalucía, España, no sea abandonado; S1 y S2 son distintos sistemas de manejo caprino.

La evaluación de un solo sistema (S1) puede hacerse de manera transversal (estática; p. ej. en el año 2005), de manera longitudinal retrospectiva (dinámica; p. ej. 1995-2005) o de manera longitudinal prospectiva (dinámica; p. ej. 2005-2015). La primera es sencilla y sólo permite comenzar a identificar posibles indicadores críticos. La segunda, demanda datos históricos con la ventaja de que señala posibles tendencias para el futuro. La tercera requiere más esfuerzo, pero es muy importante porque confirma las tendencias y sus consecuencias.

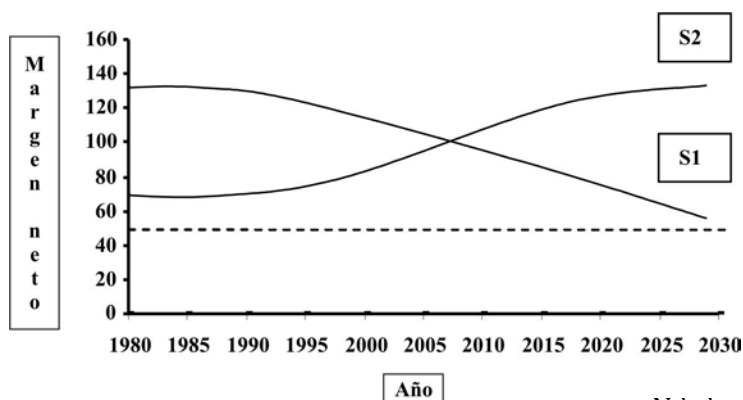
La comparación entre S1 y S2 se podría hacer de tres maneras que llevan a conclusiones diferentes (figura 1):

1) *Transversal (actual y estático)*: Se comparan S1 y S2 sólo en el año 2005. Se concluye que el margen neto (MN) es mayor en S1 que S2, por lo que se prefiere S1.

2) *Longitudinal retrospectiva*: Se comparan S1 y S2 en un periodo previo a 2005 (1990-2005). Se concluye que el MN de S1 era mayor en 1990 pero que su ventaja se ha reducido y en 2005 su MN es casi igual al de S2. Ya no es tan claro que se deba preferir S1.

3) *Longitudinal prospectiva*: Se comparan S1 y S2 en un periodo que inicia en 2005 (2005-2015). Se concluye que los procesos que han venido experimentando los dos sistemas han invertido la ventaja inicial de S1 sobre S2. Además, S1 se está acercando al umbral crítico del indicador y S2 se está alejando. Se prefiere definitivamente S2. Para que en el futuro sea posible realizar comparaciones de indicadores de sostenibilidad operativos y eficaces, se requiere planificar el registro de datos consistentes y a largo plazo sobre los indicadores relevantes, que sean acordes con los objetivos de la evaluación.

Figura 1. Comportamiento hipotético del margen neto por cabra en dos sistemas productivos a lo largo de 50 años. En el texto se describen diferentes formas de evaluación de estos comportamientos.



Nahed *et al.* (2006b).

Evaluación de la sostenibilidad de dos sistemas agrosilvopastoriles

Se presenta la síntesis de dos ejercicios independientes de evaluación de la sostenibilidad de dos sistemas agrosilvopastoriles: (I) con ovinos criollos en Los Altos de Chiapas, México, con información de Alemán *et al.* [2005] y (II) con cabras lecheras en la Sierra Norte de Cádiz, España, con datos de Nahed *et al.* [2006a].

En ambas evaluaciones se utilizó como guía la metodología MESMIS, la cual fue adaptada a la evaluación de sistemas de producción ovina y caprina. En los dos casos, algunos indicadores podrían pertenecer a más de un atributo de sostenibilidad; sin embargo, éstos fueron ubicados sólo en uno de ellos, donde se consideró pertinente. En cada caso, la información obtenida en campo se concentró en una matriz, utilizando los valores medios de cada indicador; luego se determinaron los valores óptimos de referencia (valor deseable o punto ideal). El criterio para definir el valor óptimo de

cada indicador se basó principalmente en el valor máximo o mínimo absoluto obtenido del conjunto de explotaciones estudiadas, independientemente del sistema de producción, debido a que es un valor real que podría ser alcanzado por todas las explotaciones estudiadas. En algunos casos se usó el criterio de los expertos en producción ovina y caprina entrevistados en cada región, así como otros criterios que se muestran en el cuadro 2.

Existen indicadores para los cuales el valor óptimo es la cifra máxima, lo que significa que cuanto más elevada sea la cantidad es mejor (como ingresos por venta de animales vivos o leche vendida/cabra y año); en este caso, el indicador se obtiene de la siguiente forma: $(\text{valor del indicador}/\text{valor óptimo}) * 100$. Sin embargo, existen casos para los cuales el valor óptimo es la cifra mínima, es decir, cuanto menos elevada sea la cantidad es mejor (como mortalidad de crías o de animales adultos), y el indicador se calcula de la siguiente forma: $(\text{valor óptimo}/\text{valor del indicador}) * 100$.

En todos los casos, cuanto más se acerque el valor del indicador al 100% es mejor desde el punto de vista de la sostenibilidad. La asignación de valor a los indicadores cualitativos se muestra en el cuadro 2, como es el caso del indicador calidad de la fibra de lana. El porcentaje general de cada atributo de sostenibilidad y sistema se obtiene del promedio de los porcentajes de cada indicador.

I. Evaluación de la sostenibilidad de dos sistemas de producción ovina en comunidades tzotziles de Chiapas

En Los Altos de Chiapas la ovinocultura constituye el elemento básico de la conformación de la identidad de las mujeres tzotziles. Las características más importantes de la producción agrosilvopastoril prevaeciente son: el conocimiento empírico tradicional, el uso integral y diversificado de los recursos y las herramientas manuales, cuyas prácticas se desarrollan mediante la división organizada del trabajo por edad y sexo entre los miembros de la familia y un calendario de manejo flexible, adaptado a la variabilidad de las condiciones ambientales.

Se evaluó el grado de sostenibilidad del sistema de producción ovina con manejo tradicional comparándolo con un sistema de manejo alternativo (cuadro 2), que incluyó los siguientes componentes tecnológicos: (I) un programa de desparasitación interna y externa de los ovinos; (II) fabricación y complementación alimenticia de los ovinos en pastoreo con bloques multinutricionales durante la época de escasez de forraje; (III) una propuesta de mejora de los encierros de los ovinos (corrales); (IV) establecimiento de leñosas forrajeras en diseños de cultivo intensivo (bancos de proteína), y (V) manejo de pastizales.

Se encontró que en el sistema alternativo, los 25 indicadores incluidos en la evaluación son mayores o similares al sistema tradicional y tienen mayor aproximación al

valor óptimo. Si bien la ovinocultura tzotzil está sólidamente integrada a las estrategias productivas y de vida de las familias, hoy enfrenta nuevos desafíos. Los recursos naturales sufren grave deterioro y la tecnología productiva local resulta insuficiente para resolver la situación. La sostenibilidad de los sistemas productivos no sólo depende del incremento de rendimientos, ingresos y calidad, sino también del aumento de la estabilidad, la confiabilidad y la resiliencia de los mismos. Aun cuando el sistema alternativo cuenta con claros atributos de sostenibilidad ambiental, también muestra limitaciones para alcanzar la sostenibilidad económica y social. Las pastoras se sienten atraídas por las opciones tecnológicas que les permiten producir animales sanos y más productivos. Esto tiene un efecto emotivo, con repercusiones en los atributos socioculturales del sistema.

Cuadro 2. Comparación de indicadores de dos sistemas de producción ovina y sus valores óptimos, en Los Altos de Chiapas.

Indicadores y unidades	Sistemas de manejo			Criterio para el óptimo
	Óptimo	Alternativo	Tradicional	
1. Ingresos por venta de animales vivos (pesos, esporádico)	378 (100%)	300 (79%)	120 (32%)	Máximo pago obtenido en los mercados locales
2. Ingresos por venta de lana (pesos/vellón)	150 (100%)	98 (65 %)	60 (40 %)	Máximo pago obtenido en los mercados locales
3. Ingresos por venta de prendas de vestir de lana (Chuj) (pesos, esporádico)	108 (100%)	60 (56 %)	60 (56 %)	Máximo pago obtenido en los mercados locales
4. Rendimiento de materia seca del pastizal (kg/ha/90 días)	3,435 (100%)	1,252 (36 %)	690 (20 %)	Rendimiento máximo de parcelas experimentales fertilizadas y sin pastoreo
5. Rendimiento de lana sucia (g/año)	2,120 (100%)	1,093 (51 %)	865 (41 %)	Rendimiento máximo de animales suplementados con alfalfa y rastrojo de maíz
6. Rendimiento de follaje de especies vegetales leñosas (kg/corte/planta)	10 (100%)	4 (40 %)	4 (40 %)	Rendimiento máximo en parcelas experimentales
7. Calidad de la lana (resistencia al trabajo de hilado) (alta, media, baja)	Alto (100%)	Medio (66 %)	Bajo (33 %)	Características deseables por las pastoras
8. Grado de intercambio de animales vigorosos (% de pastoras)	100 (100%)	9 (9 %)	9 (9 %)	Comparten para todos los rebaños
9. Incremento promedio de peso/animal (g/día)	6.5 (100%)	6.5 (100 %)	-8.6 (0 %)	Valor máximo obtenido en animales suplementados, sin estrés alimentario
10. Incremento promedio de fibra de lana (g/día)	3.0 (100%)	3.0 (100 %)	2.2 (73 %)	Valor máximo obtenido en animales suplementados, sin estrés alimentario

(Continúa siguiente página)

(Viene de la página anterior / continúa cuadro 2)

11. Especies leñosas forrajeras manejadas (número)	5.0 (100%)	3 (60 %)	0 (0.0 %)	Número de especies evaluadas en ECOSUR
12. Capacidad de carga animal pastizales locales (UA/ha/año)	1.53 (100%)	0.56 (37 %)	0.10 (7 %)	Valor máximo en parcelas fertilizadas y sin pastoreo
13. Obtención de mejores precios en mercados locales (siempre, a veces, nunca)	Siempre (100%)	A veces (50 %)	Nunca (0 %)	Mejores precios obtenidos por los productos
14. Especies de plantas leñosas utilizadas como forraje (número)	30 (100%)	30 (100 %)	30 (100 %)	Cantidad de especies utilizadas en algún momento del año
15. Uso de parcelas de cultivo y en descanso (%)	100 (100%)	100 (100 %)	100 (100 %)	Alternancia entre uso agrícola y pastizal de la parcela
16. Cobertura vegetal de parcelas con pastizal (%)	100 (100%)	78 (78 %)	78 (78 %)	Valores deseados por las pastoras
17. Presencia de estructuras democráticas al interior de los grupos de trabajo (%)	100 (100%)	50 (50 %)	50 (50 %)	Presencia de grupos supra-familiares que atiendan conflictos comunitarios
18. Pastoras que desean permanecer en la ovinocultura (%)	100 (100%)	100 (100 %)	100 (100 %)	Todas las pastoras
19. Pastoras adoptantes de alguno de los componentes del sistema alternativo (%)	50 (100%)	20 (40 %)	0 (0.0 %)	Todas las pastoras aplican por sí mismas ese componente
20. Unidades de producción que utilizan de 1 a 4 innovaciones (%)	100 (100%)	33 (33 %)	5 (5 %)	Máximo deseable de pastoras (50) que adoptan las cuatro alternativas de manejo
21. Jornales liberados de la ovinocultura (número)	140 (100%)	280 (50 %)	280 (50 %)	Liberación de la mitad, o sea, 140 jornales invertidos
22. Beneficiarios de la propuesta (número de pastoras)	250 (100%)	50 (20 %)	0 (0 %)	Todas adoptan las cuatro innovaciones propuestas
23. Innovaciones adoptadas por las pastoras con fondos propios (%)	Alta (100%)	Baja (33 %)	Muy bajo (5 %)	Máximo deseable de pastoras (50) en la adopción de las cuatro alternativas de manejo
24. Número de pastoras asistentes en promedio (número/reunión)	50 (100%)	30 (60 %)	5 (10 %)	Todas asisten a las reuniones de trabajo
25. Participantes activas en todo el proceso (número)	50 (100%)	20 (40 %)	0 (0 %)	Todas se involucran en el diseño y monitoreo

Alemán et al. (2005).

En el cuadro 3, se presenta una síntesis cualitativa de los resultados de la evaluación por atributo de sostenibilidad. Es claro que el sistema alternativo es mejor en todos los atributos de sostenibilidad observado en la mayor aproximación de sus indicadores al valor óptimo. Aun cuando el sistema alternativo es adoptado sólo por un pequeño número de pastoras, éstas son más organizadas y tienen mayor control de factores externos —ambientales o económicos— que las pastoras tradicionales. Aunque el sistema alternativo logra mejores condiciones socio-ambientales, al partir de un

punto tan crítico en términos de pobreza y recursos naturales disponibles, éste dura entre cuatro y cinco años para que el escenario probable (tendencia de que el sistema tradicional continúa su trayectoria actual) cambie su trayectoria al escenario deseable (sistema alternativo, que resulta de una intervención planificada), aproximándose a los valores óptimos o punto ideal de los indicadores evaluados.

Cuadro 3. Comparación de los atributos de sostenibilidad de dos sistemas de producción ovina en Los Altos de Chiapas.

<i>Atributo</i>	<i>Sistema tradicional</i>	<i>Sistema alternativo</i>
Productividad	Media	Alta
Estabilidad	Baja	Media
Confiabilidad y resiliencia	Baja	Media
Adaptabilidad	Baja	Media
Equidad	Baja	Media
Autogestión	Baja	Media

Alemán *et al.* (2005).

II. Evaluación de la sostenibilidad de los sistemas caprinos lecheros de la sierra de Cádiz, España

La Sierra de Cádiz se ubica en el sur de España, dentro de la Comunidad Autónoma de Andalucía. Ésta aporta el 56.7% de la producción de leche de España, lo cual hace que dicha actividad adquiera gran relevancia por su función social y medioambiental, ya que la mayor parte de las explotaciones caprinas se encuentran en zonas de sierra, difícilmente aprovechables para otros usos agrarios. Aunque los sistemas de producción caprina dominantes en la cuenca mediterránea se han basado en el uso de los recursos naturales a través del pastoreo de zonas de sierra (gran parte de ellas pertenecientes a espacios protegidos de interés social y medioambiental), actualmente se observa una tendencia hacia la intensificación vía pastoreo cero.

Se evaluó la sostenibilidad de los sistemas caprinos en función de su grado de intensificación. Se utilizaron 41 indicadores cuantitativos y tres cualitativos, de los cuales 8 se refieren al atributo de productividad, 17 al de estabilidad, 6 al de adaptabilidad, 4 al de equidad y 9 al de autogestión. El componente principal *aporte energético del pastoreo*, integrado por los indicadores *superficie total por cabra* y *energía neta obtenida del pastoreo*, fue el que mejor permitió clasificar las explotaciones, diferenciándose tres tipos de sistemas caprinos: intensivo (SI; 4 explotaciones), semiintensivo (SSI; 13 explotaciones) y semiextensivo (SSE; 8 explotaciones). En el cuadro 4, se presenta únicamente la información de los doce indicadores que resultaron estadís-

ticamente significativos. No aparece ningún indicador de equidad debido a que ninguno de los cuatro utilizados resultó estadísticamente significativo.

Cuadro 4. Comparación de indicadores de tres sistemas de producción caprina y los valores óptimos, ordenados por atributos de sostenibilidad, en la Sierra de Cádiz.

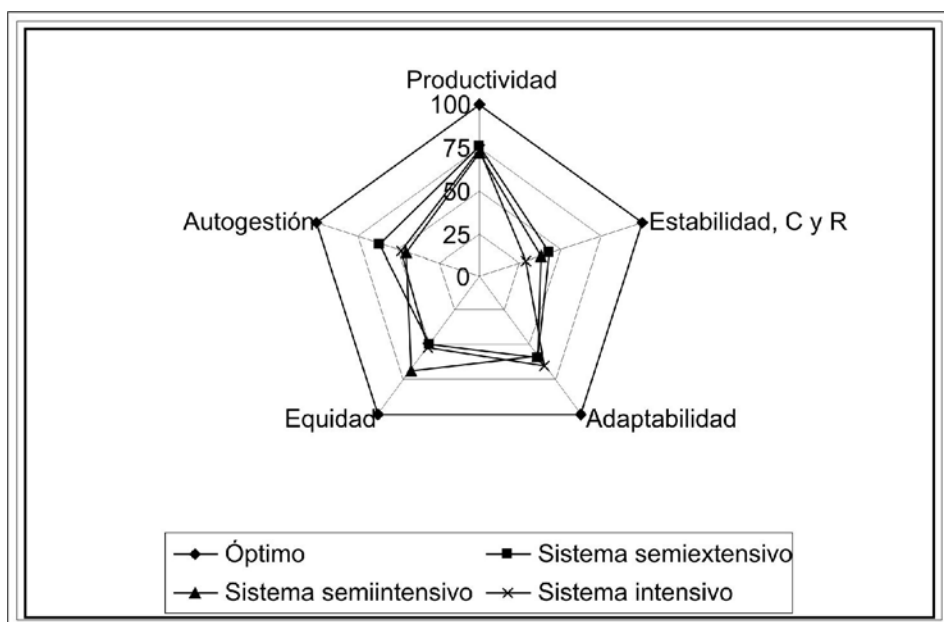
ATRIBUTO	INDICADORES	Sistemas de producción			
		Óptimo	Semiextensivo	Semiintensivo	Intensivo
Productividad	Concentrado/l leche producida, kg*	0.53 (100 %)	0.79a (± 0.20) (67.08 %)	1.06b (± 0.25) (50.0 %)	1.10b (± 0.26) (48.2 %)
	Margen neto/l leche producida, €* [*]	0.43 (100%)	0.33b (± 0.08) (76.7 %)	0.30a (± 0.07) (69.7 %)	0.26a (± 0.04) (60.5 %)
Estabilidad	Presencia de la raza Payoya o sus cruces, % de explotaciones.*	100 % (100 %)	100 % (100 %)	85 % (85 %)	50 % (50 %)
	Superficie de pasto natural/cabra, ha**	0.96 (100 %)	0.45b (± 0.33) (46.9 %)	0.16a (± 0.21) (16.7 %)	0.00a (± 0.00) (0.0 %)
	Cabras presentes, cabezas*	385.0 (100 %)	385.0b (± 288.8) (100 %)	195.6a (± 138.2) (50.8 %)	98.8a (± 18.4) (24.7 %)
	Buena catalogación en control de brucelosis, % de explotaciones**	100 % (100 %)	87.5 % (87.5 %)	61.5 % (61.5 %)	50.0 % (50.0 %)
	Precio medio de los cabritos, €/cabeza **	43.3 (100 %)	34.83b (± 2.55) (80.4 %)	37.42b (± 3.55) (86.4 %)	31.28a (± 3.23) (72.2 %)
Adaptabilidad	Relación inversión/margen neto, %**	182.0 (100 %)	55.0a (± 82.0) (30.2 %)	158.0ab (± 133.0) (86.8 %)	182.0b (± 47.0) (100 %)
Autogestión	Energía neta del pastoreo, %***	74.4 (100 %)	53.0c (± 16.0) (71.2 %)	30.8b (± 10.9) (41.4 %)	1.4a (± 2.3) (1.9 %)
	Superficie total/cabra, ha**	2.03 (100 %)	1.02b (± 0.55) (50.3 %)	0.49a (± 0.30) (24.1 %)	0.13a (± 0.14) (6.4 %)
	Superficie en aparcería o arrendada/cabra, ha **	0.02 (100 %)	0.90b (± 0.68) (2.2 %)	0.28a (± 0.33) (7.1 %)	0.02a (± 0.03) (100 %)
	Concentrado/cabra y año, kg**	148.0 (100 %)	286.0a (± 109.6) (51.8 %)	380.2b (± 75.2) (38.9 %)	476.5b (± 35.5) (31.1 %)
	Forraje consumido en pesebre/cabra y año, kg***	12.5 (100 %)	12.5a (± 2.5) (100 %)	102.4b (± 102.7) (12.2 %)	350.3c (± 126.6) (3.6 %)

a, b, c = Valores con distinta letra en la misma fila, son diferentes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$
Nahed *et al.* (2006a).

Globalmente, la sostenibilidad tiende a reducirse a medida que aumenta el grado de intensificación de los sistemas: SSE (57.3%), SSI (55.7%) y SI (53.1%), debido principalmente a que la estabilidad se reduce y la capacidad de autogestión es menor (figura 2). Dicha tendencia está relacionada con el mayor costo de producción de los SI estudiados respecto a los SSE, debido a sus deficiencias en aspectos técnicos o comerciales y a su menor competitividad con relación a las explotaciones de otras zonas de Europa (Francia y Holanda) mejor organizadas.

El proceso de intensificación de los sistemas de producción caprina en zonas de sierra tiende a ser ineficiente, particularmente en cuanto al margen neto por litro de leche producida y al margen neto por trabajador familiar. La mayor adaptabilidad observada en el SI se basa en una mayor inversión económica y dependencia de insumos externos, si bien por otro lado la capacidad de autogestión del SSE favorece una mayor productividad y estabilidad del mismo.

Figura 2. Síntesis multicriterio (por atributos) del grado de sostenibilidad de los sistemas caprinos lecheros de la Sierra de Cádiz.



Nahed *et al.* (2006a).

Reflexiones finales

Sin duda, los esfuerzos de evaluación multidimensional contribuirán a superar el incipiente desarrollo de marcos metodológicos integrales que evalúen simultáneamente la sostenibilidad ambiental, económica y social de los sistemas agrosilvopastoriles. El objetivo es lograr motivar a los académicos dedicados a la producción animal a discutir sobre el tema de los indicadores, a identificar, desarrollar, integrar (agregar) y utilizar nuevos indicadores en la perspectiva de evaluar la sostenibilidad de los diversos sistemas agrosilvopastoriles. Dichas evaluaciones permitirán identificar las limitantes, las potencialidades y las oportunidades de los sistemas, son un instrumento valioso en la toma de decisiones multicriterio para el diseño planificado de escenarios deseables, y guían para la identificación de intervenciones planificadas en los sistemas para modificar las tendencias actuales no deseables.

Literatura citada

- Alemán, S. T.; Nahed, T. J. y López, M. J. 2005. *Evaluación de la sustentabilidad de dos sistemas de producción ovina en comunidades Tzotziles*. En: Astier, M. y Hollands, J. Sustentabilidad y campesinado: Seis experiencias agroecológicas en Latinoamérica. México. Editorial Mundi-Prensa. pp. 11-55.
- Astier, M.; Masera, O. y Galván-Miyoshi, Y. 2008. *Evaluación de sustentabilidad. Un enfoque dinámico y multidisciplinario*. SEA, CIGA, ECOSUR, CIECO, UNAM, GIRA, MundiPrensa, Fundación Instituto de Agricultura Ecológica y Sustentable, España. Primera edición. Valencia, España. 210 pp.
- Belcher, K. W.; Boehm, M. M. and Fulton, M. E. 2004. *Agroecosystems sustainability: a system simulation model approach*. Agricultural System. 79:291-316.
- Chevalier, S.; Choiniere, R. and Bernier, L. 1992. *User guide to 40 community health indicators*. Community Health Division. Health and Welfare Canada, Ottawa. 139 pp.
- Conway, G. R. 1987. *The properties of agroecosystems*. Agricultural System. 24:95-117.
- Falconi, F. y Burbano, R. 2004. *Instrumentos económicos para la gestión ambiental: decisiones monocriteriales versus decisiones multicriteriales*. Revista Iberoamericana de Economía Ecológica. (1):11-20.
- Hernández-Sampieri, R.; Fernández-Collado, C. y Baptista, L. P. 2006. *Metodología de la investigación*. Editorial Mc Graw-Hill. México. 850 pp.
- Infante, G. S. y Zárate, de L. G. 1990. *Métodos Estadísticos: un enfoque interdisciplinario*. Editorial Trillas. México. pp. 533-537. 643 pp.
- Kaine, G. W. and Tozer, P. R. 2005. *Stability, resilience, and sustainability in pasture-based grazing systems*. Agricultural Systems. 83: 27-28.
- Kaufmann, R. K. and Cleveland, C. J. 1995. *Measuring sustainability: needed and interdisciplinary approach to and interdisciplinary concept*. Ecological Economics. 15:109-112.
- Marten, G. G. 1988. *Productivity, stability, sustainability, equitability, and autonomy as properties for agroecosystem assessment*. Agricultural Systems. 26:291-316.
- Munda, G. 2004. *Métodos y procesos multicriterio para la evaluación social de las políticas públicas*. Revista Iberoamericana de Economía Ecológica. 1:31-45.
- Nahed, T. J.; Castel, J.; Mena, Y. and Caravaca, F. 2006a. *Appraisal of the sustainability of dairy goat systems in Southern Spain according to their degree of intensification*. Livestock Science. 101:10-23.
- Nahed, T. J.; García, B. L.; Mena, Y. and Castel, J. 2006b. *Use of indicators to evaluate sustainability of*

- animal production systems*. Options Mediterranéennes. Serie A. 70:205-211.
- Padua, J. 1979. *Técnicas de investigación aplicadas a las ciencias sociales*. El Colegio de México. Fondo de Cultura Económica. México. 360 pp.
- Ronchi, B. and Nardone, A. 2003. *Contribution of organic to increase sustainability of mediterranean small ruminants livestock systems*. Livestock Production Science. 80:17-31.
- Sarandón, J. S. 2002. *El desarrollo y uso de indicadores para evaluar la sustentabilidad de los agroecosistemas*. En: Agroecología, el camino hacia una agricultura sustentable. Argentina. Ediciones Científicas Americanas. Bs. As. pp. 394-414.
- Smyth, A. J. and Dumanski, J. 1995. *A framework for evaluating sustainable land management*. Can. Journal Soil Sci. 75:401-406.
- Villareal, R. y De-Villareal, R. 2002. *México competitivo 2020 un modelo de competitividad sistémica para el desarrollo*. Editorial Océano. México. 356 pp.

Recibido: Abril 12, 2008

Aceptado: Noviembre 3, 2008



Título: *Cosecha solitaria*

Autor: Adoración Palma García “2manoS”

Técnica: Scrach en chapopote sobre madera

Medidas: 25 cm X 21cm

Año: 2008

Anomalías del desarrollo testicular y escrotal en toros de tres razas en el sureste de México

Abnormalities of testicular and scrotal development in bulls of three breeds in southeast México

Silva, C.; Delgado, R.; Magaña, J. y Reyes, A.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma de Yucatán
Km. 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil
Mérida, Yucatán
Correspondencia: csilva@tunku.uady.mx

Resumen

Con el fin de estudiar la frecuencia de anomalías del desarrollo testicular y escrotal, se examinaron 203 toros Brahman (B), 160 Nelore (N) y 218 Pardo Suizo (PS), de 6 a 24 meses de edad. El examen se hizo por inspección y palpación de los testículos y el escroto. Se incluyeron hipoplasia, criptorquidia, descenso testicular incompleto y desarrollo defectuoso del escroto (escroto cuneiforme). Se hizo la comparación entre razas con la prueba de Chi cuadrada. Las frecuencias de anomalías fueron de 8.37, 6.87 y 6.88% en los toros B, N y PS, respectivamente ($P > 0.05$). Las anomalías más comunes fueron: la hipoplasia (2 a 3.5% de casos en las tres razas) y el descenso testicular incompleto (1 a 3% en las tres razas), seguidas por el escroto cuneiforme (1.5 a 4% en las razas B y N) y la criptorquidia (0.5 a 1% en las razas B y PS). La anomalía más frecuente en B fue la hipoplasia (3.45%). En la raza N fue más frecuente el escroto cuneiforme (3.75%) y no se observó criptorquidia. En la PS, la anomalía más frecuente fue también la hipoplasia (3.21%) y no se observó escroto cuneiforme. La única diferencia signi-

Abstract

In order to study the frequency of testicular and scrotal developmental abnormalities, 203 Brahman (B), 160 Nelore (N), and 218 Brown Swiss (BS) bulls from 6 to 24 months old were examined. The examination was done by inspection and palpation of the testes and scrotum. Hypoplasia, cryptorchidism, incomplete testicular descent, and abnormal development of the scrotum (wedge-shaped scrotum) were included in the study. Comparison among breeds was done with Chi square test. The observed frequencies of abnormalities were: 8.37, 6.87 and 6.88 % in the B, N and BS bulls, respectively ($P > 0.05$). The most common abnormalities were hypoplasia (2 to 3.5 % in the three breeds) and incomplete testicular descent (1 to 3 % in the three breeds), followed by the wedge-shaped scrotum (1.5 to 4 % in B and N) and cryptorchidism (0.5 to 1 % in B and BS). The most common abnormality in B was hypoplasia (3.45%); in N it was the wedge-shaped scrotum (3.75%), and cryptorchidism was not observed. In BS, hypoplasia was also the most frequent anomaly (3.21%), and wedge-shaped scrotum was absent. The only significant differen-

ficativa ($P < 0.05$) se observó entre las dos razas *Bos indicus* y la PS en cuanto a la frecuencia de escroto cuneiforme. Se concluyó que la frecuencia de alteraciones del desarrollo testicular y escrotal es moderadamente alta y sin diferencia entre razas, pero con variaciones entre razas en la frecuencia de alteraciones específicas.

Palabras clave

Toros, hipoplasia testicular, criptorquidia, escroto cuneiforme.

ce ($P < 0.05$) was found between the two *Bos indicus* breeds and BS in regard of the frequency of wedge-shaped scrotum. Frequency of abnormal development of the scrotum-testes was concluded to be fairly high and similar in the three breeds, although there were variations in the frequency of specific abnormalities among breeds.

Key words

Bulls, testicular hypoplasia, cryptorchidism, wedge-shaped scrotum.

Introducción

El comportamiento reproductivo de un toro depende de su capacidad de copular y de fecundar. Esta última, depende de la producción de espermatozoides normales por los testículos, por lo que la normalidad de estos órganos es muy importante para la capacidad reproductiva [Coulter, 1991; Töszér *et al.*, 1994]. Los testículos pueden sufrir alteraciones físicas, entre otras, permanentes o pasajeras, adquiridas o congénitas, heredables o no. Las anomalías del desarrollo afectan físicamente a los testículos y son permanentes; las más importantes son la criptorquidia, la hipoplasia, el descenso incompleto y el tamaño reducido de los testículos [Ott, 1987; Coulter, 1993; Foster, 1997]. La criptorquidia se ha observado en aproximadamente el 0.1% de los toros [Carroll *et al.*, 1963]; la hipoplasia y el tamaño testicular reducido parecen más comunes, ya que se han observado hasta con cerca de 9% de frecuencia [Ladds *et al.*, 1973; Chenoweth y Osborne, 1978]. Estas anomalías pueden tener origen genético y, en general, afectan la espermatogénesis, lo que puede reflejarse en baja fertilidad [Ott, 1987; Marcus *et al.*, 1997; Foster, 1997].

Por otra parte, la función testicular también puede ser afectada por anomalías del escroto; y este órgano, además de lesiones y enfermedades, puede sufrir una anomalía del desarrollo. Ésta consiste en un crecimiento deficiente, que resulta en un escroto demasiado corto que, desde atrás, se ve como una cuña entre los muslos del toro (escroto cuneiforme), a diferencia del escroto normal, con cuello claramente distinguishible. Esta anomalía interfiere con la termorregulación testicular y se puede acompañar de testículos pequeños y de fertilidad reducida [Coulter, 1991; Barth, 1997; Kastelic *et al.*, 1996].

La importancia zootécnica y económica de diagnosticar precozmente estas anomalías es mucho mayor que la de hacerlo tardíamente; pero según algunos autores [Acland,

1988; Ladds, 1993] el diagnóstico es más seguro después de la pubertad. Sin embargo, no se encontró evidencia de que este diagnóstico no fuera posible a una edad más temprana. En México es escasa la información sobre estas anomalías [Galina y Arthur, 1991]; por lo que muchas veces no se presta la atención debida a las características testiculares y escrotales. De hecho, no conocemos un solo informe de algún estudio, efectuado en México, enfocado específicamente a investigar estos problemas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la frecuencia de algunas alteraciones del desarrollo testicular y escrotal en toros de las razas Brahman, Nelore y Suizo Pardo en Yucatán, México.

Materiales y métodos

Ubicación y animales

El estudio se realizó en 13 ranchos productores de pie de cría del estado de Yucatán, en una de las regiones tropicales de México. Tres ranchos eran de ganado Brahman, cinco de Nelore (ambas razas *Bos indicus*) y cinco de Suizo Pardo (*Bos taurus*). Se examinó un total de 581 toros de 6 a 24 meses de edad. Se eligió como inicial la edad de seis meses para investigar la posibilidad del diagnóstico precoz y porque a esta edad ya se pueden examinar y medir apropiadamente los testículos; además, es la edad en la que se comienza a efectuar el destete y la identificación de los becerros, por lo que es momento propicio para el examen. Del total de toros, 203 eran Brahman, 160 Nelore y 218, Suizo Pardo. Todos eran de raza pura y prospectos para su venta como sementales; y en general, se alimentaban de amamantamiento libre hasta los seis a ocho meses de edad, recibiendo además, en muchos casos, cierta cantidad de concentrado. Después del destete estos animales se mantienen, generalmente, con una buena alimentación consistente en pastoreo y una cantidad de concentrado que puede variar según las perspectivas del ganadero para cada uno. Estos toros comienzan a venderse para pie de cría alrededor de los 18 a 20 meses de edad, aunque en el caso de la raza Suizo Pardo se venden en general de dos a cuatro meses más jóvenes.

Procedimiento

Los toros entraron al estudio con base en su fecha de nacimiento. Los exámenes se efectuaron en el transcurso de dos años, con visitas cada seis meses, aproximadamente, y en cada ocasión se examinaba a los toros de 6 a 24 meses de edad que estuvieran en

el rancho, aunque ya hubieran sido examinados previamente. Las anomalías del desarrollo testicular y escrotal se diagnosticaron por inspección y palpación.

Se diagnosticó criptorquidia cuando no se encontraba uno o los dos testículos dentro de la bolsa escrotal o en otra parte fuera de la cavidad abdominal, durante una palpación exhaustiva de la región escrotal e inguinal. Como descenso incompleto se consideró el descenso desigual evidente de uno de los testículos, o la falta de descenso de ambos, aun forzándolos, hasta el fondo del escroto. La diferencia básica entre criptorquidia y descenso incompleto fue que, en este último, los testículos se encontraban en posición extraabdominal. Como hipoplasia se consideró el menor tamaño evidente y marcado de uno de los testículos, o el tamaño evidentemente reducido de ambos, con relación al tamaño del animal y con los testículos de sus contemporáneos de la misma raza, verificado por palpación y medición [Chenoweth y Osborne, 1978; Acland, 1988; Ladds, 1993; Galloway, 1994].

El escroto cuneiforme se diagnosticó por la inspección desde atrás del animal, para identificar la conformación típica de la anomalía [Coulter, 1993] y mediante la tracción hacia abajo del escroto y el intento de envolver con la mano el cuello escrotal, para verificar que la conformación observada no se debiera a la sola contracción del escroto. Las frecuencias de las anomalías observadas se compararon entre las razas por medio de la prueba de Chi cuadrada [Mead y Curnow, 1986].

Resultados

En el cuadro 1 se muestran las frecuencias de las anomalías diagnosticadas en cada raza, y en la figura 1 se presenta un ejemplo de cada una de las anomalías estudiadas. En los toros Brahman se diagnosticó un total de 17 casos de anomalías (8.37%), con porcentajes de 0.5 a 3% de cada tipo (hipoplasia, criptorquidia, descenso incompleto y escroto corto). En las razas Nelore y Pardo Suiza se diagnosticaron únicamente tres tipos de anomalías, en un porcentaje similar: 6.87% en la Nelore (11 casos en 160 toros) y 6.88% en la Pardo Suiza (15 casos en 218 animales). Las diferencias entre las razas no fueron significativas ($P > 0.05$).

Cuadro 1. Porcentajes de anomalías testiculares y escrotales en 581 toros de las razas Brahman, Nelore y Pardo Suizo de 6 a 24 meses de edad ($P > 0.05$).

	Brahman <i>N=203</i>	Nelore <i>N=160</i>	Pardo Suizo <i>N=218</i>
Hipoplasia	3.45 (7)	1.87 (3)	3.1 (7)
Criptorquidia	0.49 (1)	0	0.92 (2)
Descenso incompleto	2.96 (6)	1.25 (2)	2.75 (6)
Escroto corto	1.48 (3)	3.75 (6)	0
Total	8.37 (17)	6.87 (11)	6.88 (15)

¹ Entre paréntesis está el número de casos.

Las anomalías más comunes fueron la hipoplasia (2 a 3.5% de casos en las tres razas; media general 2.92%) y el descenso testicular incompleto (1 a 3% en las tres razas, media 2.40%), seguidas por el escroto corto (1.5 a 4% en la B y la N, media 1.55%) y la criptorquidia (0.5 a 1% en la B y la PS, media 0.52%). La anomalía más frecuente en B fue la hipoplasia (3.45%). En la raza N fue más frecuente el escroto cuneiforme (3.75%) y no se observó criptorquidia. En la PS la anomalía más frecuente fue también la hipoplasia (3.21%) y no se observó escroto cuneiforme. La única diferencia significativa ($P < 0.05$) se observó entre las dos razas *Bos indicus* y la PS en cuanto a la frecuencia de escroto cuneiforme. La hipoplasia era unilateral en 16 de los 17 casos observados (94%) en las tres razas, y afectó con una frecuencia ligeramente mayor (9:7; 56.25%; $P > 0.05$) al testículo izquierdo. Se observaron casos evidentes de hipoplasia unilateral desde los 6 a 7 meses de edad, y el problema persistió en todos los animales que fueron reexaminados hasta 6 ó 12 meses más tarde (figura 2). En ningún caso se observó que un animal normal a los 6 ó 7 meses presentara una anomalía en un examen subsiguiente. El único caso de hipoplasia bilateral se observó en un toro Brahman que, a los 22 meses, tenía una circunferencia escrotal de 23 cm.

El caso de criptorquidia observado en la raza Brahman fue unilateral (derecha) y los dos casos en la raza Pardo Suizo fueron bilaterales, además de que los dos toros eran medios hermanos por el padre. El descenso incompleto testicular fue siempre unilateral y en 12 de los 14 casos (85.71%) afectó al testículo izquierdo ($P < 0.001$); esta anomalía también se observó, con una configuración casi idéntica, en dos medios hermanos por el padre.

El desarrollo defectuoso del escroto pareció ser privativo de las razas *Bos indicus*, ya que se observó con una frecuencia similar a la de la hipoplasia en el conjunto de las

razas Nelore y Brahman (medias de las dos razas: hipoplasia, 2.66%; escroto cuneiforme, 2.62%), aunque la frecuencia en la Nelore fue de prácticamente el doble del de la Brahman. En contraste, en la raza Pardo Suiza siempre se observó el escroto completamente colgante y con el cuello bien definido.

Figura 1. Cuatro tipos de anomalías del desarrollo testicular y escrotal en toros. A: hipoplasia bilateral; B: criptorquidia bilateral; C: descenso incompleto del testículo izquierdo; y D: escroto cuneiforme.

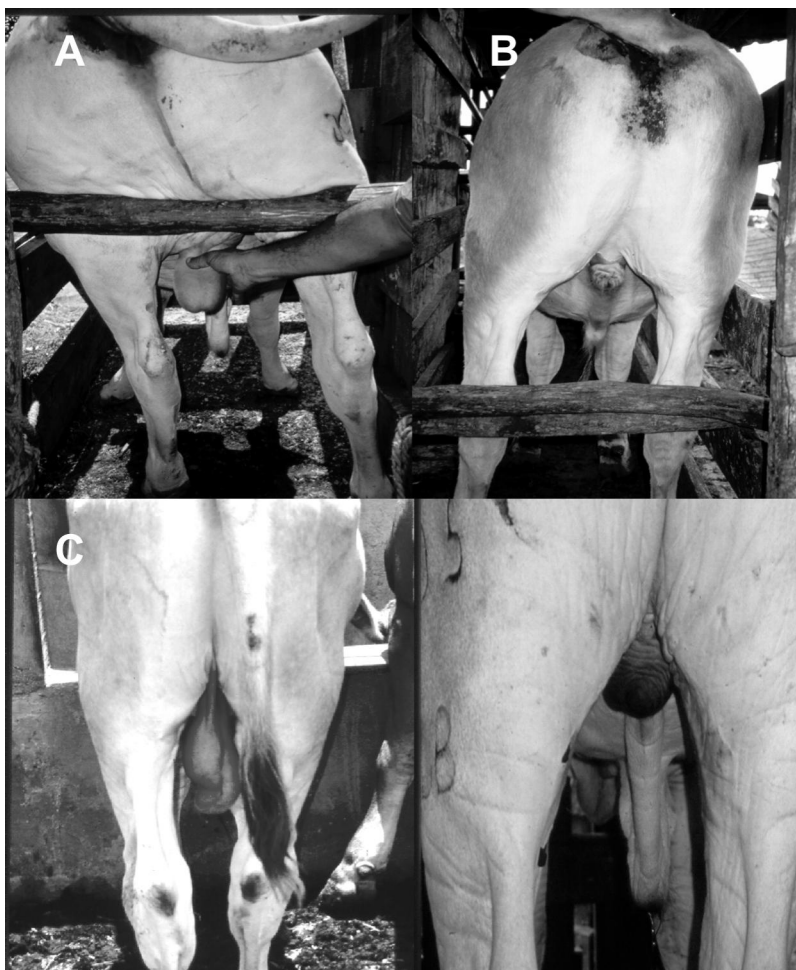
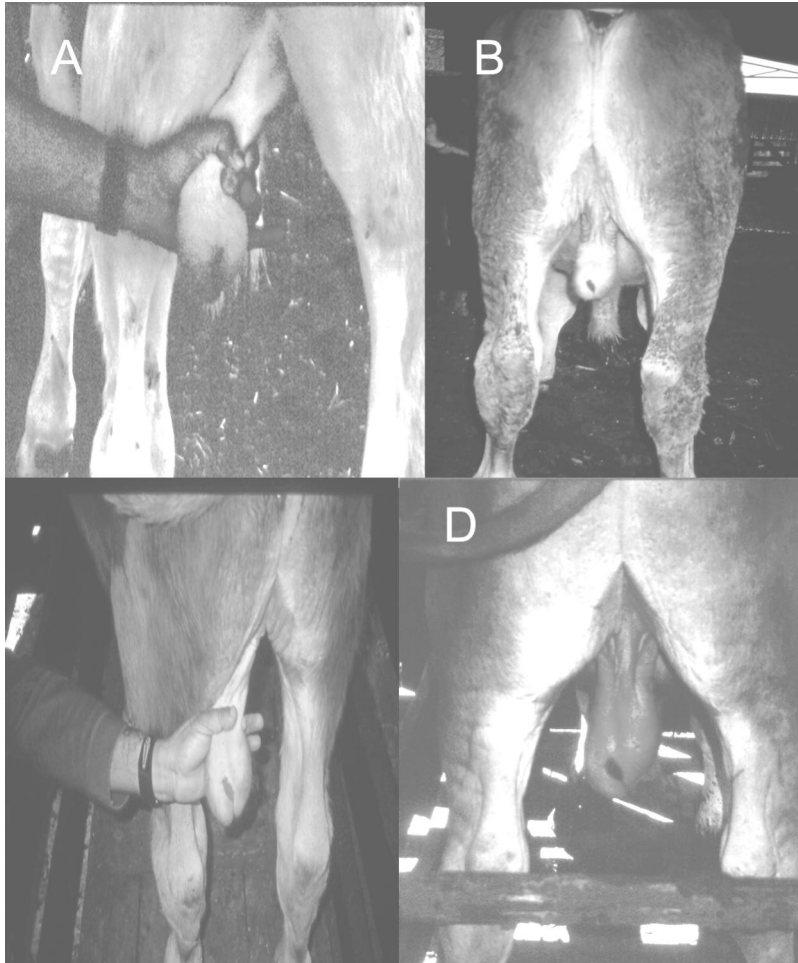


Figura 2. Hipoplasia marcada (A) y moderada (B) del testículo derecho en dos toros Suizo Pardo de 6 meses; y toro Suizo Pardo con hipoplasia moderada del testículo derecho a los 7 (C) y a los 13 (D) meses de edad.



Discusión

Algunos autores han encontrado porcentajes más bajos de hipoplasia testicular que los de este estudio en toros de varias razas [Saunders y Ladds, 1978: 0.2%], mientras que otros informan frecuencias similares a las observadas [Chenoweth y Osborne, 1978: 2.7% en un conjunto de distintas razas, pero con el porcentaje más alto en la

raza Brahman, 8.6%; Scicchitano *et al.*, 2006: 2.3% en dos razas europeas]. Los resultados del presente trabajo, como promedio de las tres razas (2.92%), son muy parecidos a la cifra general de Chenoweth y Osborne [1978], pero son menores a la frecuencia observada por estos autores en la raza Brahman, aunque ésta fue también —en el presente estudio— la raza que presentó la mayor frecuencia del problema. Es probable que los toros Brahman tengan mayor propensión que los de otras razas a presentar problemas de hipoplasia, como han sugerido algunos estudios [Chenoweth, 1991].

La hipoplasia puede tener varias causas, como: deficiencias nutricionales o carencias específicas en la dieta, anomalías endocrinas y algunas alteraciones genéticas o cromosómicas [Acland, 1988; Ladds, 1993]. Un caso particular de alteración cromosómica que causa hipoplasia bilateral es el conocido como síndrome de Klinefelter en humanos, en el que los individuos afectados tienen la constitución cromosómica XXY en lugar de la típica masculina XY. El único toro con hipoplasia bilateral (de raza Brahman) encontrado en este estudio, resultó estar afectado de esta alteración, según se verificó en un estudio colateral al presente [Reyes Lerma, 2003]. La hipoplasia unilateral parece ser más común, aunque esto podría relacionarse con la mayor facilidad para diagnosticarla, ya que el testículo normal sirve como referencia [Acland, 1988; Ladds, 1993]; además, parece afectar con mayor frecuencia al testículo izquierdo, como se observó en el presente trabajo.

Un aspecto importante fue la observación de casos evidentes de hipoplasia unilateral en toros de 6 a 7 meses de edad y la persistencia del problema, al menos hasta 12 meses más tarde; ya que, en general, se considera que el problema es de más fácil diagnóstico después de la pubertad [Acland, 1988; Ladds, 1993].

Por otra parte, el que no se haya observado la aparición de una anomalía en el segundo o tercer examen de un animal, normal en el primer examen, sugiere que estas anomalías aparecen precozmente. También sugiere que la aparición tardía de una de estas alteraciones podría considerarse secundaria a algún problema, aunque probablemente esto no podría ocurrir con la criptorquidia o el escroto cuneiforme. Según los presentes resultados, por lo menos la hipoplasia unilateral se puede diagnosticar mucho antes de la pubertad; los casos de hipoplasia bilateral resultan de más difícil diagnóstico debido a que, de manera natural, algunos animales son de desarrollo relativamente tardío y su menor talla testicular en un momento dado se puede deber simplemente a un atraso del desarrollo [Silva-Mena, 1997; Brito *et al.*, 2004]. Los testículos hipoplásicos contienen menos túbulos seminíferos y éstos tienen una funcionalidad reducida o alterada [Ott, 1987; Acland, 1988; Ladds, 1993].

El porcentaje de criptorquidia observado es semejante al que informan varios autores en toros de diferentes razas [Carroll *et al.*, 1963: 0.13%; Saunders y Ladds,

1978: 0.60%; Scicchitano *et al.*, 2006: 0.18%] y concuerda con la frecuencia que se observa en la especie bovina [Amann y Veeramachaneni, 2007: <0.50%]. En este estudio se consideró como criptorquidia la ubicación intraabdominal del testículo, pero algunos autores [Acland, 1988; Ladds, 1993; Amann y Veeramachaneni, 2006 y 2007] consideran como tal, incluso la presencia del testículo fuera de la cavidad abdominal, pero no en su posición escrotal normal, lo que se determinó aquí como descenso incompleto. Si se incluyera éste como criptorquidia se tendría un porcentaje más alto del problema que el que generalmente se reporta, ya que sería del orden del 2.5% en el conjunto de las tres razas, con el menor porcentaje en la raza N. De hecho, las dos situaciones tienen la misma causa, que es una anomalía de la diferenciación testicular y de su función, que puede manifestarse también después de la pubertad con otros síntomas que, aunque no se encuentren simultáneamente en un individuo, en conjunto configuran un síndrome de disgenesia testicular (TDS, por sus siglas en inglés); éstos pueden ser anomalías de la espermatogénesis, tumores testiculares, etcétera [Amann y Veeramachaneni, 2006; 2007].

Estas alteraciones pueden ocurrir en el testículo descendido de un individuo con criptorquidia unilateral, o incluso en individuos aparentemente normales, ya que la disgenesia testicular no siempre se traduce en criptorquidia. La disgenesia de los testículos puede ser causada por factores genéticos, epigenéticos (cambios heredables en la expresión genética sin modificaciones en el ADN) o ambientales (exposición *in utero* a estrógenos o a antiandrógenos) [Amann y Veeramachaneni, 2006; 2007]. Algunos casos observados en este estudio sugieren la intervención del factor genético, ya que en un rancho se encontró un par de criptorquidios bilaterales, medios hermanos por el padre, y uno de medios hermanos con descenso incompleto del testículo izquierdo; cada par era de diferente padre.

La criptorquidia es de más fácil diagnóstico incluso a temprana edad, ya que los testículos descienden al escroto en el periodo perinatal; la forma unilateral es más frecuente y afecta mayormente al testículo izquierdo, como se observó en este trabajo, probablemente debido a que éste desciende, en general, más tarde que el derecho [Acland, 1988; Ladds, 1993; Amann y Veeramachaneni, 2006; 2007]. Los testículos intraabdominales no producen espermatozoides y los no completamente descendidos pueden tener un grado variable de disfunción, independientemente de los problemas que pueden ocurrir como manifestación de la disgenesia testicular de la que la criptorquidia es una consecuencia. Por esta razón, los criptorquidios unilaterales, con el testículo descendido aparentemente normal, pueden presentar diferentes grados de subfertilidad [Marcus *et al.*, 1997].

En cuanto al escroto corto o cuneiforme, no se encontró información acerca de su frecuencia. Sin embargo, se puede considerar relativamente alta, en particular en la

raza Nelore, en donde fue el problema más frecuente. Aunque no se encontró referencia a una causa genética de esta alteración, una influencia de este tipo es probable en el origen del problema, dado el hecho de que se haya encontrado en las razas Brahman y Nelore, pero no en la Pardo Suiza. El escroto cuneiforme mantiene a los testículos muy cerca de la pared abdominal e impide la regulación térmica adecuada de estos órganos, por lo que su función resulta afectada [Barth, 1997; Coulter, 1993]. El escroto corto se puede diagnosticar desde los seis meses de edad, cuando ya se puede hacer la medición de los testículos: si no se puede asir con la mano el cuello escrotal, lo más probable es que se deba a la longitud reducida del escroto. Sin embargo, no se cuenta con información sobre la evolución de este problema cuando se diagnostica a edad temprana. En este trabajo, cuatro toros con el problema a los 6 meses, lo presentaban todavía alrededor del año de edad.

Conclusiones

La frecuencia de alteraciones del desarrollo testicular y escrotal en las tres razas es moderadamente alta y no difiere entre razas, aunque hay variaciones en las frecuencias de anomalías específicas entre las razas; estas anomalías se pueden diagnosticar desde los seis meses de edad al menos, posiblemente con excepción de la hipoplasia bilateral.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Produce Yucatán, A. C., por el financiamiento del trabajo; y a la Asociación de Criadores de Ganado de Registro de las Razas Brahman, Nelore y Suizo Pardo del estado de Yucatán, por todas las facilidades otorgadas para desarrollar el estudio.

Literatura citada

- Acland, H. M. 1988. *Male Reproductive System*. En: *Special Veterinary Pathology*. Editado por R. G. Thompson. B. C. Decker Inc. Estados Unidos de América. Pp. 609-622.
- Amann, R. P. and Veeramachaneni, D. N. R. 2006. *Cryptorchidism and associated problems in animals*. Anim. Reprod. 3: 108-120.
- Amann, R. P. and Veeramachaneni, D. N. R. 2007. *Cryptorchidism in common eutherian mammals*. Reproduction. 133: 541-561.
- Barth, A. D. 1997. *Evaluation of potential breeding soundness of the bull*. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Editado por R. S. Youngquist. W. B. Saunders Company. Estados Unidos de América. 222-236.
- Brito, L. F. C.; Silva, A. E. D. F.; Umanian, M. M.; Dode, M. A. N.; Barbosa, R. T. and Kastelic, J. P. 2004. *Sexual development in early- and late-maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil*. Theriogenology. 62: 1198-1217.

- Carrol, E. J.; Ball, L. and Scott, J. A. 1963. *Breeding soundness in bulls: A summary of 10940 examinations*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 142:1105-1111.
- Chenoweth, P. J. 1991. *Bos indicus bulls – how different are they?* Proc. Ann. Mtg. Soc. Theriogenology. San Diego. 117-122.
- Chenoweth, P. J. and Osborne, H. G. 1978. *Breed differences in abnormalities of the reproductive organs of young beef bulls*. Australian Veterinary Journal. 54: 463-468.
- Coulter, G. H. 1991. *Scrotal circumference - A review*. Proc. Ann. Mtg. Soc. Theriogenology. San Diego. 113-116.
- Coulter, G. H. 1993. *Selection and management of the beef bull to optimize reproduction performance*. Soc. Theriogenology Newsletter. 16: 3-9.
- Foster, R. A. 1997. *Pathology of the scrotal contents and accessory sex glands of domestic animals*. Proc. Reproductive Pathology Symposium. American College of Theriogenologists and Society for Theriogenology. Montreal. Pp. 37-49.
- Galina, C. S. and Arthur, G. H. 1991. *Review of cattle reproduction in the tropics. Part 6. The Male*. Anim. Breed. Abstr. 59: 403-412.
- Galloway, D. B. 1994. *A review on male reproductive function and dysfunction*. Proc. of a regional seminar held by the International Foundation for Science (IFS). Nigeria. Pp. 171-192.
- Kastelic, J. P.; Cook, R. B.; Coulter, G. H. and Saacke, R. G. 1996. *Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal testicular temperature in the bull*. Theriogenology. 45: 935-942.
- Ladds, P. W.; Dennett, D. P. and Glazebrook, J. S. 1973. *A survey of the genitalia of bulls in northern Australia*. Australian Veterinary Journal. 49: 335-340.
- Ladds, P. W. 1993. *The Male Genital System*. In: *Pathology of Domestic Animals*. Editado por K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy y N. Palmer. Academic Press. Estados Unidos de América. Pp. 471-529.
- Marcus, S.; Shore, L. S.; Perl, S.; Bar-el, M. and Shemesh, M. 1997. *Infertility in a cryptorchid bull: a case report*. Theriogenology. 48: 341-352.
- Mead, R. and Curnow, R. N. 1986. *Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology*. Chapman and Hall Ltd. Inglaterra. Pp. 218-238.
- Ott, R. S. 1987. *Scrotal circumference- how small is too small?* Proc. Ann. Mtg. Soc. Theriogenology. Austin. Pp. 1-13.
- Reyes-Lerma, A. C. 2003. *Frecuencia de alteraciones testiculares y su asociación con aberraciones cromosómicas en toros del estado de Yucatán*. Tesis para el grado de Maestro en Producción Animal. Opción: Reproducción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UADY. Mérida.
- Silva-Mena, C. 1997. *Peripubertal traits of Brahman Bulls in Yucatán*. Theriogenology. 48: 675-685.
- Saunders, P. J. and Ladds, P. W. 1978. *Congenital and developmental anomalies of the genitalia of slaughtered bulls*. Australian Veterinary Journal. 54: 10-13.
- Scicchitano, S.; Spinelli, R.; Campero, C. M. y Crenovich, H. 2006. *Causas de rechazo en toros de razas para carne*. Veterinaria Argentina. 23: 574-585.
- Töszér, J.; Nagy, A.; Superk, Z. and Nagy, J. 1994. *Evaluation of scrotum development of Hungarian Simmental and Charolais bulls of different ages in performance test, in Hungary*. World Review of Animal Production. 29: 67-72.

Recibido: Abril 28, 2008

Aceptado: Octubre 13, 2008

Poblaciones bacterianas utilizadoras de hidrógeno presentes en el tracto gastrointestinal del avestruz (*Struthio camelus* Var. Domesticus)

Population bacteria H₂-Utilizing, from gastrointestinal tract of *Struthius camellus* (Var. domesticus)

Miramontes-Carrillo, J. M.;³ Ibarra, A. J.;¹ Ramírez, R. M.;¹ Ibarra, A. F. J.;³ Miramontes, V. A. L.¹ y Lezama, G. R.²

¹Centro de Investigación de Desarrollo Educativo (CIDE)
Av. Mina No. 25, Colonia Barrio de Santa Ana
Compostela, Nayarit (México).

²Laboratorio de Control Biológico. Universidad de Colima
Tecomán, Colima (México).

³ Investigación Biotecnológica. Juárez 62 Ote.
Compostela, Nayarit (México).

*Correspondencia: jmancar2006@hotmail.com

Resumen

Tres grupos de bacterias compiten por hidrógeno en diferentes ecosistemas anaerobios, y junto con CO₂, producen metano, sulfuro de hidrógeno y acetato. Estas reacciones representan ganancia de energía al animal. Motivo por el cual, el presente trabajo pretende evaluar la presencia y tamaño de poblaciones de bacterias utilizadoras de hidrógeno en el tracto gastrointestinal del avestruz. Para ello se utilizaron medios AC11 para acetogénicas, Potgate para sulfato-reductoras y Fosfato buffer para metanogénicas. Las poblaciones se determinaron por el método del número más probable (NMP). El diseño fue completamente al azar, con arreglo factorial, A = porciones del tracto digestivo y B = microorganismo. El NMP, de acetogénicas y metanogénicas fue cero. Las bacterias sulfato-

Abstract

Three groups of bacteria compete for hydrogen in different anaerobic ecosystems; along with CO₂ they produce methane, hydrogen sulfide and acetate. These reactions mean energy gain for the animal. The purpose of this study was to determine presence and size of populations of hydrogen utilizing bacteria in different portions of the gastrointestinal tract of the ostrich. Anaerobic procedures and culture media were used for isolation and quantification. AC11 media was used for acetogenic, Potgate for sulfate reducing and phosphate buffer for methanogenic bacteria. Size of populations was determined by most probable number (MPN). The experimental design was completely random, with factorial arrangement A= portions of digestive tract and B= microorganism types. MPN of acetogenic and methano-

reductoras están presentes en todo el tracto gastrointestinal. Las poblaciones fueron 544.00; 532.00; 157.20; 155.32 y 76.48 x 10⁶ para el intestino grueso, ciegos, intestino delgado, proventrículo y ventrículo, respectivamente. Los resultados confirman presencia y predominio de las sulfato-reductoras en todas las porciones del tracto gastrointestinal del *Struthio camelus*. La producción de AGV en el tracto gastrointestinal del avestruz, es producto del metabolismo y reutilización del hidrógeno por bacterias sulfato-reductoras.

Palabras clave

Bacterias utilizadoras de hidrógeno, acetogénesis, metanogénesis, sulfato-reductores, Ostrich.

genic bacteria was zero. Sulfate reducing bacteria were present in all gastrointestinal tracts. The results for the number of population were 544.00, 532.00, 157.20, 155.32 and 76.48 x 10⁶ for the large intestine, cecum, small intestine, proventricle, and ventricle, respectively. Results confirm the presence and prevalence of sulfate-reducing bacteria in all the gastrointestinal tract portions evaluated from ostriches. The AGV production in the ostrich gastrointestinal tract is a result of the metabolism and reuse of hydrogen by sulfate-reducing bacteria.

Key Words

H₂-utilizing bacteria, acetogenesis, methanogenesis, sulphate-reducing bacteria, ruminants, ostrich.

Introducción

La eficiencia en la degradación de la materia orgánica dentro de algunos ecosistemas anaerobios —como el tracto gastrointestinal— depende de las interacciones metabólicas entre los microorganismos que lo habitan [Morvan *et al.*, 1996a; Williams, 1989; Gittel *et al.*, 2008]. Estas comunidades microbianas están formadas principalmente por bacterias y hongos, los cuales degradan los vegetales mediante una serie de fases enzimáticas sucesivas y cuyos productos o metabolitos de determinados microorganismos, sirven como sustrato a otras bacterias [Leedle *et al.*, 1982]. En esta interacción metabólica, el hidrógeno es el elemento intermediario más abundante porque es producido por microorganismos hidrolíticos y fermentadores que habitan los ecosistemas anaerobios [Blaut, 1994; Mitsunori *et al.*, 1997]. El hidrógeno, junto con el CO₂, son reutilizados por las bacterias acetogénicas, metanogénicas y sulfato-reductoras (BSR), constituyéndose en recicladores finales de este producto de fermentación [Gibson *et al.*, 1990; Dore *et al.*, 1995a; Imming, 1996; Ferry, 1997].

Este fenómeno se observa también en otros ecosistemas; entre ellos, el rumen, sedimento marino, termitas, intestino y ciegos de animales, así como en seres humanos saludables y enfermos [Kane y Breznak, 1991; Hungate, 1966; Gibson *et al.*, 1990; De Grave *et al.*, 1994; Santana, 2008; Vianna *et al.*, 2008; Sekiguchi *et al.*, 2008;

Conway y Macario, 2008]. Aunque grandes cantidades de hidrógeno son producidas durante la descomposición anaerobia de la materia orgánica (por ejemplo, 4 M de hidrógeno por M de hexosa utilizada), la concentración de H₂ en estos ecosistemas es usualmente baja (10⁻⁵ a 10⁻³ atm), por lo que la eficiencia en su aprovechamiento depende del tipo de población de bacteria utilizadora de H₂ que domina el ecosistema [Breznak y Kane, 1990]. Los tres grupos bacterianos que reciclan el hidrógeno, difieren en sus vías metabólicas; las bacterias metanogénicas lo utilizan para reducir el CO₂ y metano, las BSR lo usan para reducir sulfatos y producir sulfuros y las bacterias acetogénicas reducen CO₂ y producen acetato [Breznak *et al.*, 1988; Brauman *et al.*, 1992; Dore *et al.*, 1995b; Morvan *et al.*, 1996b; Ferry, 1997]. El efecto de cada uno de los grupos de bacterias se manifiesta por la producción de energía en forma de ácidos grasos volátiles (AGV), y al parecer, cuando predominan las acetogénicas o sulfato-reductoras, se produce una mayor cantidad de energía [Sorlini *et al.*, 1988; Breznak y Brune, 1994]. El avestruz africano (*Struthio camelus*) es un herbívoro que digiere eficazmente los constituyentes de las paredes celulares de las plantas con valores de 66% de materia seca [Swart *et al.*, 1993a].

La fermentación ocurre en sus cámaras especializadas del intestino, las cuales tienen como características: su gran capacidad y contenido de ingesta, pH neutro, alta concentración de ácidos grasos volátiles, baja concentración de ácido láctico y alta concentración de amonio [Swart *et al.*, 1993b]. Por lo que el alto nivel de AGV encontrados en el tracto gastrointestinal del avestruz y en particular en el proventrículo, indica que —en comparación con otras especies de animales— la digestión de las paredes celulares de los vegetales en este ecosistema es más eficaz, por lo que es posible que exista presencia y predominio de alguno de estos tres grupos de bacterias en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del avestruz. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y tamaño de las poblaciones de las bacterias utilizadoras de hidrógeno en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del avestruz.

Materiales y métodos

Animales y condiciones de alimentación

Se utilizaron para el estudio cinco avestruces machos, con una edad de entre 12 a 14 meses. Los animales fueron alimentados con una dieta rica en paredes celulares. El alimento se ofreció a las 8:00 y a las 16:00 h y el agua a libre acceso. La composición de la dieta y su análisis proximal se muestra en el cuadro 1. Cada uno de los animales se colocó en corrales de 20 por 40 m; cada uno de estos corrales contó con un comedero y un bebedero. Los animales se adaptaron a la dieta por un tiempo de 30 días.

Cuadro 1. Evaluación de la dieta y su análisis bromatológico.

<i>Componentes</i>	<i>(g / Kg)</i>
Rastrojo con maíz	530
Alfalfa molida	340
Harina de pescado	84
Piedra caliza	10
Fosfato mono cálcico	26
Cloruro de sodio	10
Análisis Bromatológico	
PC %	16.37
EM Mcal / Kg	2.25
Materia seca	86.68
Materia orgánica	87.12
Celulosa %	21.82
Hemicelulosa	14.12

Obtención del inóculo

Los avestruces fueron aturdidos y sacrificados. Después, se desangraron, se les retiró la piel y se abrió la cavidad abdominal para extraer las vísceras. Se separó el tracto gastrointestinal, luego se ligó la parte posterior del esófago y la parte posterior del recto para evitar la salida de contenido intestinal, como recomiendan Sales y Oliver [1996]. Posteriormente, las porciones fueron separadas utilizando dos ligaduras en cada uno de los cinco segmentos, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, ciegos y colon [Swart *et al.*, 1993a]. Del contenido total de digesta de cada uno de los segmentos se tomaron 5 g de muestra. Éstas se colocaron en 5 frascos de una solución anaeróbica adicionada con 10% de glicerol, más 1 g de agente reductor sulfato de cisteína al 2.5% [Levet, 1991]. Todos los procedimientos y la preparación de medios, agentes reductores, soluciones de minerales y agentes reductores se realizaron dentro de la cámara de anaerobiosis.

Procesos de preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron preparados dentro de una cámara de anaerobiosis marca Anaerobic chamber, Modelo 855-AC, ACB, Plas-Labs, INC. Lansing Michigan, U. S. A., utilizando las técnicas de Hungate's [1966]. El medio de aislamiento utilizado para las bacterias acetogénicas fue el Ac-11, de Breznak y Switzer

[1986], el cual se modificó de acuerdo a lo sugerido por Greening y Leedle [1989], Rieu-Lesme *et al.* [1996] y Morvan *et al.* [1996a], quienes agregaron ácido 2-bromoetanosulfónico para evitar el crecimiento de las bacterias metanogénicas. Para las BSR se utilizó el medio de Postgate's [Levet, 1991]. Para las archaeobacterias (metanogénicas) se utilizó el fosfato buffer de Levett [1991], al cual se adicionó penicilina G y estreptomicina, para evitar el crecimiento de eubacterias [Van Kessel y Russel, 1996; Tokura *et al.*, 1997; Anderson y Rasmussen, 1998]. Para la cuantificación de las bacterias, se utilizó el método del número más probable (NMP), de acuerdo con Clarke y Owen [1983], citado por Morvan *et al.* [1994] y Braun *et al.*, [1979].

Aislamiento y cuantificación de bacterias utilizadoras de hidrógeno

Los constituyentes de cada uno de los tres medios se pesaron en una balanza electrónica y se colocaron en un matraz Erlen Meyer de 500 ml y se clarificaron por calentamiento. Al mismo tiempo, se indujo anaerobiosis en el medio con la aplicación de CO₂ libre oxígeno. Para la eliminación del oxígeno, se hizo pasar el CO₂ por una columna de cobre a una temperatura de 350° C y esta columna se colocó directamente en la cámara de anaerobiosis. Una vez preparado el medio de cultivo se esterilizó a 121° C, por 15 minutos.

Se procedió a depositar 4.5 ml del medio de cultivo a los tubos de ensayo. Se sembraron los tubos por medio de inoculación de 5 tubos con el medio de cultivo específico y se tomó con una pipeta automática 0.5 ml de cada una de las diluciones (de 10⁻² hasta 10⁻¹⁰), con la muestra. Los tubos inoculados se incubaron a 39°C durante 14 días al abrigo de la luz. Pasado ese tiempo de incubación, se estimó el NMP. Para el aislamiento y cuantificación de SRB, se utilizó el medio de Postgate especificado según Levet [1991].

Para las bacterias metanogénicas se preparó medio de Fosfato-buffer. Se disolvieron los componentes del medio de cultivo (excepto la solución de vitaminas y agente reductor) en agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.2 a 7.4. Se añadieron 0.2% de la solución de resazurina a cada medio (1 ml/1000 ml del medio). Se procedió a disolver el oxígeno del medio, por calentamiento, bajo un chorro caliente de gas de CO₂. El medio se repartió en tubos de ensayo y se presurizaron con CO₂ depositando con un repartidor automático, 4.5 ml del medio anaeróbico. Los tubos fueron sellados con tapón de hule y sello de aluminio y se esterilizaron en autoclave por un tiempo de 25 minutos a una temperatura de 121°C. Una vez que los medios se enfriaron, se añadió 0.1 de la solución de vitaminas esterilizadas por filtración, en medio buffer (15% de KH₂PO₄ + 29% de K₂HPO₄, pH de 7.0 a 7.1), y 0.2 ml de la solución de cisteína al 2.5% [Morvan *et al.*, 1994]. Para evitar el crecimiento de otras bacterias se le

agregó penicilina G y estreptomina a razón de 1 mg de cada uno por cada ml de medio [Tokura *et al.*, 1997]. El medio para las bacterias acetogénicas es el Ac-II, propuesto por Breznak y Switzer [1986], modificado por Greening y Leedle [1989]. Se adicionó solución de ácido 2-bromoetnosulfónico, el cual se preparó disolviendo el compuesto en agua bidestilada y después se esterilizó por filtración por medio de filtros de membrana. Luego, se añadió solución de vitaminas y minerales traza hasta completar el volumen de II.

Numeración de bacterias por el método del número más probable (NMP)

Se prepararon una serie de diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-9} con solución anaeróbica; después se inocularon 5 tubos de ensayo con 1 ml medio de cultivo específico para cada grupo bacteriano, de las 4 diluciones más bajas (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}). Todos los tubos se incubaron en la cámara de anaerobiosis por un tiempo de entre 7 a 14 días a una temperatura de 39°C, bajo oscuridad. Para evidenciar el crecimiento microbiano al finalizar, se determinó la turbidez del medio de cultivo o la presencia de un anillo superficial que fue índice de crecimiento microbiano [Dore, 1995a; Dehority *et al.*, 1989].

Diseño experimental

Para el presente estudio se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 5x3, donde el factor A= cinco porciones del tracto gastrointestinal (intestino grueso, ciegos, intestino delgado, proventrículo y ventrículo) y el factor B= tres grupos de bacterias (acetogénicas, metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras). El número de repeticiones fue de cinco.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Los promedios fueron separados mediante la aplicación de la prueba de Tukey al 0.05% de probabilidad. Lo anterior se realizó mediante el paquete estadístico SAS [SAS, 1985].

Resultados

Presencia y cuantificación de bacterias metanogénicas y acetogénicas en el tracto gastrointestinal

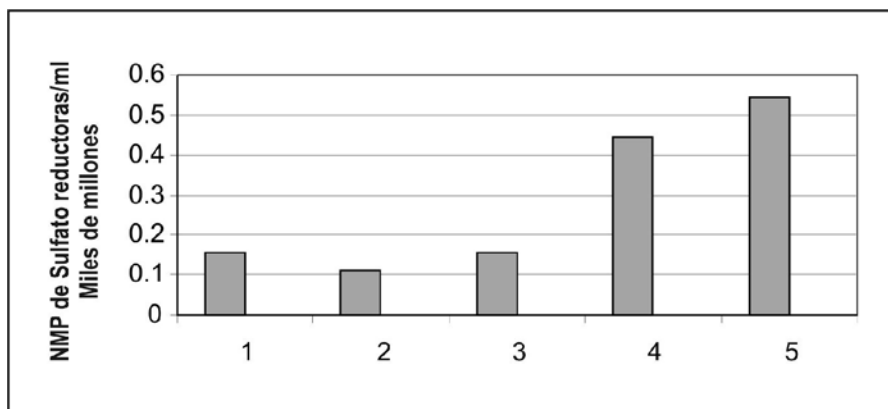
No se observó crecimiento en los tubos utilizados para la determinación del NMP de archaeobacterias y de acetogénicas en todo el tiempo de incubación. El aislamiento y

cuantificación de las poblaciones de BSR en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del avestruz en el medio de cultivo de Postgate específico mostró crecimiento bacteriano, el cual se evidenció por la presencia de un precipitado negro en todos los tubos utilizados para la cuantificación, por lo que el resultado se considera positivo para todas las porciones del TGI.

Tamaño de las poblaciones de bacterias sulfato-reductoras (BSR)

En la porción del intestino grueso se observa el mayor tamaño de población de 544.00×10^6 ; enseguida, los ciegos 446.00×10^6 ; luego el intestino delgado con una población de 157.20×10^6 , le sigue el proventrículo con 155.32×10^6 ; y por último, el ventrículo con 110.14×10^6 (cuadro 2, figura 1). El análisis de varianza, mostró diferencias significativas entre las diferentes porciones ($P < 0,05$).

Figura 1. Promedio de los valores de las poblaciones de bacterias sulfato-reductoras en las porciones del TGI del avestruz.



1 = Proventrículo; 2 = Ventrículo; 3 = Intestino delgado; 4 = Ciegos; 5 = Intestino grueso.

Discusión

Los resultados del estudio demuestran la hipótesis de que la actividad microbiana reportada para cada una de las cinco porciones del tracto gastrointestinal está determinada por la presencia y predominio de uno de los tres grupos de bacterias que reciclan el hidrógeno en el tracto gastrointestinal del avestruz alimentado con dietas ricas en paredes celulares. La presencia de las SFR en el avestruz supone la existencia de microorganismos anaerobios productores de hidrógeno que propician las condiciones

para reacciones bioquímicas termodinámicamente factibles, como lo indica Wolin [1982].

En el intestino grueso del avestruz se observa presencia de una mayor población de BSR. Sin embargo, los resultados no son acordes con los reportados por Fievez *et al.* [1999], aunque estos autores solamente mencionan resultados a partir del colon del avestruz, donde encuentra que son predominantes las bacterias acetogénicas. Aunque la presencia de BSR en todas las porciones del tracto digestivo avestruz, concuerda con las reportadas en humanos sanos y enfermos mencionadas por Gibson *et al.* [1988], quienes indican que hay individuos con SFR que predominan sobre la flora bacteriana metanogénica.

Ushida *et al.* [1995] mencionaron que la concentración de sulfatos en los diferentes ecosistemas es el principal factor limitante en el desarrollo de poblaciones de BSR y las concentraciones de sulfatos difieren entre los ecosistemas de los herbívoros. Kristjansson y Schönheit [1982a] reportaron que las BSR tienen mayor afinidad por el hidrógeno en comparación con las metanogénicas, y que el mecanismo de reducción del sulfato, puede proporcionar más energía que la reducción del dióxido de carbono, por lo que las BSR tienen más ventajas que las metanogénicas en condiciones y sustratos apropiados [Kristjansson, 1982b; De Sousa *et al.*, 2008], lo cual explica la gran producción de ácidos grasos volátiles encontrados en cada una de las porciones del tracto gastrointestinal del avestruz estudiadas por Swarts *et al.* [1993a]. Además, dentro de los individuos excretores de metano es probable que las BSF utilicen el lactato como equivalentes transferidores de hidrógeno para dominar las bacterias metanogénicas.

En otro estudio, los resultados revelan que la metanogénesis y la sulfato-reducción son mutuamente excluyentes dentro del ecosistema del colon [Gibson *et al.*, 1990; Pochart *et al.*, 1992]. Los resultados de esta investigación son afines con los presentados por Swart [1993a], quien reporta que en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal de avestruz, la concentración de ácido láctico varía ampliamente: proventrículo, 5 mM; ventrículo, 6mM; intestino delgado, 66 mM; ciegos, 7 mM; colon proximal, 19 mM y colon distal, 26; por lo que es posible que las bacterias metanogénicas no se encuentren presentes en los animales utilizados en este experimento y pudiera ser probable que las bacterias metanogénicas sean inhibidas por las BSR al metabolizar el ácido láctico a acetato por uno de sus dos mecanismos de transporte de electrones [Hansen, 1994; Noguera *et al.*, 1998].

Tomando en consideración que los avestruces presentan el hábito de la coprofagia y que la descamación natural del epitelial del intestino libere mucina rica en sulfatos, lo cual propicia el medio adecuado para las BSR, lo que concuerda con resultados presentados por Gibson *et al.* [1988], en donde, en un sistema de cultivos continuos la

suplementación con mucina aumenta significativamente el número de BSR. Los mismos autores, en estudios realizados en humanos, concluyeron que en la sulfato-reducción, la acetogénesis y la metanogénesis no ocurren concomitantemente en algunas porciones del tracto gastrointestinal [Robichaux *et al.*, 2003]; es posible, entonces, que tanto en los sujetos no metanogénicos —al igual que en el avestruz— no existen competencias entre las bacterias sulfato-reductoras y los otros dos grupos de bacterias utilizadoras de hidrógeno. Además, el efecto de la acidez en estas porciones, son reforzados por medio de las mediciones del pH con valores de 1.6 en el proventrículo, 2.1 en el ventrículo, 6.9 en el intestino delgado y ciego, colon proximal de 7.2 y el colon distal de 8.2 [Swart *et al.*, 1993a]. Las poblaciones de BSR encontradas en el colon proximal y distal en esta investigación coinciden en que estas bacterias se ven favorecidas por los valores del pH.

Sin embargo, el tamaño de las poblaciones encontradas en las demás porciones pueden explicarse con el hecho publicado por [Hansen, 1994], el cual menciona que las BSR son consumidoras de ácido láctico y parece que este compuesto se encuentra presente en concentraciones más altas, por lo que es posible que debido a la presencia de ácido láctico y sulfatos, las BSR sean las únicas presentes. Los resultados publicados por Butine y Leedle [1989] muestran que en el colon existen más de dos veces poblaciones de bacterias hidrolíticas y fermentadoras del xilano que en las otras porciones, por lo que tomando en cuenta los resultados de esta investigación, es posible deducir que la interacción entre bacterias hemicelulolíticas y BSR predominan en animales alimentados con dietas ricas en hemicelulosa; no obstante, en el actual estudio no se midieron estos grupos de las poblaciones hidrolítica, xilanolíticas y celulolíticas. Los resultados obtenidos sugieren realizar más investigaciones para aclarar los géneros y especies de bacterias SR de estos ecosistemas.

Del mismo modo, es necesario conocer si en estos hábitats hay presencia de protozoarios y hongos productores de hidrógeno y sus tipos de interacciones metabólicas. Igualmente, no se han reportado cuáles son las condiciones ambientales que prevalecen en estas porciones de tracto gastrointestinal y la fuente de azufre utilizada, de dónde proviene y cómo se mantiene el nivel óptimo para el predominio de estas poblaciones.

Conclusiones

El hidrógeno, uno de los últimos productos de la fermentación del tracto gastrointestinal del avestruz alimentado con dietas ricas en paredes celulares, es reutilizado como terminales o depósito por las bacterias sulfato-reductoras, las cuales dominan este ecosistema.

Literatura citada

- Anderson, R. C. and Rasmussen, M. 1998. *Use of a novel nitrotoxin-metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production*. *Bioresource Technology*. (64):89-95.
- Blaut, M. 1994. *Metabolism of methanogens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. (66):187-208.
- Brauman, A. D.; Kane, M.; Labat, M. and Breznak, J. A. 1992. *Genesis of Acetate and Methane by gut bacteria of nutritionally diverse termite*. *Science*. (257):1384-1387.
- Braun, M.; Schobert, S. and Gottschalk, G. 1979. *Enumeration of bacteria forming acetate from H₂ and CO₂ in anaerobic habitats*. *Archives of Microbiology*. (120):201-204.
- Breznak, J. A.; Switzer, J. M. and Seitz, H. J. 1988. *Sporomusa termitida sp. Nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolate from termites*. *Archives of Microbiology*. (150): 282-288.
- Breznak, J. A. and Switzer, J. M. 1986. *Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes*. *Applied and Environmental Microbiology*. (52):623-630.
- Breznak, J. A. and Kane, M. D. 1990. *Microbial H₂/CO, cetogenesis in animal guts; nature and nutritional significance*. *FEMS Microbiology Reviews*. (87): 309-314.
- Butine, T. J. and Leedle, J. A. Z. 1989. *Enumeration of selected anaerobic groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs*. *Applied and Environmental Microbiology*. (26):1112-1116.
- Clarke, K. R. and Owens, N. J. P. 1983. *A simple and versatile microcomputer program for the determination of "most probable numberce."* *Journal of Microbiology Method*. (1):133-137.
- Conway de Macario, E. and Macario, A. J. 2008. *Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis*. *Int. J. Med. Microbiol*.
- DeGrave, K. G.; Grivet, J. P.; Durad, M.; Baumatin, P.; Cordelet, C.; Hannequart, G. and Demeyer, D. 1994. *Competition between reductive acetogenesis and methanogenesis in the pig large intestinal flora*. *Journal of Applied Bacteriology*. (75):55-61.
- Dehority, B. A.; Tirabasso, P. A. and Grifo, Jr., A. P. 1989. *Most-Probable-Number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium*. *Applied and Environmental Microbiology*. (55) (11): 2789-2792.
- Dore, J. B.; Porchart, B.; Bernalier, A.; Goderel, Y.; Morvan, B. and Rambaud, J. C. 1995 (a). *Enumeration of H₂-utilizing Methanogenic archaea, acetogenic and sulfate-reducing bacteria from human feces*. *FEMS microbiology Ecology*. (17):279-284.
- Dore, J. B.; Porchart, B.; Bernalier, A.; Goderel, Y.; Morvan, B. and Rambaud, J. C. 1995 (b). *Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man*. *FEMS microbiology Letters*. (130):7-12.
- De Sousa, C.; Colmenares, M. C. y Correia, A. 2008. *Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de las estrategias de control*. *Bol. Mal. Salud Amb*. v. 48 n. 1 Maracay jun. 2008.
- Ferry, J. G. 1997. *Methane: Small molecule Big Impact*. *Science*. (278):1413-1414.
- Fievez, V.; Piattoni, F.; Mbanzamihiyo, L. y Demeyer, D. 1999. *Methanogenesis and reductive acetogenesis in caecum and colon of ostriches*. IX International Symposium on Ruminant Physiology.
- Gibson, G. R. 1990. *Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria*. *Journal of Applied Microbiology*. (69):769-797.
- Gibson, G. R.; Macfarlane, G. T. y Cummings, J. H. 1988. *Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut*. *Journal of Applied Bacteriology*. (65):103-111.
- Greening, R. C. and Leedle, J. 1989. *Enrichment and isolation of Acetitomaculum ruminis, gen. Nov. Sp. Acetogenic bacteria from the bovine rumen*. *Archives Microbiology*. (151):399-406.

- Gittel, A.; Mussmann, M.; Sass, H.; Cypionka, H. and Konneke, M. 2008. *Identity and abundance of active sulfate-reducing bacteria in deep tidal flat sediments determined by directed cultivation and CARD-FISH analysis*. Environ Microbiol. (10): 2645.
- Hansen, T. A. 1994. *Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes*. Antonie van Leeuwenhoek. (66):165-185.
- Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes*. 1966. (Ed.) Academic Press. pag. 533. Inc., New York.
- Immig, I. 1996. *The rumen and hingat as source of ruminat methanogenesis*. Environmental monitoring and assessment. (42):57-72.
- Kane, M. D. and Breznak, J. A. 1991. *Acetonemia longum gen. Nov. sp. Nov., an H₂/Co₂ acetogenic bacterium from the termite, Pterotremes occidentis*. Archives Microbiology. (156):91-98.
- Kristjansson, J. K. and Schönheit, P. 1982a. *Why do sulfate-reducing bacteria outcompete methanogenic bacteria for substrates?* Oecologia. (60): 264-266.
- Kristjansson, J. P.; Schönheit, P. and Thauer, R. K. 1982b. *Different K_s Values for Hydrogen of Methanogenic Bacteria and Sulfate Reducing Bacteria: An Explanation for the Apparent Inhibition of Methanogenesis by Sulfate*. Archives in Microbiol. (131):278-282.
- Leedle, J. A. Y. Z. and Greening, R. C. 1988. *Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high or low forage diets once daily*. Applied and Environmental Microbiology. (54), 502-506.
- Levett, P. N. 1991. *Anaeroby Microbiology*. Ed. Oxford University Press. New York. (p. 183-246).
- Morvan, B.; Rieu-Lesme, F.; Fonty, G. and Gouet, P. 1996 (a). *In vitro interaction between rumen H₂ – producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria*. Anaerobe. (2):175.180.
- Morvan, B.; Bonnemoy, F.; Fonty, G. and Gouet, P. 1996(b). *Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and Methanogenic archae from digestive trac of different Mammals*. Current Microbiology. (32):129-133.
- Morvan, B.; Dore, J.; Rieu-Lesme, F.; Foucat, L.; Fonty, G. and Gouet, P. 1994. *Establishment of hidrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb*. FEMS Microbiology Letter. (117):249-256.
- Noguera, D. R.; Brusseau, G. A.; Rittmann, B. E. and Stahl, D. A. 1998. *A unified model describing the role of hydrogen in the growth of Desulfovibrio vulgaris under different environmental conditions*. Biotechnology and bioengineering. (59) (6) 732-745.
- Pochart, P.; Dore, J.; Lemann, F.; Goderel, I. and Rambaud, J. C. 1992. *Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon*. FEMS Microbiol Lett. (77): 225.
- Rieu-Lesme, F.; Morvan, B.; Collins, M. D.; Fonty, G. and Willems, A. 1996. *A new H₂/CO₂ using acetogenic bacterium from the rumen. Description of Ruminococcus Schinkii sp. Nov.* FEMS Microbiology Letters. (140):281-286.
- Robichaux, M.; Howell, M. and Boopathy, R. 2003. *Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in human oral cavity*. Curr Microbiol. (47):12.
- Sales, J. and Oliver-Lyons, B. 1996. *Ostrich meat: a review*. Food Australian. (48) (11), 504-511.
- Sekiguchi, Y.; Muramatsu, M.; Imachi, H.; Narihiro, T.; Ohashi, A.; Harada, H., Hanada, S. and Kamagata, Y. 2008. *Thermodesulfovibrio aggregans sp. nov. and Thermodesulfovibrio thiophilus sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus Thermodesulfovibrio*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (58): 2541.
- Santana, M. 2008. *Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments*. Anaerobe. (14):145.
- SAS. User's Guide: Statistic, version 5 Edition. 1985. SAS Institute Inc. Cary, N. C.
- Sorlini, C.; Brusa, T.; Ranalli, G. and Ferari, A. 1988. *Quantitative determination of methanogenic bacteria in the feces of different mammals*. Curr. Microbiol. (17): 33-36.

- Swart, D. R.; Mackie, Y. and Hayes, J. P. 1993 (a). *Fermentative digestion in the ostrich (Struthio camelus var. domesticus), a large avian species that utilizes cellulose*. South Africans Journal Animal Science. (23) (5/6):127-134.
- Swart, D. R.; Mackie, Y. and Hayes J. P. 1993 (b). *Influence of live mass, rate of passage and site of digestion on energy metabolism and fiber digestion in the ostrich (Struthio camelus var. domesticus)*. South African Journal Animal Science. (23) (5/6): 119-126.
- Mitsunori, T.; Ushida, K.; Miyazaki, K. and Kojima, Y. 1997. *Methanogens associated with rumen ciliates*. FEMS Microbiology Ecology. (22): 137-143.
- Ushida, K.; Ohashi, Y.; Tokura, M.; Miyazaki, K. and Kojima, Y. 1995. *Sulphate reduction and methanogenesis in the ovine rumen and porcine caecum: A comparison of two microbial ecosystems*. Dtsch. Tierarztl. Wschr. (102):154-156.
- Van Kesse, J. S. and Russell. J. B. 1996. *The effect of pH on ruminal methanogenesis*. FEMS Microbiology Ecology. (20): 205-210.
- Vianna, M. E.; Holtgraewe, S.; Seyfarth, I.; Conrads, G. and Horz, H. P. 2008. *Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease*. J Bacteriol. (190): 3779.
- Williams, A. G. 1989. *Hemicellulose utilization by microorganisms in the alimentary tract of ruminant and non-ruminant animal*. In: Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation. Eds. M. P. Coughlan. Elsevier Applied Science. (6) (1):183-189.
- Wolin, M. J. and Miller, T. L. 1982. *Interspecies hydrogen transfer. 15 year later*. ASM News. (48):561-565.

Recibido: Julio 28, 2008

Aceptado: Diciembre 15, 2008

Poblaciones bacterianas utilizadoras de hidrógeno presentes en el tracto gastrointestinal del avestruz (*Struthio camelus* Var. Domesticus)

Population bacteria H₂-Utilizing, from gastrointestinal tract of *Struthius camellus* (Var. domesticus)

Miramontes-Carrillo, J. M.;³ Ibarra, A. J.;¹ Ramírez, R. M.;¹ Ibarra, A. F. J.;³ Miramontes, V. A. L.¹ y Lezama, G. R.²

¹Centro de Investigación de Desarrollo Educativo (CIDE)
Av. Mina No. 25, Colonia Barrio de Santa Ana
Compostela, Nayarit (México).

²Laboratorio de Control Biológico. Universidad de Colima
Tecomán, Colima (México).

³ Investigación Biotecnológica. Juárez 62 Ote.
Compostela, Nayarit (México).

*Correspondencia: jmancar2006@hotmail.com

Resumen

Tres grupos de bacterias compiten por hidrógeno en diferentes ecosistemas anaerobios, y junto con CO₂, producen metano, sulfuro de hidrógeno y acetato. Estas reacciones representan ganancia de energía al animal. Motivo por el cual, el presente trabajo pretende evaluar la presencia y tamaño de poblaciones de bacterias utilizadoras de hidrógeno en el tracto gastrointestinal del avestruz. Para ello se utilizaron medios AC11 para acetogénicas, Potgate para sulfato-reductoras y Fosfato buffer para metanogénicas. Las poblaciones se determinaron por el método del número más probable (NMP). El diseño fue completamente al azar, con arreglo factorial, A = porciones del tracto digestivo y B = microorganismo. El NMP, de acetogénicas y metanogénicas fue cero. Las bacterias sulfato-

Abstract

Three groups of bacteria compete for hydrogen in different anaerobic ecosystems; along with CO₂ they produce methane, hydrogen sulfide and acetate. These reactions mean energy gain for the animal. The purpose of this study was to determine presence and size of populations of hydrogen utilizing bacteria in different portions of the gastrointestinal tract of the ostrich. Anaerobic procedures and culture media were used for isolation and quantification. AC11 media was used for acetogenic, Potgate for sulfate reducing and phosphate buffer for methanogenic bacteria. Size of populations was determined by most probable number (MPN). The experimental design was completely random, with factorial arrangement A= portions of digestive tract and B= microorganism types. MPN of acetogenic and methano-

reductoras están presentes en todo el tracto gastrointestinal. Las poblaciones fueron 544.00; 532.00; 157.20; 155.32 y 76.48 x 10⁶ para el intestino grueso, ciegos, intestino delgado, proventrículo y ventrículo, respectivamente. Los resultados confirman presencia y predominio de las sulfato-reductoras en todas las porciones del tracto gastrointestinal del *Struthio camelus*. La producción de AGV en el tracto gastrointestinal del avestruz, es producto del metabolismo y reutilización del hidrógeno por bacterias sulfato-reductoras.

Palabras clave

Bacterias utilizadoras de hidrógeno, acetogénesis, metanogénesis, sulfato-reductores, Ostrich.

genic bacteria was zero. Sulfate reducing bacteria were present in all gastrointestinal tracts. The results for the number of population were 544.00, 532.00, 157.20, 155.32 and 76.48 x 10⁶ for the large intestine, cecum, small intestine, proventricle, and ventricle, respectively. Results confirm the presence and prevalence of sulfate-reducing bacteria in all the gastrointestinal tract portions evaluated from ostriches. The AGV production in the ostrich gastrointestinal tract is a result of the metabolism and reuse of hydrogen by sulfate-reducing bacteria.

Key Words

H₂-utilizing bacteria, acetogenesis, methanogenesis, sulphate-reducing bacteria, ruminants, ostrich.

Introducción

La eficiencia en la degradación de la materia orgánica dentro de algunos ecosistemas anaerobios —como el tracto gastrointestinal— depende de las interacciones metabólicas entre los microorganismos que lo habitan [Morvan *et al.*, 1996a; Williams, 1989; Gittel *et al.*, 2008]. Estas comunidades microbianas están formadas principalmente por bacterias y hongos, los cuales degradan los vegetales mediante una serie de fases enzimáticas sucesivas y cuyos productos o metabolitos de determinados microorganismos, sirven como sustrato a otras bacterias [Leedle *et al.*, 1982]. En esta interacción metabólica, el hidrógeno es el elemento intermediario más abundante porque es producido por microorganismos hidrolíticos y fermentadores que habitan los ecosistemas anaerobios [Blaut, 1994; Mitsunori *et al.*, 1997]. El hidrógeno, junto con el CO₂, son reutilizados por las bacterias acetogénicas, metanogénicas y sulfato-reductoras (BSR), constituyéndose en recicladores finales de este producto de fermentación [Gibson *et al.*, 1990; Dore *et al.*, 1995a; Imming, 1996; Ferry, 1997].

Este fenómeno se observa también en otros ecosistemas; entre ellos, el rumen, sedimento marino, termitas, intestino y ciegos de animales, así como en seres humanos saludables y enfermos [Kane y Breznak, 1991; Hungate, 1966; Gibson *et al.*, 1990; De Grave *et al.*, 1994; Santana, 2008; Vianna *et al.*, 2008; Sekiguchi *et al.*, 2008;

Conway y Macario, 2008]. Aunque grandes cantidades de hidrógeno son producidas durante la descomposición anaerobia de la materia orgánica (por ejemplo, 4 M de hidrógeno por M de hexosa utilizada), la concentración de H₂ en estos ecosistemas es usualmente baja (10⁻⁵ a 10⁻³ atm), por lo que la eficiencia en su aprovechamiento depende del tipo de población de bacteria utilizadora de H₂ que domina el ecosistema [Breznak y Kane, 1990]. Los tres grupos bacterianos que reciclan el hidrógeno, difieren en sus vías metabólicas; las bacterias metanogénicas lo utilizan para reducir el CO₂ y metano, las BSR lo usan para reducir sulfatos y producir sulfuros y las bacterias acetogénicas reducen CO₂ y producen acetato [Breznak *et al.*, 1988; Brauman *et al.*, 1992; Dore *et al.*, 1995b; Morvan *et al.*, 1996b; Ferry, 1997]. El efecto de cada uno de los grupos de bacterias se manifiesta por la producción de energía en forma de ácidos grasos volátiles (AGV), y al parecer, cuando predominan las acetogénicas o sulfato-reductoras, se produce una mayor cantidad de energía [Sorlini *et al.*, 1988; Breznak y Brune, 1994]. El avestruz africano (*Struthio camelus*) es un herbívoro que digiere eficazmente los constituyentes de las paredes celulares de las plantas con valores de 66% de materia seca [Swart *et al.*, 1993a].

La fermentación ocurre en sus cámaras especializadas del intestino, las cuales tienen como características: su gran capacidad y contenido de ingesta, pH neutro, alta concentración de ácidos grasos volátiles, baja concentración de ácido láctico y alta concentración de amonio [Swart *et al.*, 1993b]. Por lo que el alto nivel de AGV encontrados en el tracto gastrointestinal del avestruz y en particular en el proventrículo, indica que —en comparación con otras especies de animales— la digestión de las paredes celulares de los vegetales en este ecosistema es más eficaz, por lo que es posible que exista presencia y predominio de alguno de estos tres grupos de bacterias en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del avestruz. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia y tamaño de las poblaciones de las bacterias utilizadoras de hidrógeno en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del avestruz.

Materiales y métodos

Animales y condiciones de alimentación

Se utilizaron para el estudio cinco avestruces machos, con una edad de entre 12 a 14 meses. Los animales fueron alimentados con una dieta rica en paredes celulares. El alimento se ofreció a las 8:00 y a las 16:00 h y el agua a libre acceso. La composición de la dieta y su análisis proximal se muestra en el cuadro 1. Cada uno de los animales se colocó en corrales de 20 por 40 m; cada uno de estos corrales contó con un comedero y un bebedero. Los animales se adaptaron a la dieta por un tiempo de 30 días.

Cuadro 1. Evaluación de la dieta y su análisis bromatológico.

<i>Componentes</i>	<i>(g / Kg)</i>
Rastrojo con maíz	530
Alfalfa molida	340
Harina de pescado	84
Piedra caliza	10
Fosfato mono cálcico	26
Cloruro de sodio	10
Análisis Bromatológico	
PC %	16.37
EM Mcal / Kg	2.25
Materia seca	86.68
Materia orgánica	87.12
Celulosa %	21.82
Hemicelulosa	14.12

Obtención del inóculo

Los avestruces fueron aturdidos y sacrificados. Después, se desangraron, se les retiró la piel y se abrió la cavidad abdominal para extraer las vísceras. Se separó el tracto gastrointestinal, luego se ligó la parte posterior del esófago y la parte posterior del recto para evitar la salida de contenido intestinal, como recomiendan Sales y Oliver [1996]. Posteriormente, las porciones fueron separadas utilizando dos ligaduras en cada uno de los cinco segmentos, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, ciegos y colon [Swart *et al.*, 1993a]. Del contenido total de digesta de cada uno de los segmentos se tomaron 5 g de muestra. Éstas se colocaron en 5 frascos de una solución anaeróbica adicionada con 10% de glicerol, más 1 g de agente reductor sulfato de cisteína al 2.5% [Levet, 1991]. Todos los procedimientos y la preparación de medios, agentes reductores, soluciones de minerales y agentes reductores se realizaron dentro de la cámara de anaerobiosis.

Procesos de preparación de medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron preparados dentro de una cámara de anaerobiosis marca Anaerobic chamber, Modelo 855-AC, ACB, Plas-Labs, INC. Lansing Michigan, U. S. A., utilizando las técnicas de Hungate's [1966]. El medio de aislamiento utilizado para las bacterias acetogénicas fue el Ac-11, de Breznak y Switzer

[1986], el cual se modificó de acuerdo a lo sugerido por Greening y Leedle [1989], Rieu-Lesme *et al.* [1996] y Morvan *et al.* [1996a], quienes agregaron ácido 2-bromoetanosulfónico para evitar el crecimiento de las bacterias metanogénicas. Para las BSR se utilizó el medio de Postgate's [Levet, 1991]. Para las archaeobacterias (metanogénicas) se utilizó el fosfato buffer de Levett [1991], al cual se adicionó penicilina G y estreptomicina, para evitar el crecimiento de eubacterias [Van Kessel y Russel, 1996; Tokura *et al.*, 1997; Anderson y Rasmussen, 1998]. Para la cuantificación de las bacterias, se utilizó el método del número más probable (NMP), de acuerdo con Clarke y Owen [1983], citado por Morvan *et al.* [1994] y Braun *et al.*, [1979].

Aislamiento y cuantificación de bacterias utilizadoras de hidrógeno

Los constituyentes de cada uno de los tres medios se pesaron en una balanza electrónica y se colocaron en un matraz Erlen Meyer de 500 ml y se clarificaron por calentamiento. Al mismo tiempo, se indujo anaerobiosis en el medio con la aplicación de CO₂ libre oxígeno. Para la eliminación del oxígeno, se hizo pasar el CO₂ por una columna de cobre a una temperatura de 350° C y esta columna se colocó directamente en la cámara de anaerobiosis. Una vez preparado el medio de cultivo se esterilizó a 121° C, por 15 minutos.

Se procedió a depositar 4.5 ml del medio de cultivo a los tubos de ensayo. Se sembraron los tubos por medio de inoculación de 5 tubos con el medio de cultivo específico y se tomó con una pipeta automática 0.5 ml de cada una de las diluciones (de 10⁻² hasta 10⁻¹⁰), con la muestra. Los tubos inoculados se incubaron a 39°C durante 14 días al abrigo de la luz. Pasado ese tiempo de incubación, se estimó el NMP. Para el aislamiento y cuantificación de SRB, se utilizó el medio de Postgate especificado según Levet [1991].

Para las bacterias metanogénicas se preparó medio de Fosfato-buffer. Se disolvieron los componentes del medio de cultivo (excepto la solución de vitaminas y agente reductor) en agua bidestilada y se ajustó el pH a 7.2 a 7.4. Se añadieron 0.2% de la solución de resazurina a cada medio (1 ml/1000 ml del medio). Se procedió a disolver el oxígeno del medio, por calentamiento, bajo un chorro caliente de gas de CO₂. El medio se repartió en tubos de ensayo y se presurizaron con CO₂ depositando con un repartidor automático, 4.5 ml del medio anaeróbico. Los tubos fueron sellados con tapón de hule y sello de aluminio y se esterizaron en autoclave por un tiempo de 25 minutos a una temperatura de 121°C. Una vez que los medios se enfriaron, se añadió 0.1 de la solución de vitaminas esterilizadas por filtración, en medio buffer (15% de KH₂PO₄ + 29% de K₂HPO₄, pH de 7.0 a 7.1), y 0.2 ml de la solución de cisteína al 2.5% [Morvan *et al.*, 1994]. Para evitar el crecimiento de otras bacterias se le

agregó penicilina G y estreptomina a razón de 1 mg de cada uno por cada ml de medio [Tokura *et al.*, 1997]. El medio para las bacterias acetogénicas es el Ac-II, propuesto por Breznak y Switzer [1986], modificado por Greening y Leedle [1989]. Se adicionó solución de ácido 2-bromoetnosulfónico, el cual se preparó disolviendo el compuesto en agua bidestilada y después se esterilizó por filtración por medio de filtros de membrana. Luego, se añadió solución de vitaminas y minerales traza hasta completar el volumen de II.

Numeración de bacterias por el método del número más probable (NMP)

Se prepararon una serie de diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-9} con solución anaeróbica; después se inocularon 5 tubos de ensayo con 1 ml medio de cultivo específico para cada grupo bacteriano, de las 4 diluciones más bajas (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}). Todos los tubos se incubaron en la cámara de anaerobiosis por un tiempo de entre 7 a 14 días a una temperatura de 39°C, bajo oscuridad. Para evidenciar el crecimiento microbiano al finalizar, se determinó la turbidez del medio de cultivo o la presencia de un anillo superficial que fue índice de crecimiento microbiano [Dore, 1995a; Dehority *et al.*, 1989].

Diseño experimental

Para el presente estudio se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 5x3, donde el factor A= cinco porciones del tracto gastrointestinal (intestino grueso, ciegos, intestino delgado, proventrículo y ventrículo) y el factor B= tres grupos de bacterias (acetogénicas, metanogénicas y bacterias sulfato-reductoras). El número de repeticiones fue de cinco.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Los promedios fueron separados mediante la aplicación de la prueba de Tukey al 0.05% de probabilidad. Lo anterior se realizó mediante el paquete estadístico SAS [SAS, 1985].

Resultados

Presencia y cuantificación de bacterias metanogénicas y acetogénicas en el tracto gastrointestinal

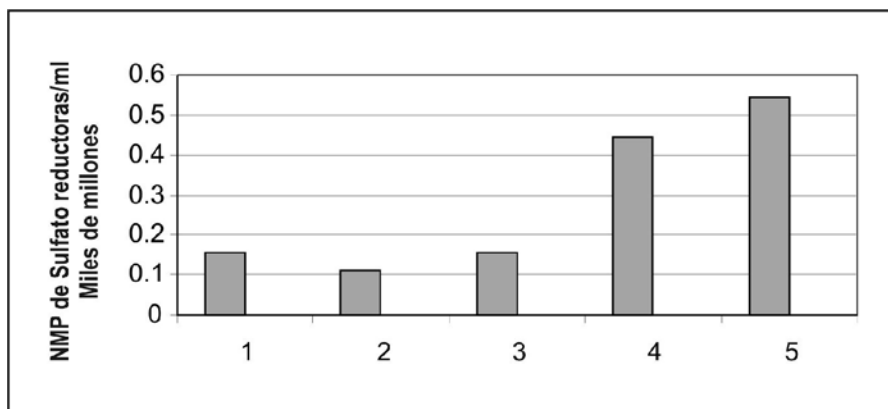
No se observó crecimiento en los tubos utilizados para la determinación del NMP de archaeobacterias y de acetogénicas en todo el tiempo de incubación. El aislamiento y

cuantificación de las poblaciones de BSR en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del avestruz en el medio de cultivo de Postgate específico mostró crecimiento bacteriano, el cual se evidenció por la presencia de un precipitado negro en todos los tubos utilizados para la cuantificación, por lo que el resultado se considera positivo para todas las porciones del TGI.

Tamaño de las poblaciones de bacterias sulfato-reductoras (BSR)

En la porción del intestino grueso se observa el mayor tamaño de población de 544.00×10^6 ; enseguida, los ciegos 446.00×10^6 ; luego el intestino delgado con una población de 157.20×10^6 , le sigue el proventrículo con 155.32×10^6 ; y por último, el ventrículo con 110.14×10^6 (cuadro 2, figura 1). El análisis de varianza, mostró diferencias significativas entre las diferentes porciones ($P < 0,05$).

Figura 1. Promedio de los valores de las poblaciones de bacterias sulfato-reductoras en las porciones del TGI del avestruz.



1 = Proventrículo; 2 = Ventrículo; 3 = Intestino delgado; 4 = Ciegos; 5 = Intestino grueso.

Discusión

Los resultados del estudio demuestran la hipótesis de que la actividad microbiana reportada para cada una de las cinco porciones del tracto gastrointestinal está determinada por la presencia y predominio de uno de los tres grupos de bacterias que reciclan el hidrógeno en el tracto gastrointestinal del avestruz alimentado con dietas ricas en paredes celulares. La presencia de las SFR en el avestruz supone la existencia de microorganismos anaerobios productores de hidrógeno que propician las condiciones

para reacciones bioquímicas termodinámicamente factibles, como lo indica Wolin [1982].

En el intestino grueso del avestruz se observa presencia de una mayor población de BSR. Sin embargo, los resultados no son acordes con los reportados por Fievez *et al.* [1999], aunque estos autores solamente mencionan resultados a partir del colon del avestruz, donde encuentra que son predominantes las bacterias acetogénicas. Aunque la presencia de BSR en todas las porciones del tracto digestivo avestruz, concuerda con las reportadas en humanos sanos y enfermos mencionadas por Gibson *et al.* [1988], quienes indican que hay individuos con SFR que predominan sobre la flora bacteriana metanogénica.

Ushida *et al.* [1995] mencionaron que la concentración de sulfatos en los diferentes ecosistemas es el principal factor limitante en el desarrollo de poblaciones de BSR y las concentraciones de sulfatos difieren entre los ecosistemas de los herbívoros. Kristjansson y Schönheit [1982a] reportaron que las BSR tienen mayor afinidad por el hidrógeno en comparación con las metanogénicas, y que el mecanismo de reducción del sulfato, puede proporcionar más energía que la reducción del dióxido de carbono, por lo que las BSR tienen más ventajas que las metanogénicas en condiciones y sustratos apropiados [Kristjansson, 1982b; De Sousa *et al.*, 2008], lo cual explica la gran producción de ácidos grasos volátiles encontrados en cada una de las porciones del tracto gastrointestinal del avestruz estudiadas por Swarts *et al.* [1993a]. Además, dentro de los individuos excretadores de metano es probable que las BSF utilicen el lactato como equivalentes transferidores de hidrógeno para dominar las bacterias metanogénicas.

En otro estudio, los resultados revelan que la metanogénesis y la sulfato-reducción son mutuamente excluyentes dentro del ecosistema del colon [Gibson *et al.*, 1990; Pochart *et al.*, 1992]. Los resultados de esta investigación son afines con los presentados por Swart [1993a], quien reporta que en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal de avestruz, la concentración de ácido láctico varía ampliamente: proventrículo, 5 mM; ventrículo, 6mM; intestino delgado, 66 mM; ciegos, 7 mM; colon proximal, 19 mM y colon distal, 26; por lo que es posible que las bacterias metanogénicas no se encuentren presentes en los animales utilizados en este experimento y pudiera ser probable que las bacterias metanogénicas sean inhibidas por las BSR al metabolizar el ácido láctico a acetato por uno de sus dos mecanismos de transporte de electrones [Hansen, 1994; Noguera *et al.*, 1998].

Tomando en consideración que los avestruces presentan el hábito de la coprofagia y que la descamación natural del epitelial del intestino libere mucina rica en sulfatos, lo cual propicia el medio adecuado para las BSR, lo que concuerda con resultados presentados por Gibson *et al.* [1988], en donde, en un sistema de cultivos continuos la

suplementación con mucina aumenta significativamente el número de BSR. Los mismos autores, en estudios realizados en humanos, concluyeron que en la sulfato-reducción, la acetogénesis y la metanogénesis no ocurren concomitantemente en algunas porciones del tracto gastrointestinal [Robichaux *et al.*, 2003]; es posible, entonces, que tanto en los sujetos no metanogénicos —al igual que en el avestruz— no existen competencias entre las bacterias sulfato-reductoras y los otros dos grupos de bacterias utilizadoras de hidrógeno. Además, el efecto de la acidez en estas porciones, son reforzados por medio de las mediciones del pH con valores de 1.6 en el proventrículo, 2.1 en el ventrículo, 6.9 en el intestino delgado y ciego, colon proximal de 7.2 y el colon distal de 8.2 [Swart *et al.*, 1993a]. Las poblaciones de BSR encontradas en el colon proximal y distal en esta investigación coinciden en que estas bacterias se ven favorecidas por los valores del pH.

Sin embargo, el tamaño de las poblaciones encontradas en las demás porciones pueden explicarse con el hecho publicado por [Hansen, 1994], el cual menciona que las BSR son consumidoras de ácido láctico y parece que este compuesto se encuentra presente en concentraciones más altas, por lo que es posible que debido a la presencia de ácido láctico y sulfatos, las BSR sean las únicas presentes. Los resultados publicados por Butine y Leedle [1989] muestran que en el colon existen más de dos veces poblaciones de bacterias hidrolíticas y fermentadoras del xilano que en las otras porciones, por lo que tomando en cuenta los resultados de esta investigación, es posible deducir que la interacción entre bacterias hemicelulolíticas y BSR predominan en animales alimentados con dietas ricas en hemicelulosa; no obstante, en el actual estudio no se midieron estos grupos de las poblaciones hidrolítica, xilanolíticas y celulolíticas. Los resultados obtenidos sugieren realizar más investigaciones para aclarar los géneros y especies de bacterias SR de estos ecosistemas.

Del mismo modo, es necesario conocer si en estos hábitats hay presencia de protozoarios y hongos productores de hidrógeno y sus tipos de interacciones metabólicas. Igualmente, no se han reportado cuáles son las condiciones ambientales que prevalecen en estas porciones de tracto gastrointestinal y la fuente de azufre utilizada, de dónde proviene y cómo se mantiene el nivel óptimo para el predominio de estas poblaciones.

Conclusiones

El hidrógeno, uno de los últimos productos de la fermentación del tracto gastrointestinal del avestruz alimentado con dietas ricas en paredes celulares, es reutilizado como terminales o depósito por las bacterias sulfato-reductoras, las cuales dominan este ecosistema.

Literatura citada

- Anderson, R. C. and Rasmussen, M. 1998. *Use of a novel nitrotoxin-metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production*. Bioresource Technology. (64):89-95.
- Blaut, M. 1994. *Metabolism of methanogens*. Antonie Van Leeuwenhoek. (66):187-208.
- Brauman, A. D.; Kane, M.; Labat, M. and Breznak, J. A. 1992. *Genesis of Acetate and Methane by gut bacteria of nutritionally diverse termite*. Science. (257):1384-1387.
- Braun, M.; Schobert, S. and Gottschalk, G. 1979. *Enumeration of bacteria forming acetate from H₂ and CO₂ in anaerobic habitats*. Archives of Microbiology. (120):201-204.
- Breznak, J. A.; Switzer, J. M. and Seitz, H. J. 1988. *Sporomusa termitida sp. Nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolate from termites*. Archives of Microbiology. (150): 282-288.
- Breznak, J. A. and Switzer, J. M. 1986. *Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes*. Applied and Environmental Microbiology. (52):623-630.
- Breznak, J. A. and Kane, M. D. 1990. *Microbial H₂/CO, cetogenesis in animal guts; nature and nutritional significance*. FEMS Microbiology Reviews. (87): 309-314.
- Butine, T. J. and Leedle, J. A. Z. 1989. *Enumeration of selected anaerobic groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs*. Applied and Environmental Microbiology. (26):1112-1116.
- Clarke, K. R. and Owens, N. J. P. 1983. *A simple and versatile microcomputer program for the determination of "most probable numberce."* Journal of Microbiology Method. (1):133-137.
- Conway de Macario, E. and Macario, A. J. 2008. *Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis*. Int. J. Med. Microbiol.
- DeGrave, K. G.; Grivet, J. P.; Durad, M.; Baumatin, P.; Cordelet, C.; Hannequart, G. and Demeyer, D. 1994. *Competition between reductive acetogenesis and methanogenesis in the pig large intestinal flora*. Journal of Applied Bacteriology. (75):55-61.
- Dehority, B. A.; Tirabasso, P. A. and Grifo, Jr., A. P. 1989. *Most-Probable-Number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium*. Applied and Environmental Microbiology. (55) (11): 2789-2792.
- Dore, J. B.; Porchart, B.; Bernalier, A.; Goderel, Y.; Morvan, B. and Rambaud, J. C. 1995 (a). *Enumeration of H₂-utilizing Methanogenic archaea, acetogenic and sulfate-reducing bacteria from human feces*. FEMS microbiology Ecology. (17):279-284.
- Dore, J. B.; Porchart, B.; Bernalier, A.; Goderel, Y.; Morvan, B. and Rambaud, J. C. 1995 (b). *Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man*. FEMS microbiology Letters. (130):7-12.
- De Sousa, C.; Colmenares, M. C. y Correia, A. 2008. *Contaminación bacteriológica en los sistemas de distribución de agua potable: Revisión de las estrategias de control*. Bol. Mal. Salud Amb. v. 48 n. 1 Maracay jun. 2008.
- Ferry, J. G. 1997. *Methane: Small molecule Big Impact*. Science. (278):1413-1414.
- Fievez, V.; Piattoni, F.; Mbanzamihiyo, L. y Demeyer, D. 1999. *Methanogenesis and reductive acetogenesis in caecum and colon of ostriches*. IX International Symposium on Ruminant Physiology.
- Gibson, G. R. 1990. *Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria*. Journal of Applied Microbiology. (69):769-797.
- Gibson, G. R.; Macfarlane, G. T. y Cummings, J. H. 1988. *Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut*. Journal of Applied Bacteriology. (65):103-111.
- Greening, R. C. and Leedle, J. 1989. *Enrichment and isolation of Acetitomaculum ruminis, gen. Nov. Sp. Acetogenic bacteria from the bovine rumen*. Archives Microbiology. (151):399-406.

- Gittel, A.; Mussmann, M.; Sass, H.; Cypionka, H. and Konneke, M. 2008. *Identity and abundance of active sulfate-reducing bacteria in deep tidal flat sediments determined by directed cultivation and CARD-FISH analysis*. Environ Microbiol. (10): 2645.
- Hansen, T. A. 1994. *Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes*. Antonie van Leeuwenhoek. (66):165-185.
- Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes*. 1966. (Ed.) Academic Press. pag. 533. Inc., New York.
- Immig, I. 1996. *The rumen and hingat as source of ruminat methanogenesis*. Environmental monitoring and assessment. (42):57-72.
- Kane, M. D. and Breznak, J. A. 1991. *Acetonemia longum gen. Nov. sp. Nov., an H₂/Co₂ acetogenic bacterium from the termite, Pterotremes occidentis*. Archives Microbiology. (156):91-98.
- Kristjansson, J. K. and Schönheit, P. 1982a. *Why do sulfate-reducing bacteria outcompete methanogenic bacteria for substrates?* Oecologia. (60): 264-266.
- Kristjansson, J. P.; Schönheit, P. and Thauer, R. K. 1982b. *Different K_s Values for Hydrogen of Methanogenic Bacteria and Sulfate Reducing Bacteria: An Explanation for the Apparent Inhibition of Methanogenesis by Sulfate*. Archives in Microbiol. (131):278-282.
- Leedle, J. A. Y. Z. and Greening, R. C. 1988. *Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high or low forage diets once daily*. Applied and Environmental Microbiology. (54), 502-506.
- Levett, P. N. 1991. *Anaeroby Microbiology*. Ed. Oxford University Press. New York. (p. 183-246).
- Morvan, B.; Rieu-Lesme, F.; Fonty, G. and Gouet, P. 1996 (a). *In vitro interaction between rumen H₂ – producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria*. Anaerobe. (2):175.180.
- Morvan, B.; Bonnemoy, F.; Fonty, G. and Gouet, P. 1996(b). *Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and Methanogenic archae from digestive trac of different Mammals*. Current Microbiology. (32):129-133.
- Morvan, B.; Dore, J.; Rieu-Lesme, F.; Foucat, L.; Fonty, G. and Gouet, P. 1994. *Establishment of hidrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb*. FEMS Microbiology Letter. (117):249-256.
- Noguera, D. R.; Brusseau, G. A.; Rittmann, B. E. and Stahl, D. A. 1998. *A unified model describing the role of hydrogen in the growth of Desulfovibrio vulgaris under different environmental conditions*. Biotechnology and bioengineering. (59) (6) 732-745.
- Pochart, P.; Dore, J.; Lemann, F.; Goderel, I. and Rambaud, J. C. 1992. *Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon*. FEMS Microbiol Lett. (77): 225.
- Rieu-Lesme, F.; Morvan, B.; Collins, M. D.; Fonty, G. and Willems, A. 1996. *A new H₂/CO₂ using acetogenic bacterium from the rumen. Description of Ruminococcus Schinkii sp. Nov.* FEMS Microbiology Letters. (140):281-286.
- Robichaux, M.; Howell, M. and Boopathy, R. 2003. *Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in human oral cavity*. Curr Microbiol. (47):12.
- Sales, J. and Oliver-Lyons, B. 1996. *Ostrich meat: a review*. Food Australian. (48) (11), 504-511.
- Sekiguchi, Y.; Muramatsu, M.; Imachi, H.; Narihiro, T.; Ohashi, A.; Harada, H., Hanada, S. and Kamagata, Y. 2008. *Thermodesulfovibrio aggregans sp. nov. and Thermodesulfovibrio thiophilus sp. nov., anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus Thermodesulfovibrio*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (58): 2541.
- Santana, M. 2008. *Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments*. Anaerobe. (14):145.
- SAS. User's Guide: Statistic, version 5 Edition. 1985. SAS Institute Inc. Cary, N. C.
- Sorlini, C.; Brusa, T.; Ranalli, G. and Ferari, A. 1988. *Quantitative determination of methanogenic bacteria in the feces of different mammals*. Curr. Microbiol. (17): 33-36.

- Swart, D. R.; Mackie, Y. and Hayes, J. P. 1993 (a). *Fermentative digestion in the ostrich (Struthio camelus var. domesticus), a large avian species that utilizes cellulose*. South Africans Journal Animal Science. (23) (5/6):127-134.
- Swart, D. R.; Mackie, Y. and Hayes J. P. 1993 (b). *Influence of live mass, rate of passage and site of digestion on energy metabolism and fiber digestion in the ostrich (Struthio camelus var. domesticus)*. South African Journal Animal Science. (23) (5/6): 119-126.
- Mitsunori, T.; Ushida, K.; Miyazaki, K. and Kojima, Y. 1997. *Methanogens associated with rumen ciliates*. FEMS Microbiology Ecology. (22): 137-143.
- Ushida, K.; Ohashi, Y.; Tokura, M.; Miyazaki, K. and Kojima, Y. 1995. *Sulphate reduction and methanogenesis in the ovine rumen and porcine caecum: A comparison of two microbial ecosystems*. Dtsch. Tierarztl. Wschr. (102):154-156.
- Van Kesse, J. S. and Russell. J. B. 1996. *The effect of pH on ruminal methanogenesis*. FEMS Microbiology Ecology. (20): 205-210.
- Vianna, M. E.; Holtgraewe, S.; Seyfarth, I.; Conrads, G. and Horz, H. P. 2008. *Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease*. J Bacteriol. (190): 3779.
- Williams, A. G. 1989. *Hemicellulose utilization by microorganisms in the alimentary tract of ruminant and non-ruminant animal*. In: Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation. Eds. M. P. Coughlan. Elsevier Applied Science. (6) (1):183-189.
- Wolin, M. J. and Miller, T. L. 1982. *Interspecies hydrogen transfer. 15 year later*. ASM News. (48):561-565.

Recibido: Julio 28, 2008

Aceptado: Diciembre 15, 2008