



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO**



Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

EFFECTO DE LA ADICION DE CULTIVOS DE LEVADURAS SOBRE
LA DIGESTION IN VITRO DE LA FIBRA DE ALFALFA Y DE AVENA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

Médico Veterinario Zootecnista.

P R E S E N T A :

ROBERTO SANTA MARIA FAVELA

Director:

M.V.Z. M.S. PH.D. GERARDO LLAMAS LAMAS

QUERETARO, QRO. 1991

No. Reg. H53386

TS

Clas. 664.68

S231e

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su cariño y esfuerzo.

A mis hermanos por las limitaciones que pudo acarrearles mi formación.

A mi hermano Alberto por ser uno de los principales motivadores para escoger esta profesión.

A mi hermano Juan Victor por el gran apollo prestado a lo largo de mis estudios.

A todos aquellos que han participado en mi formación y me han ayudado a llegar hasta donde estoy.

INDICE

1. RESUMEN -----	1
2. INTRODUCCION -----	3
3. REVISION DE LITERATURA -----	5
4. OBJETIVOS -----	28
5. MATERIAL Y METODOS -----	29
5.1. Prueba de digestibilidad <u>in vitro</u> -----	30
5.2. Determinación de la FDN en los residuos de la fermentación -----	34
5.3. Determinación de parámetros dinámicos de la digestión -----	37
5.4. Análisis estadístico -----	38
5.5. Efecto de la adición de <u>Aspergillus oryzae</u> -----	38
6. RESULTADOS Y DISCUSION -----	40
7. CONCLUSIONES -----	49
8. LITERATURA CITADA -----	50
9. APENDICE A -----	61
10. APENDICE B -----	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Contenido de proteína cruda, FDN y materia seca en los forrajes y levaduras utilizados-----	29
2. Factores experimentales usados para la prueba -----	31
3. FDN remanente (promedio de las dos corridas) como porcentaje de la cantidad original a los diferentes tiempos de fermentación-----	41
4. Promedio de la tasa de digestión y parametros relacionados en las dos corridas de digestibilidad realizadas-----	44
5. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la primera corrida de digestibilidad en la alfalfa -----	61
6. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la primera corrida de digestibilidad en la avena -----	62
7. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la segunda corrida de digestibilidad en la alfalfa -----	63
8. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la segunda corrida de digestibilidad en la avena -----	64
9. Resultados del análisis de varianza usando como variable dependiente la fibra detergente neutro remanente de las muestra-----	65
10. Resultados del análisis de varianza usando como variable dependiente el punto intercepto -----	66
11. Resultados del análisis de varianza usando como variable dependiente el tiempo lag -----	67
12. Resultados del análisis de varianza usando como variable dependiente la tasa de digestión -----	68

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de la cánula ruminal usada en el experimento -----	32
2. Equipo para el filtrado -----	36
3. Desaparición de la FDN de la alfalfa y la avena -----	43
4. Tasa de digestión de la FDN de la alfalfa y la avena -----	46

RESUMEN

Se realizó una prueba de digestibilidad in vitro para determinar el efecto de dos cultivos de levaduras sobre la digestión in vitro de la fibra detergente neutro (FDN) de la alfalfa y la avena.

Se usó un diseño experimental de bloques al azar, en el que los bloques fueron las dos corridas de digestibilidad realizadas, con un arreglo factorial de tratamientos de 2X4X4. El primer factor fueron: 2 forrajes: alfalfa (37.6% de FDN) o avena (68.1% de FDN), que se usaron como muestras de 0.6 a 0.65 g. El segundo factor fueron los cultivos de levaduras: 1) sin levadura (control), 2) Saccharomyces cerevisiae, 3) Candida utilis (levadura de tórula) 4) Candida utilis termolizada. Cada cultivo fue agregado a la muestra en una cantidad de 3 mg. Y el tercer factor que fueron los tiempos de fermentación de 12, 24, 48 y 96 horas. Cada combinación de los tres factores se incluyó por triplicado. Se usó la técnica de digestibilidad in vitro de Tilley y Terry, en su primera fase de fermentación, con líquido ruminal de cabra como inóculo; y la determinación de FDN en los residuos de la fermentación. Además se calcularon los siguientes parámetros dinámicos de la digestión: Extensión máxima de la digestión (EMD), tasa de digestión (kd), tiempo de retraso ("lag") y el punto intercepto.

La FDN en los residuos de la fermentación fue de 70.3, 40.9, 32.8 y 28% para la avena, y de 63.9, 46.4, 38.9 y 37.4% para la alfalfa a las 12, 24, 48 y 96 horas respectivamente, no existiendo diferencia significativa ($P > 0.1$) para ninguno de los

cultivos de levaduras a ningún tiempo de fermentación. Tampoco se observó efecto alguno de este factor sobre la tasa de digestión y parámetros relacionados ($P > 0.05$). Hubo diferencias significativas para el tiempo ($P < 0.001$), los forrajes ($P < 0.001$) y la interacción de estos dos factores ($P < 0.001$), así como para la tasa de digestión ($P < 0.05$) (avena 6.14%/h y alfalfa 8.37%/h); siendo mayor la EMD para la avena (residuo de 28.0%) que para la alfalfa (residuo de 37.4%).

INTRODUCCION

Uno de los problemas mas graves que en la actualidad afecta a un mayor número de países, sobre todo de los llamados países en vias de desarrollo (incluyendo México), es el de no producir alimentos en cantidades suficientes para su población, por lo que se ven en la necesidad de importarlos, causando un encarecimiento de éstos y haciendo más difícil su adquisición por los grupos sociales más necesitados. Al mismo tiempo se crea una dependencia de éstos países hacia otros más eficientes en la producción de alimentos. Además, se provoca con frecuencia un debalace económico a las industrias locales productoras de alimentos, como ya ha sido observado varias veces para el caso de México, ya que en ocasiones el gobierno permite la importación de alimentos en cantidades tales que se llega a saturar el mercado y se evita la distribución de la producción del país o se pagan precios más bajos por estos productos. Por lo anterior, se requiere llegar a una autosuficiencia en la producción de alimentos, sobretodo de aquellos de alto valor nutricional, como son los productos de origen animal.

Es por lo tanto necesario mejorar los sistemas para la producción de alimetos mediante el uso de técnicas adaptadas a las condiciones nacionales, y algunas otras desarrolladas en el país. Además, en la explotación pecuaria se han tenido grandes avances logrando un alto grado de mejoramiento genético y productivo de los animales domésticos, por lo que se debe eficientizar su alimentación, para poder explotar todo el potencial desarrollado, de forma que se pueda obtener el máximo

de su producción a costos más bajos.

Constantemente se realizan estudios sobre diferentes productos que puedan incrementar la productividad de los animales domésticos. Entre éstos encontramos a los aditivos alimenticios, que tienen el potencial de aportar varios beneficios, como mejorar la ganancia de peso, la eficiencia alimenticia, el estado de salud de los animales, así como su comportamiento reproductivo. Lo que provoca incrementos en la producción (carne, leche, huevo, etc.), a partir de la modificación de diversos mecanismos fisiológicos de los animales.

Dentro de los aditivos alimenticios que más recientemente se han usado, se encuentra un grupo conocido como "probióticos", en el cual encontramos productos elaborados a base de microorganismos, como lo son bacterias, hongos y levaduras. Estas últimas utilizadas en forma de cultivos de levaduras, y con los cuales se han obtenido resultados benéficos principalmente en ganado lechero. No obstante, éstos no han sido muy consistentes, sucediendo lo mismo con los mecanismos de acción propuestos. Es por esto que se han presentado un gran número de controversias, en cuanto a si son útiles o no, y, si realmente funcionan, cual es el mecanismo por el que lo hacen. por lo que es necesario realizar investigaciones metódicas, que nos lleven a concluir como es que actúan, y a valorar los beneficios obtenidos. De esta forma podremos obtener opciones, científicamente respaldadas, para lograr una producción más eficiente por parte de los animales, y que aporte mayores beneficios para los productores.

REVISION DE LITERATURA

Desde tiempo muy remoto, el hombre ha venido utilizando microorganismos para diversos propósitos, aún sin conocer en un principio su naturaleza. Tal es el caso de algunas bacterias, hongos y levaduras que son utilizados en la elaboración de queso, pan, vino, cerveza, etc. Ya más tarde, con la invención del microscopio, se comenzó con la identificación, el estudio y la clasificación de dichos microorganismos (12).

Recientemente se ha encontrado que algunas bacterias, hongos y levaduras, en alguna forma resultan benéficos tanto en la producción como en el desarrollo y salud de los animales. Esto dio pie a que se comenzaran a realizar estudios sobre estos productos, encontrándose, como principal efecto que favorecían el desarrollo de algunos microorganismos benéficos para los animales, e inhibían el de otros que podrían ser perjudiciales. Debido a esto se les dió el nombre genérico de "probióticos", nombre que se origina de dos palabras griegas que significan "por la vida", aunque en esencia las bacterias utilizadas como probióticos, tienen mecanismos de acción muy diferentes, los cuales ya ha sido comprobados, a los que se presume tienen las levaduras y hongos (12).

Por un lado se tiene que ciertas bacterias forman parte de la llamada flora intestinal, la cual se va formando desde el nacimiento y en la que encontramos diversos tipos de microorganismos, algunos de los cuales en una u otra forma contribuyen a los procesos digestivos. No obstante hay también microbios que pueden ocasionar efectos adversos en dichos

procesos (12). Estas bacterias pueden encontrarse en la luz o estrechamente asociadas al epitelio del tubo gastro-intestinal, siendo estas últimas las que más efectos parecen tener en el metabolismo del animal (12).

Ha sido una observación común que utilizando dosis bajas de antibióticos se tiene un aumento en la eficiencia productiva de los animales, lo que se atribuye a que existe una eliminación de los microorganismos que no son útiles al animal y en cambio si lo están perjudicando (12). Sin embargo existe el problema de que estos antibióticos tienen el potencial de producir a largo plazo resistencia por parte de los microorganismos, y además pueden dejar residuos dañinos para el hombre en sus productos (carne, leche, huevo, etc.). Como consecuencia el uso de antibióticos ha sido prohibido en un gran número de países y en otros solo se permiten aquellos no usados en la terapéutica humana. Por lo anterior se han buscado productos que sean inócuos para el hombre y tengan un efecto similar sobre la flora intestinal; tal es el caso de las bacterias usadas como probióticos (12).

En general las bacterias con la que más se ha visto el efecto mencionado son Lactobacillus acidophilus y Streptococcus faecium, que son también empleadas como inoculantes en silos con el fin de obtener una fermentación de tipo láctica. Los mecanismos de acción propuestos cuando se usan como aditivos en el alimento del ganado, son: 1) la producción de ácido láctico, el cual causa una reducción de bacterias indeseables de los géneros Escherichia, Clostridium y Salmonella (12); 2) la formación de peróxido de hidrógeno, que causa un antagonismo con

bacterias patógenas, teniendo también un efecto reductor del pH intestinal (12); 3) la capacidad para desconjugar ácidos biliares, lo que tiene efecto inhibitor sobre algunos gérmenes (12); 4) la producción de sustancias similares a los antibióticos (acidofilinas) (12), lo cual es demostrado en un estudio realizado por K. E. Newman y cols. (42); y 5) una íntima asociación a nivel intestinal con el animal, lo cual propicia un medio favorable para aprovechar los alimentos que éste consume (12).

Por otro lado tenemos a las levaduras y hongos, que como son más propiamente el tema de discusión de este trabajo se analizarán más a fondo.

Como se mencionó antes, se tiene conocimiento del uso de las levaduras desde tiempo muy remoto, de lo cual son evidencia los vestigios arqueológicos de escenas que muestran la elaboración del pan, de hace por lo menos 4000 años en tumbas egipcias (50). Ya en 1680 las levaduras eran descritas por Leewenhoeck como "animalillos" presentes en la cerveza. Fue hasta 1876 cuando Pasteur postuló cual era el papel de éstos organismos en los procesos de fermentación (50), pero ya anteriormente se habían hecho estudios sobre la reproducción de las levaduras, como los realizados por De Barry (1866), Russ (1868 - 70) y Leewenhoeck (mencionados por Tejada, 50), que a su vez sirvieron para darles una clasificación de acuerdo a sus características reproductivas (50).

Actualmente las levaduras se siguen usando en la elaboración de los mismos productos de hace siglos, pero además, se les han encontrado otras aplicaciones prácticas, como es el uso de éstas

como aditivos alimenticios en la explotación pecuaria (18). Dentro de este rubro las levaduras fueron usadas inicialmente como aditivos en ensilajes, por tener un efecto acidificante, mediante la acción que ejercen sobre la fermentación de los azúcares, ya sea teniendo efecto sobre el crecimiento bacteriano o produciendo enzimas que actúan sobre el almidón (35). De las levaduras y hongos usadas en esta forma tenemos al Aspergillus oryzae, Candida utilis (tórula) y Saccharomyces spp (35). Sin embargo el uso de las levaduras en los ensilajes puede ser cuestionable ya que tienden a producir pHs más altos y alcohol, lo que tiene un efecto detrimental sobre el consumo voluntario de éstos (35).

Peppler (43) y Chase (6), hacen mención de los diferentes tipos de productos de levaduras listados por la AAFCO (Association of American Feed Control Officials) en 1976 y 1986 respectivamente. En ésta se incluyen las levaduras secas, levaduras de cerveza seca, levaduras secas de granos de destilería, levadura de cerveza líquida y los cultivos de levaduras. Recientemente a éstas últimas se les ha encontrado aplicación dentro de la producción pecuaria, y (según la AAFCO) se les define como el producto seco compuesto de levaduras y el medio en el que éstas se desarrollaron secadas de manera que se conserva la actividad fermentativa de las levaduras (6). Estas son aplicadas, como aditivos, directamente en el alimento del ganado y son agrupadas junto con otros aditivos de características similares bajo el nombre genérico de "probióticos" (18).

De esta forma, tenemos que existen a nivel comercial algunos productos elaborados a base de cultivos de levaduras y hongos, como lo son principalmente los elaborados a base de Saccharomyces cerevisiae y cultivos fungales de Aspergillus oryzae (17, 30). Existe también un producto comercial elaborado a base del extracto de éste último sin células viables, que ha sido usado con resultados muy similares a los que si las contienen (17). Recientemente, también se han realizado estudios sobre otros hongos y levaduras, como los trabajos realizados por Herrera y cols. (24, 25) en los que se valoró preliminarmente el efecto probiótico de Penicillium sp., Trichoderma harzium y Aspergillus niger, mediante la desaparición in vitro de materia seca.

Varios autores hacen mención sobre los efectos observados en la producción (6, 18, 30, 55), observando incrementos de un 6-10% (18) y composición de la leche (para contenido de grasa y proteína) (6, 55). Existen informes de investigaciones realizadas con ganado lechero, en las que se manifiestan incrementos en la producción y contenido de grasa en la leche (26, 38, 48), o únicamente hay un incremento en la primera (15, 27, 28, 29, 32, 33, 34, 51); y otros en los que no hubo diferencia en ésta pero si se notó un incremento en el contenido de grasa (10, 19, 20, 46). También hubo trabajos en los que no existió diferencia para producción de leche ni contenido de grasa (3, 4, 44, 45).

Williams (56) y Chase (6) hacen mención de que existe un incremento en la producción de proteína en la leche, aunque Chase dice que ésta no es muy consistente, e incluso con un incremento significativo en el contenido de grasa en la leche hay un

decremento en la proteína de la misma. Este efecto se puede apreciar en un trabajo realizado por B. Harris y R. Lobo (20), con vacas en lactación media, en las que se notó un incremento en el porcentaje de la grasa en la leche y un decremento de la proteína. De los trabajos revisados, solo en uno realizado por Erdman y cols. (10), se encontró un incremento de 1.74% de la proteína en la leche, notándose también una producción de grasa en la leche numéricamente más alta que en los controles, haciéndose aún más notoria con una suplementación de cultivos de levaduras (S. cerevisiae) y bicarbonato de sodio, lo cual está en desacuerdo con lo expresado por Chase y el resultado del trabajo de B. Harris y R. Lobo. En la mayor parte de los trabajos revisados en los que se midió la proporción de proteína en la leche, no se encontró respuesta a la adición de cultivos de levaduras (3, 4, 15, 27, 28, 32, 44, 46, 51). Sin embargo, hay una relación de algunos de estos trabajos en que se nota una falta de respuesta para el contenido de proteínas, aunado a un incremento en la producción de la leche (15, 27, 28, 32, 51). En un trabajo realizado por Huber y cols. (29), se obtuvo un incremento en la producción de la leche con una disminución en el contenido de proteína.

Algunos autores (6, 55), manifiestan que el uso de los cultivos de levaduras causa también un incremento en el consumo de la materia seca de los animales tratados, lo cual concuerda con algunos trabajos (1, 13, 29, 46, 51), en que se encontró un efecto positivo para el consumo de materia seca. También existen otros investigadores que no encontraron este efecto bajo sus

condiciones de prueba (4, 10, 15, 19, 27, 34, 44), e incluso se encontró una disminución en los trabajos realizados por Teh y cols. (48) con cabras y el realizado por Quinones y cols. (45) con vacas.

También Williams (55) manifiesta que el uso de cultivos de levaduras redundaba en una mejora de la condición corporal de los animales suplementados. Sin embargo en los trabajos revisados en los que se utilizó éste parámetro de respuesta a la suplementación con cultivos de levaduras no se encontró diferencia (33, 34). En un trabajo realizado por Adams y cols. (1) se encontró un incremento en la ganancia de peso en novillos en desarrollo, en contraste con otros trabajos en los que no se encontró respuesta para esta parámetro (4, 10, 19, 50), que guarda relación con la condición corporal.

Otro de los efectos importantes encontrados con la adición de cultivos de levaduras en el alimento del ganado es que colaboran manteniendo temperaturas corporales más bajas en animales bajo "stress" calórico. Esto ha sido observado en varios trabajos en que los animales bajo tratamiento presentaron una temperatura rectal por debajo de los controles (15, 27, 28, 29, 38). En contraste, hay un trabajo (32) hecho con vacas en lactación temprana, y con una temperatura ambiental por arriba de los 32.2 C, en el que se observó un incremento de la temperatura corporal, no observándose este efecto en vacas en lactación tardía. Aunado a esto se encontró un incremento de un 3.4% en la producción de leche corregida a grasa (4%). Lo anterior puede explicarse de la siguiente forma: al tener las vacas una alta producción de leche, como la que se sucede en los periodos de

lactación temprana, se requiere una mayor cantidad de energía, por lo que se aumenta el requerimiento. Esto puede provocar incrementos en el consumo de alimento o bien una mayor remoción de la energía almacenada en el organismo, lo que provoca una mayor liberación de energía metabólica con la consiguiente elevación de la temperatura corporal. Esto no sucedería con las vacas en lactación tardía con un nivel de producción más bajo. En un trabajo realizado por Huber y cols. (27), con vacas en lactación media, se encontró que los animales tratados presentaban temperatura rectal más baja que la de los controles en ambientes cercanos a los 37 C, no encontrando diferencia para temperaturas ambientales por debajo de los 27 C. Considerando esta evidencia se podría decir que este efecto es difícil de detectar en ganado que se encuentra dentro de su zona de termoneutralidad (<25 C para ganado lechero). Este efecto también se ha relacionado con un incremento en el consumo de agua por parte de los animales tratados (28), sin embargo se considera que esta circunstancia no podría tener un gran efecto sobre el control de la temperatura corporal. También se ha manifestado que las levaduras pueden tener alguna influencia sobre los centros de control de la temperatura por medio de compuestos elaborados por los cultivos de hongos, que afectarían los centros de control de la temperatura de los animales. Lo anterior se relaciona con lo observado en un trabajo realizado por Mertens en 1977 y mencionado por Huber (30), en el que se observó un decremento de la temperatura corporal en vacas alimentadas con aflatoxinas (provenientes de A. flavus).

Todos los efectos antes mencionados se han tenido principalmente en vacas en lactación temprana, un poco menos manifiesto en vacas en lactación media y no se encuentran en vacas en lactación tardía; asimismo los efectos son más aparentes con dietas altas en concentrado y con animales bajo "stress" calórico (18).

Entre los trabajos consultados existen dos informes sobre ganado de carne, uno dado por Williams (55), sobre un experimento realizado por Drenan, en el que se utilizaron toros en finalización suplementados con cultivos de levaduras, y donde se encontró un aumento en la eficiencia alimenticia y la ganancia de peso vivo, con un ligero incremento en los consumos de alimento. En otro trabajo realizado por Adams (1), hubo un incremento en los consumos de alimento y ganancia de peso. Esto va de acuerdo con los efectos mencionados para ganado lechero.

En cuanto a los mecanismos por medio de los cuales actúan las levaduras, éstos no se conocen a ciencia cierta. En base a investigaciones realizadas se han propuesto varios, pero existen controversias, ya que mientras en algunos trabajos se obtienen resultados que apoyan algunos de éstos, en otros trabajos no se encuentra resultado alguno, e incluso se llegan a obtener resultados totalmente contrarios al mecanismo propuesto. Así, no se ha llegado a establecer firmemente un mecanismo de acción, y únicamente se manejan propuestas, ya que para que alguno de estos mecanismos sea científicamente aceptado, debe ser posible replicar su efecto, lo que hasta ahora no ha sucedido consistentemente.

Uno de los efectos del uso de los cultivos de levaduras como

aditivos, mencionado por diferentes autores (6, 17, 30, 55), es un incremento en el número de bacterias anaeróbicas y celulolíticas ruminales, que (aunque en forma no muy consistente) ha sido apreciada en diferentes trabajos y bajo diferentes condiciones. Este efecto se ha observado in vitro en los trabajos realizados por Dawson y cols. (7) y Frumholtz y cols. (11). En estos trabajos mediante el uso de un simulador ruminal (Rusitec), se obtuvo un incremento en el número de los microorganismos mencionados antes. En el trabajo realizado por Frumholtz y cols., también se informa de una disminución en el número de protozoarios. En contraste, en otro trabajo realizado por Dawson (8) con la misma técnica, no se encontró variación en el número de bacterias (anaeróbicas, celulolíticas y lactobacilos), aunque esto pudo ser debido a que el aditivo utilizado también contenía bacterias lácticas. En trabajos in vivo realizados con vacas fistuladas y canuladas del rumen, solo en uno (23) se reportó un incremento en el número de bacterias anaeróbicas y celulolíticas. Y en otros trabajos (2, 16, 21, 54) se informa de un incremento en el número de bacterias celulolíticas. No se conoce a ciencia cierta en que forma es que los cultivos de levaduras provocan este incremento en la microbiota ruminal, pero se ha propuesto que éstas proveen de factores estimuladores para las bacterias celulolíticas. Dichos factores podrían ser vitaminas del complejo "B", que se encuentran en alta concentración en las levaduras, o bien ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (54).

Otro de los efectos encontrados, y que podría ser una de las causas del gran incremento observado en el número de

bacterias celulolíticas ruminales, es que la suplementación con cultivos de levaduras provoca una elevación del pH ruminal de hasta 0.2 unidades (18), que debido a la escala logarítmica de éste resulta ser un incremento considerable. Para que la celulolisis resulte adecuada en el rumen debe encontrarse un pH entre 6.2 y 7 (18). Por lo tanto 0.2 unidades resulta ser muy apreciable e importante para asegurar una adecuada acción y desarrollo por parte de la microbiota celulolítica ruminal. Sobre el efecto de los cultivos de levaduras en el pH se han realizado varios trabajos, de los cuales, algunos resumidos por Williams (55), y otro realizado por él mismo (56), se ha encontrado un incremento en este índice. Sucediendo lo mismo en un trabajo realizado por Dawson (7) en un simulador ruminal (Rusitec). En contraste con lo anterior, se han realizado también trabajos en los que no se encontró diferencia (1, 38, 44, 45, 46), y otros en los que hubo una disminución de este parámetro (13, 21, 23, 39). En un trabajo, realizado por Frumholtz (11), en un simulador ruminal (Rusitec), se observó que la adición de los cultivos de levaduras no provocaba un incremento en el pH, sino que más bien actuaban modulándolo y evitando la caída brusca que se sucede normalmente posterior, en este caso, al agregado del material alimenticio al simulador ruminal. Este es el mismo fenómeno que se da normalmente en el rumen de los animales después de ser alimentados sobretodo con dietas altas en concentrado. Este efecto se observó en un trabajo realizado por Williams y cols. (57), con novillos fistulados y canulados del rumen, en el que se encontró una disminución significativa del ácido láctico en el líquido ruminal. Además se evitaba la presencia del pico en la

concentración del ácido láctico dos horas después de alimentar con harina de cebada, en animales suplementados con un cultivo de Saccharomyces cerevisiae.

Lo antes descrito nos presenta cierta similitud del uso y efectos de los cultivos de levaduras con el uso de los amortiguadores minerales del pH. Esto no solamente en la modulación ruminal de éste, sino también en los efectos encontrados para la digestibilidad del material alimenticio, los cambios en los patrones de fermentación ruminal, y los efectos sobre la microbiota ruminal, como lo describe G. Bernal (5). Debido a esto se han realizado algunos estudios en los que se utilizan los cultivos de levaduras junto con bicarbonato de sodio y otros en los que se trata de comparar el uso de éste con el de cultivos de levaduras (1, 19, 48, 51).

Con el uso de cultivos de levaduras se han obtenido incrementos en la digestibilidad de la materia seca. En un trabajo realizado in vitro (Herrera y Tapia, 24) en el que se estudió la actividad probiótica de cuatro compuestos fungales, se encontró respuesta en todos para la desaparición de materia seca, pero principalmente para Aspergillus niger y Aspergillus oryzae. Resultados similares se observaron en una prueba in situ (25), pero no fue estadísticamente significativa la respuesta. En trabajos realizados in vivo en los que se ha determinado la digestión de materia seca en el rumen con el uso de animales fistulados y canulados de éste órgano (14, 16, 23, 54), se han encontrado incrementos en la digestión de la materia seca (14, 16, 54), que fue hasta de un 42% en el trabajo realizado por

Wiedmeier y cols. (54). En contraste, en un trabajo realizado por Harrison y cols. (23) no se encontró respuesta para la digestión de materia seca en el rumen. También en trabajos con animales intactos, y en los que se midió la digestibilidad aparente de la materia seca (2, 3, 13, 15, 44, 51), se tuvo un incremento (2, 15, 51), mientras que en otros trabajos no hubo diferencia significativa (3, 13, 44). Aparte se piensa que el efecto del uso de los cultivos de levaduras sobre la digestibilidad de la materia seca se debe principalmente al incremento en el número de bacterias celulolíticas en el rumen, lo que traería consigo un incremento en la digestión del material fibroso. Lo anterior se observa en algunos trabajos en los que se obtuvo un incremento en el número de bacterias y un aumento de la digestión de materia seca (2, 14, 16, 54). Sin embargo en un trabajo realizado por Harrison y cols. (23), se informa un incremento en el número de bacterias celulolíticas, pero sin efecto en la digestión de materia seca, y se discute que los cultivos de levaduras estimulan un incremento en el número de bacterias celulolíticas, pero en alguna forma su actividad decrece. Harrison (23) hace referencia al trabajo de Jung y Varel, quienes notaron que ese incremento en el número de bacterias celulolíticas no corresponde al incremento en la digestión de la pared celular, celulosa o hemicelulosa. En un trabajo de Gómez A. y cols. (14), con vacas fistuladas y canuladas del duodeno, se encontró el mismo efecto pero con un incremento en el aporte de proteína verdadera al duodeno, en forma de proteína microbiana, lo cual podría explicar el incremento en la producción de leche.

Relacionado con lo anterior, se ha visto que el uso de los

cultivos de levaduras como aditivos en el alimento del ganado incrementa la digestibilidad de la proteína cruda del alimento (2, 16, 25); y solo en un trabajo de los revisados no se observó dicho efecto (44). También se han observado mejoras en la digestión de las diferentes fracciones de fibra del alimento. Por ejemplo en el trabajo realizado por Gomez A. y cols. (16), en el que se usaron vacas fistuladas y canuladas del rumen, se pudo apreciar un incremento de un 9 a un 36% en la digestibilidad de la FDN, y de un 13 a un 49% en la FDA. En contraste, en otros trabajos (4, 13, 23) no hubo acción sobre estas fracciones de fibra, y en uno, realizado por Harrison y cols. (22) también con vacas fistuladas y canuladas del rumen, se observó una disminución en la digestibilidad aparente de la FDN y la FDA. Existe otro trabajo en el que se informa un efecto favorable sobre la digestibilidad de la FDN (31), y otro más en el que se mejora la digestión de la hemicelulosa (40), que va de acuerdo con lo que señalan Males y Johnson (37) respecto al efecto de los cultivos de levaduras sobre la digestión de las diferentes fracciones de fibra. Como se sabe la hemicelulosa es un constituyente muy importante de la pared celular de los forrajes y forma parte de la FDN. Esta última, según menciona Mertens (40), es una de las principales limitantes en el consumo voluntario de los animales cuando se usan dietas altas en forrajes, ya que ésta constituye más propiamente el contenido total de fibra de los alimentos y determina la densidad de nutrimentos en la ración del ganado. Por lo tanto un incremento en la digestión de esta fracción nos podría explicar el porqué se

tiene un incremento en el consumo de alimento, con el consiguiente incremento en la producción de los animales. Sin embargo, también hay trabajos en los que no existió efecto sobre la digestibilidad de la FDN (25, 44). De la misma forma, en trabajos en los que se ha determinado el efecto de las levaduras sobre la digestión de la FDA (51), se apreció un incremento en la digestibilidad esta fracción de 36.2 a 40.6%. Se ha observado que esta mejora se lleva a cabo principalmente en el rumen, ya que no se ha visto efecto a nivel intestinal, lo que se demuestra en un trabajo realizado por Wanderley y cols. (53), en el que utilizaron vacas fistuladas y canuladas del duodeno e ileon. En este estudio se encontró que el aporte de FDA, que pasaba del rumen al duodeno, fué menor para vacas suplementadas con enzimas producto de un cultivo de Aspergillus oryzae, en comparación a los controles. Esto nos indica que existió una mayor desaparición o digestión de la FDA en el rumen de los animales suplementados, y en cambio, no hubo ninguna diferencia en la desaparición de esta fracción en el intestino. En un trabajo realizado por Hymes y cols. (31), hubo una disminución de la digestibilidad in vitro de la FDA, aunado a un incremento en la digestibilidad de la FDN. Esto podría indicarnos que en alguna forma los cultivos fungales (en este caso Aspergillus oryzae), tienen efecto principalmente sobre la hemicelulosa, lo que está de acuerdo con lo mencionado por Males y Jhonson (37).

También se ha visto que el efecto benéfico del uso de los cultivos fungales y de levaduras se obtiene con la aplicación de dosis muy específicas de los productos. Lo anterior se ha podido observar en el trabajo realizado por Hymes y cols. (31), en el

que únicamente se tuvo acción sobre la digestibilidad de la FDN en la dosis que manejó como baja (12 mg A. oryzae/40 ml de medio de cultivo in vitro), y, contrario a lo que se esperaría, no se tuvo acción con la dosis que manejó como alta (24 mg A. oryzae/40 ml de medio de cultivo in vitro). De igual forma en un trabajo realizado por Dawson y Newman (7), en el que midieron el efecto de un cultivo de levaduras en el desarrollo y actividad de las bacterias en un simulador ruminal (Rusitec), se obtuvo un incremento de bacterias anaerobias y celulolíticas con la dosis baja (1 g/día de cultivo de levadura); y una vez más, no se encontró efecto con la dosis alta (100 g/día de cultivo de levaduras). En contraste en un trabajo realizado por Martin (39), en el que se midió el efecto de un cultivo de Saccharomyces cerevisiae sobre la fermentación in vitro, se obtuvieron efectos más aparentes sobre la estimulación de la fermentación, con la dosis que manejó como alta (1 g/l) que con la baja (.4 g/l), aunque con las dos dosis se obtuvo respuesta. Lo anterior estaría de acuerdo con lo que señala Williams (55), quien afirma que el efecto sobre la producción total de ácidos grasos volátiles y el incremento en la proporción de acetato es más aparente con un incremento en la dosis suplementada de cultivos de levaduras.

Con el uso de los cultivos fungales y de levaduras, se han encontrado modificaciones en los patrones de fermentación ruminal, con diferentes resultados. Williams (55) menciona una baja en la producción de metano in vivo, lo que también se observa en dos trabajos citados por dicho autor, uno realizado con novillos jóvenes en el se que obtuvo un decremento hasta del

28% en la producción de este gas, y el segundo realizado por Newbold, en un sistema de fermentación, en el que la reducción fue del 50%. En otro trabajo, realizado por Frumholtz (11) en un simulador ruminal, se encontró una reducción significativa de metano en el gas colectado en los simuladores adicionados con cultivos de A. oryzae. Como se sabe la producción de metano representa una pérdida significativa de la energía digestible (ED) de los alimentos, que según Blaxter y Clapperton (citados por Williams, 55) está en un rango de 13.45% de la ED, para los alimentos con una digestibilidad aparente del 50%, y 10.3% de la ED, para los alimentos con una digestibilidad aparente de 90%. Debido a esto, una disminución en la producción de dicho gas nos aportaría grandes beneficios. Según Williams (55), podría obtenerse un incremento potencial de un 10% independientemente del suministro de energía extra que se pudiera proporcionar en el alimento. Así, al no desperdiciarse la energía en esta forma, se puede encaminar una mayor cantidad hacia la producción. De esta manera se obtendría al mismo tiempo un incremento en la eficiencia de utilización del alimento y un aumento en la producción animal. Por otro lado, Williams (55) menciona que ha sido demostrado que la presencia de metanógenos puede aumentar la eficiencia de la celulolisis e incrementar así la producción de acetato; las levaduras entonces funcionarían substituyendo este efecto benéfico de la metanogénesis sin tener la desventaja de producir una forma no útil de energía. No se sabe a ciencia cierta cual es el mecanismo por medio del cual las levaduras provocan esta disminución en la producción de metano durante la fermentación ruminal, pero según Williams (55), esto es debido a

la gran capacidad amortiguadora de protones que tienen las paredes celulares de las levaduras, por lo cual la presencia de células de levaduras en el rumen ofrecen otra alternativa para la transferencia de iones de hidrógeno (equivalentes reductores), y éste no tiene entonces que encaminarse a la producción de metano. De la misma forma, Frumholtz (11) menciona que el uso de A. oryzae puede tener su mayor efecto en las vías de la transferencia intramolecular del hidrógeno en el rumen. Contrastando con lo anterior, en el trabajo in vitro realizado por Martin (39), se obtuvo un incremento en la producción de metano e hidrógeno con la suplementación de cultivos de levaduras.

En relación a la fermentación ruminal y a lo antes mencionado, se han encontrado cambios en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), con la adición de cultivos fungales y de levaduras. Existen varios trabajos en los que se midió la producción de AGV y donde se han encontrado incrementos en el total producido de estos ácidos, tanto en trabajos realizados en simuladores ruminales (Rusitec) (8, 11) como en otros sistemas in vitro (39). Sin embargo en pruebas realizadas in vivo, con vacas fistuladas y canuladas del rumen (1, 16, 21, 23, 45, 54) no ha existido respuesta para el total de AGV, y en un trabajo realizado con cabras (48) y otro en un simulador ruminal (7), se pudo apreciar una disminución en la producción de estos ácidos. Ya hablando de AGV específicos, se han encontrado también variantes en cuanto a la producción de éstos, enfocándose principalmente hacia la producción de acetato y propionato, que

son los AGV por medio de los cuales, dependiendo de los niveles y cantidad de producción de éstos en el rumen, se afecta en gran medida la producción y calidad de la leche. Se ha observado un incremento en la producción de acetato (Williams, 55), lo que sucedió también en un trabajo in vitro realizado por Dawson y cols. (9), en el que se estudió el efecto de la utilización de un cultivo de S. cerevisiae sobre los productos finales de la degradación de la celulosa por cultivos de Fibrobacter succinogenes (una bacteria celulolítica ruminal). Lo mismo se observó en un trabajo realizado también in vitro, por Martin (39), y en el realizado por Teh y cols. con cabras (48). Lo anterior estaría relacionado con el efecto que se presume tienen los cultivos de levaduras sobre la remoción de hidrógenos para la metanogénesis, incrementando la producción de acetato por varias bacterias fermentadoras de glúcidos y celulosa (55). Contrastando con lo anterior, en otros trabajos (1, 16, 45, 54), no se encontró ningún efecto en la producción de acetato con la suplementación de cultivos de levaduras; y en un trabajo realizado por Dawson y cols. (8) en un simulador ruminal, y otro realizado por Harrison y cols. (23) con vacas fistuladas, tendió a disminuir la proporción del acetato. Por otro lado también se menciona un incremento en la proporción de propionato con la suplementación con cultivos de levaduras. Esto ha sido observado en trabajos realizados con vacas fistuladas del rumen (21, 23), en un trabajo de Dawson y cols. (8) en un simulador ruminal, y otro in vitro de Martin (39). En contraste con lo anterior, en otros estudios realizados con vacas fistuladas del rumen (1, 16, 54), y en el de Quinones con vacas intactas (45), no se encontró

ningún efecto sobre la proporción de este ácido en el rumen. Estos efectos resultan ser importantes ya que, como se mencionó antes, la cantidad y proporción en la producción del acetato y el propionato, va a influir fuertemente sobre la producción, calidad de la leche, y el desarrollo de los animales. De esta forma, tenemos que un incremento en la producción de acetato, redonda principalmente en un incremento en la concentración de la grasa en la leche producida, y en cambio el aumento en la producción del propionato coincide con buenas ganancias de peso en los animales (G. Bernal, 5). Se ha observado que existe cierta proporción óptima entre el acetato y el propionato, ya que un incremento en esta relación indica una mayor partición de la energía del alimento para la producción de leche. Esto se pudo apreciar en un trabajo con cabras (Teh y cols., 48), en el que se encontró un incremento en la relación acetato:propionato, con una mayor producción de leche y grasa en la leche. En otro estudio in vitro (39) también se encontró un incremento en esta relación, no resultando así en trabajos con animales fistulados del rumen (1, 16, 54) y otro con vacas intactas (45), en los que no se encontró diferencia en la relación acetato:propionato. Incluso existe un trabajo en un simulador ruminal (8), y otro realizado con vacas fistuladas del rumen (23), en los que se encontró una disminución en esta proporción.

También se han estudiado los efectos del uso de cultivos de levaduras sobre la cinética ruminal. En los trabajos revisados, se encontraron estudios en los que se determinó el volumen del líquido ruminal (1, 54), no encontrándose ninguna diferencia con

la aplicación de cultivos de levaduras. En estos estudios se realizó también la determinación del tiempo de recambio de la fase líquida, no obteniéndose respuesta para ésta (1, 2, 54). En uno de éstos experimentos se notó un incremento en el flujo del líquido ruminal (1), pero en otro (22) la respuesta obtenida no fue significativa. En contraste, en otros trabajos (2, 23, 54), no se encontró respuesta para la tasa de dilución de líquidos. En un estudio (16) se determinó la tasa de paso de la fase sólida, pero sin obtener respuesta alguna a la adición de cultivos de levaduras. Todo lo anterior es de importancia, ya que tiene una gran influencia en los patrones de fermentación ruminal, puesto que al existir un incremento en la tasa de recambio de líquidos, se obtendría un mejoramiento de la síntesis de proteína microbiana, ya que las bacterias tienden a reproducirse más rápido y alteran sus procesos metabólicos (G. Bernal, 5). Al incrementarse la tasa de dilución, baja la proporción molar del ácido propiónico y aumenta la del acético, lo cual redundaría en una mayor concentración de grasa en la leche. Estos efectos observados en la dinámica de los líquidos en el rumen, pueden deberse una vez más a que las levaduras tienen un efecto amortiguador del pH ruminal, y se produce una elevación de la presión osmótica en el rumen, lo cual hace que se incremente el flujo de agua a través de las paredes ruminales hacia el lumen del rumen, además de incrementar el consumo de agua (5). Este incremento se pudo apreciar en un trabajo realizado por Huber y cols. (29) con vacas en lactación media, en las que se elevó el consumo de agua al recibir una suplementación con cultivos de levaduras.

Como conclusión de lo discutido en este capítulo, se han obtenido los siguientes efectos por el uso de los cultivos de levaduras en el alimento del ganado: 1) incrementos en la producción y calidad de la leche, siendo más notorio un incremento en el contenido de grasa, 2) se han observado mejoras en ganancia de peso y condición corporal. Lo anterior como posible consecuencia de la modificación de diversos procesos como: 1) incremento en el pH ruminal, 2) aumento en el número de bacterias celulolíticas ruminales, 3) disminución en la producción de metano y, 4) modificaciones en la cinética ruminal. Lo anterior provocaría un incremento de los AGV totales, y más importante, de la proporción acetato:propionato. Se han observado incrementos en la digestión tanto de la materia seca, como de los componentes de la fibra (FDN y FDA). Se ha apreciado también que la acción de los cultivos de levaduras sucede principalmente a nivel ruminal. Además los efectos benéficos son más evidentes en animales que se encuentran en lactación temprana a media, bajo un estado de stress calórico y con dietas altas en concentrado.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar el efecto de la adición de dos cultivos de levadura (Candida utilis y Saccharomyces cerevisiae) sobre la digestión in vitro de la fibra detergente neutro (FDN) de la alfalfa y la avena.

- 2.- Determinar mediante el uso de la Candida utilis termolizada, si es necesaria la viabilidad de las levaduras para ejercer su acción.

- 3.- Estudiar la digestibilidad in vitro de la FDN de la alfalfa y la avena.

MATERIAL Y METODOS

Este experimento se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición animal perteneciente al CENID-Fisiología y Mejoramiento Animal, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-SARH, localizado en Ajuchitlán, municipio de Colón, en el estado de Querétaro.

El experimento consistió en determinar la digestibilidad in vitro en su primera fase de fermentación, según el método de Tilley y Terry, con modificaciones descritas por Llamas y Tejada (36). La segunda fase consistió en la determinación de la FDN en residuos de la fermentación, según una adaptación de la técnica de Van Soest y Robertson (52), los cuales se describen más adelante. Se usó un diseño experimental en bloques al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2X4X4, en el cual el primer factor (A) fue el forraje, ya sea de avena o alfalfa. En el cuadro 1 se presentan los resultados de las determinaciones de materia seca, proteína cruda y FDN que se realizaron en estos productos. El segundo factor (B) fue el tipo de cultivo de levaduras: Saccharomyces cerevisiae, más conocida por su empleo en la elaboración del pan y la cerveza, y con más reciente aplicación en la producción pecuaria como principio activo de un aditivo alimenticio para ganado (Yea-Sacc), Candida utilis (también conocida como levadura de tórula) y Candida utilis termolisada. Esta levadura es obtenida a partir de la melaza y se le ha utilizado como suplemento proteico en la alimentación del ganado (41). El objeto de usar la termolización en la Candida fue el de verificar si es necesario que las levaduras se encuentren

Cuadro 1. Contenido de proteína cruda, FDN y materia seca en los forrajes y levaduras utilizados

Forraje o levadura	Proteína cruda %	FDN %	Materia seca %
Alfalfa	21.31	37.66	95.25
Avena	15.01	68.12	95.78
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	32.62	32.14	90.27
<u>Candida utilis</u>	44.53	0.37	94.96
<u>Candida utilis</u> termolizada	43.79	0.38	95.54
<u>Aspergillus</u> 1 <u>oryzae</u>	16.89	48.39	94.42

1 utilizado únicamente en la segunda corrida de digestibilidad

viables para poder ejercer su acción, a éstas se les realizaron los mismos análisis que a los forrajes (ver cuadro 1). Además había un tratamiento control, que no contenía ninguna levadura. El tercer factor (C) consistió en los periodos de 12, 24, 48 y 96 horas usados para la fase de fermentación (ver cuadro 2). Cada tratamiento se realizó por triplicado con tres blancos por tiempo; realizándose dos corridas (bloques) en diferentes días.

PRUEBA DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO

Para esta prueba se usó líquido ruminal de cabra como inóculo, para cuya obtención se tuvieron cuatro cabras encastadas de Nubio como donadoras, provistas de fistula y cánula ruminal. Esta última no fue de tipo comercial, sino fabricada en el laboratorio mediante un sombrero de copa de plástico, un fragmento de tubo y un fragmento circular, del mismo material, con un orificio en el centro, suficiente para que cupiera el cilindro del sombrero, una liga ancha, un tapón de hule del número 10, y una abrazadera metálica (ver figura 1). Antes de cada prueba, las cabras fueron alimentadas únicamente con heno de alfalfa y agua a libre acceso, verificando por la mañana y por la tarde que siempre tuvieran alimento, durante un periodo de tres días antes de ser usadas como donadoras del líquido ruminal. Las cabras donadoras fueron encerradas juntas en un corral con piso de cemento y suficiente espacio vital para las cuatro, con comedero y bebederos de cemento. Para la prueba de digestibilidad in vitro se pesaron muestras (entre 0.6 y 0.65 g) de los forrajes, previamente molidos en un molino Wiley con criba de 1 mm. Esto se realizó en una balanza analítica, se anotaron los

Cuadro 2. Factores experimentales usados para la prueba

A) Forrajes	B) Cultivos de levaduras	C) Tiempos (h)
1. Alfalfa	1. control	12
2. Avena	2. <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	24
	3. <u>Candida utilis</u>	48
	4. <u>Candida utilis</u> termolizada	96

Todos los factores se combinan

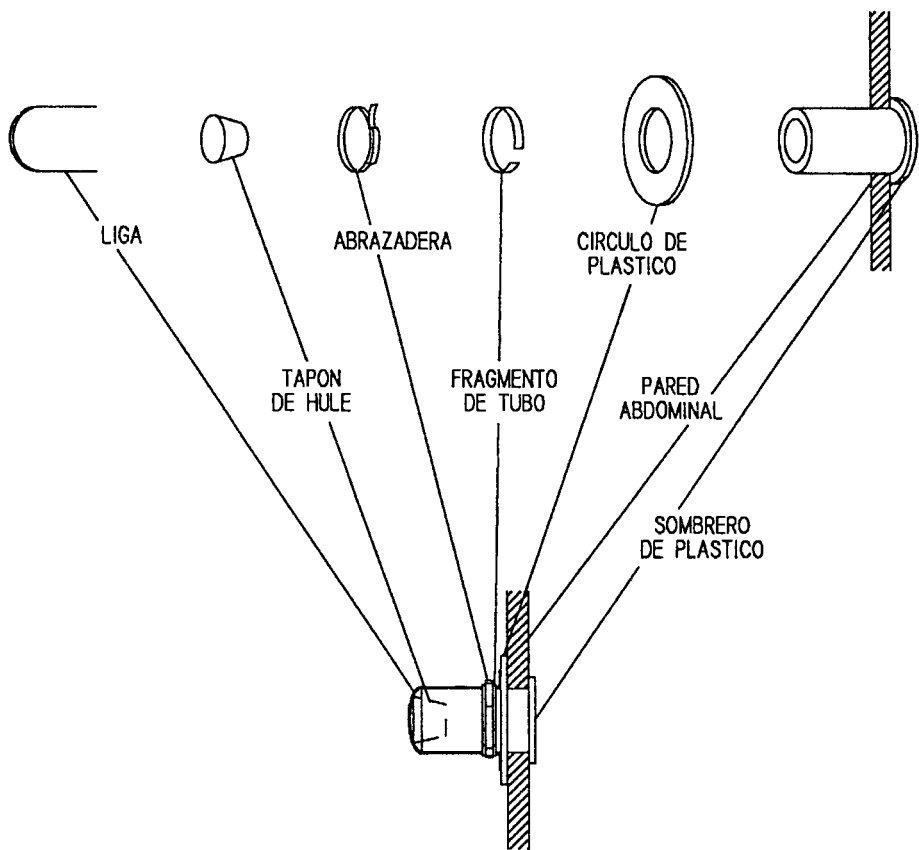


Fig 1. Esquema de la Cánula ruminal usada en el experimento

pesos exactos hasta diezmilésimas de gramo y se colocaron cuidadosamente en tubos de plástico para centrifuga de 100 ml. Posteriormente se depositó en cada tubo el cultivo de levadura correspondiente, en una cantidad de 3 mg por tubo. Este pesaje también se realizó en la balanza analítica.

Por otro lado se preparó la solución amortiguadora de McDougall, de acuerdo a como lo señala la técnica de Tilley y Terry (36), pero sustituyendo el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, que se usaba en una

cantidad de 0.12 g, por $MgCl_2$, en una cantidad de 0.6 g, como lo señala Tejada (48). El mezclado de las soluciones 1 y 2 de la solución amortiguadora de McDougall, y el burbujeo con CO_2 se

realizó un día antes del inicio de cada prueba y se colocó en frascos en el baño María precalentado a 39 C. El baño María consistía de una tina de acrílico aislada con unicel y una bomba que calentaba y circulaba constantemente el agua y para mantener una temperatura fija en todo el baño. Además, el baño contaba con rejillas de acrílico con perforaciones a la medida de los tubos.

La obtención del inóculo se realizó el mismo día del inicio de la prueba, extrayendo el contenido y líquido ruminal a través de la cánula, para posteriormente realizar un licuado de ambos. Enseguida se hizo un filtrado del contenido a través de cuatro capas de gasa. Al líquido resultante se le realizó un segundo filtrado a través de ocho capas de gasa. Y el líquido resultante fue el que se utilizó como inóculo. Lo descrito anteriormente se realizó lo más rápido posible y en presencia de CO_2 , con el objeto de evitar la pérdida de temperatura y seguir manteniendo lo más posible un estado de anaerobiosis. Además, el líquido usado como inóculo se mantuvo en el baño María a 39-40 C y con

gaseo constante de CO₂ hasta que se terminó de realizar la
inoculación de las muestras.

Para la fase de fermentación de las muestras se procedió añadiendo con las levaduras ya pesadas y en los tubos, en primer lugar el volumen total a usar de la solución amortiguadora, que fue de 30 ml, con el objeto de humedecer perfectamente la muestra. Posteriormente, se realizó la aplicación del inóculo, en una cantidad de 15 ml, para cumplir con la relación de 2:1, buffer:inóculo, señalada en la técnica. Posterior a la inoculación, se procedió a realizar un gaseo con CO₂ a cada uno de los tubos y a cerrarlos con un tapón de hule del número 6 provisto de un orificio hecho con sacabocados del número 1. Todos los tubos se fueron poniendo en el baño María y se procedió a agitarlos cuidadosamente aproximadamente cada 2 horas durante las primeras 12 horas y posteriormente cada 12 horas, con el fin de suspender la muestra en el medio de cultivo. Después de los tiempos de incubación correspondientes los tubos fueron retirados del baño y puestos en refrigeración, para la posterior determinación de la FDN en los residuos.

DETERMINACION DE LA FDN EN LOS RESIDUOS DE LA FERMENTACION

Esta se llevó a cabo como ya se mencionó, mediante el uso de la técnica de Van Soest y Robertson (52), para lo cual se transfirió cuantitativamente a vasos Bercellius el contenido de los tubos previamente refrigerados, con la ayuda de una piseta conteniendo solución FDN, y un gendarme de caucho; posteriormente se les añadió solución detergente neutro, preparada según lo

indica la técnica (52), hasta completar un volumen total de 100 ml. Después se pusieron a hervir en un digestor de fibras durante una hora, se retiraron los vasos y se realizó un filtrado del contenido a través de un papel Wathman del número 54, que había sido previamente tarado, y al cual se le calculó el peso seco. Para esto se obtuvo el promedio de la materia seca de una muestra de cinco papeles (el cual resultó ser muy similar).

Para facilitar la filtración se usó una bomba de vacío, un embudo de porcelana y un matraz de Kitasato (ver figura 2). Después del vaciado del contenido de los vasos, se realizaron varios lavados de la muestra con el objeto de eliminar la mayor cantidad posible de detergente, ya que esto hace variar, en gran medida, el peso de las muestras. El vaciado de los vasos y lavado de las muestras se realizó con agua destilada y la ayuda de un bote lavador. Lo antes descrito se realizó cuidadosamente para no dejar ningún residuo de las fibras en los recipientes usados.

Después del filtrado y lavado de las muestras se doblaron los papeles cuidadosamente para evitar pérdida de fibras y se metieron en una estufa a 100 C, para que al día siguiente se realizara un pesaje en caliente de las muestras para la medición del residuo seco. Posteriormente se les restó el peso seco del papel y el valor de los blancos, y se realizó el cálculo del porcentaje de residuo de FDN en base a la cantidad de FDN de la muestra original.

DETERMINACION DE PARAMETROS DINAMICOS DE LA DIGESTION

Estos se obtuvieron, según lo describen Llamas y Tejada

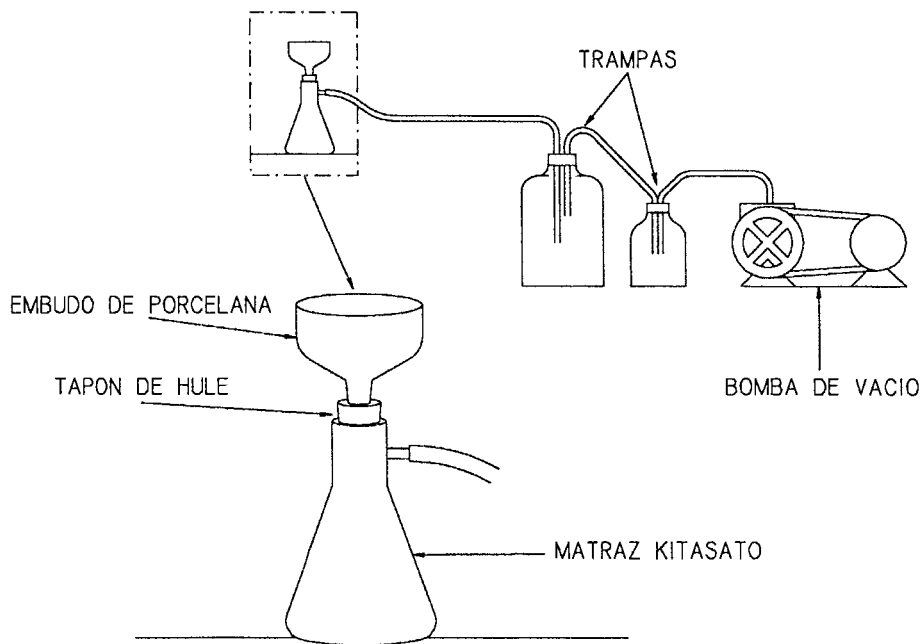


FIG. 2. EQUIPO PARA EL FILTRADO

(36), a partir de los valores de FDN en residuos de fermentación y consistieron de una determinación de la fibra indigestible, que dio pie para el cálculo de la tasa de digestión y el tiempo de retraso o "lag".

La fibra indigestible se definió como el promedio del porcentaje de residuo de FDN al tiempo de 96 horas para cada tratamiento. A este valor se le denominó la extensión máxima de la digestión, y la diferencia de ésta al 100% de la fibra original correspondió a la fibra potencialmente digestible (FPD). Después se obtuvo la diferencia entre el porcentaje de residuo de FDN para cada tiempo y la fibra indigestible, para de esta forma obtener la FPD remanente en cada tiempo. Específicamente, en base a la muestra original, mediante una regla de tres, se obtuvo el porcentaje de la FPD aún no digerida para cada muestra, en cada tiempo. A estos valores se les calculó el promedio por tiempo y se obtuvo su logaritmo natural. Los valores se graficaron en forma semilogarítmica con el fin de obtener una línea. A partir de ésta se obtuvo la pendiente o coeficiente de regresión que correspondió a la tasa de digestión (kd), y el punto intercepto a partir de la ecuación de la recta. Finalmente se calculó el tiempo de retraso discreto ("lag"), que es el tiempo en que se considera que no hubo digestión, a partir

del despeje de x en la ecuación de la recta:

$$y = a + bx$$

quedando de la manera siguiente:

$$x = y - a / b$$

en donde:

x = tiempo de retraso ("lag")

a = punto intercepto

b = kd, o pendiente de la recta

y = ln del 100 % de la FPD = 4.6051702

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se analizaron por análisis de varianza para un diseño de bloques al azar, con un arreglo factorial 2X4X4 para el residuo de la FDN, en el cual los bloques fueron las corridas de digestibilidad que se realizaron y los factores que ya se mencionaron al principio de éste capítulo. El análisis se hizo para un arreglo factorial 2X4 en el caso de la tasa de digestión y parámetros relacionados, en el que quedó eliminado el factor tiempo (Steel y Torrie, 47). Los datos obtenidos se analizaron con ayuda del programa de computadora SAS (procedimiento GLM).

EFFECTO DE LA ADICION DE ASPERGILLUS ORYZAE

Se realizó una prueba incluyendo A. oryzae en la segunda corrida de digestibilidad, éste fue aplicado en una dosis de 4 mg, en muestras de los mismos forrajes (avena y alfalfa) que para S. cerevisiae y C. utilis, usando las mismas técnicas para la digestibilidad in vitro y determinación de la FDN, en los mismos tiempos de fermentación.

Los datos obtenidos no fueron analizados estadísticamente debido a que no se podría utilizar el diseño de bloques al azar, ya que en la primer corrida de digestibilidad no se utilizó A.

oryzae. El cultivo de A. oryzae utilizado correspondió al usado en el aditivo comercial conocido como "Amaferm" en los Estados Unidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la FDN como remanente de la FDN original en las dos corridas, a los diferentes tiempos de fermentación y para cada tratamiento en promedio, se muestran en el cuadro 3 para la alfalfa y la avena.

No se tuvo efecto sobre la FDN remanente por la adición de Saccharomyces cerevisiae o Candida utilis ($P > 0.05$), termolizada o sin termolizar; tampoco hubo diferencia para las interacciones forraje X levadura ($P > 0.05$) y levadura X tiempo de fermentación ($P > 0.05$).

Por otro lado, se obtuvo un efecto significativo para los forrajes ($P < 0.001$), para el tiempo de fermentación ($P < 0.001$) y para la interacción forraje X tiempo ($P < 0.001$). Esto era de esperarse ya que es bien sabido que la alfalfa, que es una leguminosa, y la avena, que es una gramínea, tienen patrones de digestión muy diferentes, por las características intrínsecas, o de composición química de cada forraje (52). Así observamos que la alfalfa, al ser un forraje cuyos constituyentes del contenido celular (proteína soluble, ácidos orgánicos, almidón, nitrógeno no proteico y pectinas) están en mayor cantidad y disponibilidad, se digiere en las primeras horas más rápidamente que la avena (tomando en cuenta el 100% de los constituyentes de los forrajes). Sucediendo lo mismo si se toma en cuenta únicamente la fracción digestible de su fibra, lo que indica que también esta fracción se digiere con mayor velocidad. Por su parte la avena es un forraje en el que hay una mayor cantidad de fibra en relación al porcentaje de los demás constituyentes

Cuadro 3. FDN remanente (promedio de las dos corridas) como porcentaje de la cantidad original a los diferentes tiempos de fermentación

horas:	12	24	48	96
Alfalfa	62.7	45.0	38.3	37.5
Alfalfa + S.C.	66.4	45.8	38.9	37.3
Alfalfa + C.U.	63.3	46.8	39.0	37.0
Alfalfa + C.U.T	63.3	47.9	39.2	37.8
Avena	70.6	48.2	32.9	29.1
Avena + S.C.	70.5	47.7	32.7	27.8
Avena + C.U.	69.1	48.0	32.6	26.9
Avena + C.U.T.	71.2	47.8	32.9	28.1

S.C.- Saccharomyces cerevisiae; C.U.- Candida utilis; C.U.T.- Candida utilis termolizada. Efecto significativo para forraje ($P < 0.001$), para tiempo ($P < 0.001$) y para la interacción forraje X tiempo ($P < 0.001$). Error estándar: 1.34.

bromatológicos, y por sus características intrínsecas tiene una digestión más a largo plazo. Es por ésto que se puede observar en el cuadro 3 y gráficamente en la figura 3, como la alfalfa, durante las primeras 12 horas, tiene una mayor desaparición de la FDN que la avena, la cual ya era prácticamente la misma que la de la avena a las 24 horas, pero para las 48 y 96 horas la alfalfa tuvo la misma cantidad de residuo no digerido, no siendo así para la avena que continuó digiriéndose hasta las 96 horas. Se puede observar que en consecuencia el residuo de FDN a las 96 horas fue menor para la avena (28%) que para la alfalfa (37.4%), indicando una mayor extensión de la digestión de la FDN de la avena. Esta diferencia se debe al mayor contenido de lignina en la FDN de la alfalfa en comparación a la FDN de la avena, la cual para una alfalfa con un 38% de FDN es de aproximadamente un 5%, por lo que ésta constituiría un 13% de la FDN; mientras que para una avena con un 68% de FDN es de un 6%, o un 8.8% de la FDN (41). Así podemos apreciar que el grado de lignificación de la FDN es mayor para la alfalfa que para la avena. Es bien sabido que entre mayor sea el contenido de lignina en la fibra de un forraje, menor va ser la disponibilidad de su fibra para ser aprovechado por las bacterias ruminales, por lo que se considera que la lignina limita la extensión, pero no la tasa de la digestión (52).

En el cuadro 4 se muestran los resultados promedio de las dos corridas de digestibilidad para la tasa de digestión, tiempo "lag" y punto intercepto, para cada forraje y tratamiento. Solo se obtuvo diferencia significativa para la tasa de digestión entre forrajes ($P < 0.05$), no encontrándose efecto para tiempo de retraso ("lag") ni para el punto intercepto para ninguno de los

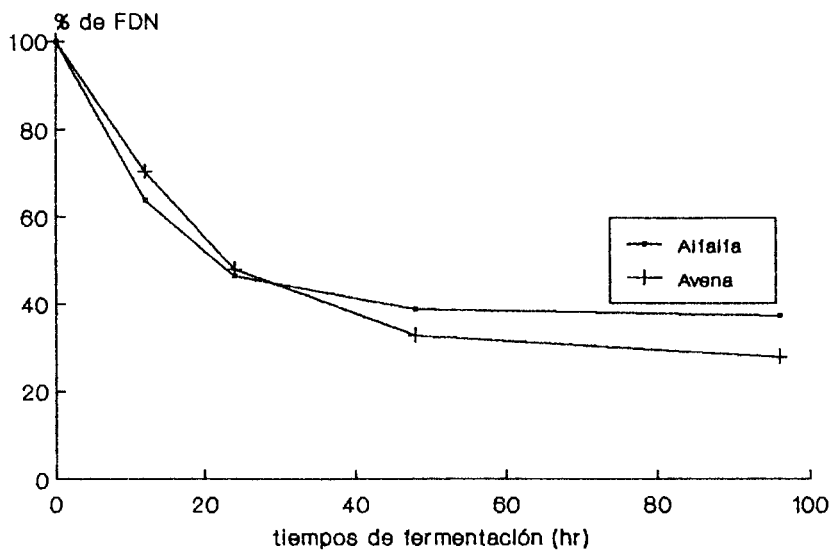


Fig 3. Desaparición de la FDN de la alfalfa y la avena

Cuadro 4. Promedio de la tasa de digestión y parámetros relacionados en las dos corridas de digestibilidad realizadas.

	Intercepto	¹ tasa %/hora	lag horas
Alfalfa	4.73	9.08	1.3
Alfalfa + S.C.	4.70	8.23	-1.5
Alfalfa + C.U.	4.76	7.29	-0.8
Alfalfa + C.U.T.	4.94	8.88	3.7
Alfalfa + A.O. ²	4.06	5.03	-10.7
Avena	4.87	6.67	4.0
Avena + S.C.	4.81	6.19	3.2
Avena + C.U.	4.71	5.55	1.8
Avena + C.U.T.	4.82	6.16	3.3
Avena + A.O. ²	4.93	7.23	4.6
Error estándar	0.23	1.18	2.6

¹ Efecto significativo para forraje (P < 0.05)

² Usado únicamente en la segunda corrida

factores ($P > 0.1$). Se puede observar en el cuadro 4 que la tasa de digestión fue más rápida para la alfalfa (8.37%/hr) que para la avena (6.14%/hr), lo cual está acorde con las diferencias reconocidas para este parámetro entre gramíneas y leguminosas (40). Tal vez debido a esto las leguminosas tienen también una mayor velocidad de paso a través del tubo gastrointestinal de los animales en comparación con las gramíneas. Ya que al tenerse una digestión más rápida se facilita la disminución en el tamaño de la partícula y un aumento de la densidad de éstas lo que facilita su paso fuera del rumen (40).

Lo anterior se puede observar gráficamente en la figura 4 donde se aprecia una inclinación mayor de la línea de regresión de la alfalfa que de la avena, siendo muy similares el punto intercepto y el tiempo "lag" de ambos forrajes.

Como se mencionó, durante la segunda corrida de digestibilidad in vitro, se incluyó también un cultivo de A. oryzae, para el cual tampoco se encontró diferencia aparente para la digestión de la FDN. Aun cuando este tratamiento no fue incluido en el análisis estadístico, los resultados para el residuo de la FDN a los diferentes tiempos de fermentación muestra que éste no fue muy diferente numéricamente, con respecto a los otros tres tratamientos y los controles, (ver cuadros 7 y 8), lo mismo que para los diferentes parámetros de la digestión determinados (cuadro 4).

El nulo efecto observado con la adición de cultivos de levaduras sobre los diferentes parámetros obtenidos, puede deberse a que en un sistema de digestión in vitro, como el utilizado en éstas pruebas, se emplea una solución amortiguadora

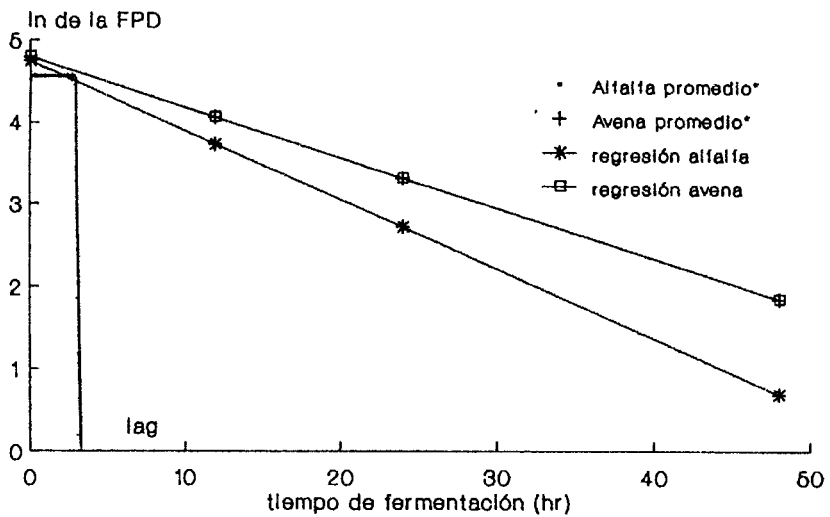


Fig 4. Tasa de digestion de la FDN de la alfalfa y la avena (X del In de la FPD de la alfalfa y la avena)

que mantiene el pH alrededor de 7, y como se menciona en la revisión de literatura, uno de los principales efectos encontrados con el uso de cultivos de levaduras es el de que ayudan a modular el pH, ya sea manteniéndolo o incrementándolo (55, 11). Con este sistema se está evitando esta modulación, lo cual podría redundar en la nula respuesta observada sobre la digestión in vitro de la FDN. Como alternativa podría considerarse que estos resultados no apoyan la teoría de que las levaduras actúan proporcionando factores que propician un incremento en el número de bacterias celulolíticas, que traería como consecuencia un aumento en la digestión de la fibra, como es mencionado por algunos autores (17, 30, 55), aunque también podría darse el caso de que sí existiera un mayor desarrollo de bacterias, pero sin incrementar la digestión de la fibra, como ha sido observado en otros trabajos (14, 23). Para haber determinado ésto se hubiera requerido realizar un estudio bacteriológico además de las pruebas de digestibilidad. Por otro lado, también existe la posibilidad de que no se encuentre ningún efecto debido a que únicamente se usó una dosis alta, y se ha visto en algunos trabajos (7, 31), que los cultivos de levaduras únicamente presentan efectos en dosis bajas aunque se desconoce a que pueda deberse esta observación. De cualquier forma, en una corrida preliminar se manejaron dosis altas (0.003 g de levadura/0.65 g de muestra) y dosis bajas (0.0003 g de levadura/0.65 g de muestra), y no se pudo apreciar efecto alguno debido a levaduras en cualquiera de los dos niveles, aunque hubo variación en los datos obtenidos.

Cualquiera que sea el caso, los resultados obtenidos en este

trabajo, no están de acuerdo con los encontrados por otros autores (24, 25, 31) que si observaron efectos significativos con el uso de cultivos de levaduras usando básicamente el mismo sistema de digestión in vitro.

Resultaría conveniente, para próximas investigaciones, realizar al mismo tiempo de las pruebas de digestibilidad un análisis bacteriológico para poder determinar si existe un incremento en el número de algún tipo de bacterias; manejando además diferentes dosis. Asimismo es necesario probar los cultivos de levaduras con sistemas in situ e in vivo, buscando tipificar la respuesta a éstas y aislar el o los principios activos responsables de ésta.

CONCLUSIONES

1.- Se observaron diferencias en la digestión de la alfalfa y avena, en donde:

- La tasa de digestión de la FDN potencialmente digestible de la alfalfa fue mayor que la de la avena

- La avena tuvo una mayor extensión de la digestión de la FDN que la alfalfa

Lo anterior confirma las diferencias existentes entre avena y alfalfa en cuanto a disponibilidad y digestión del material que éstas contienen.

2.- No se encontró efecto con el uso de cultivos de levaduras (Candida utilis y Saccharomyces cerevisiae) a ningún tiempo de fermentación.

3.- Es posible que la técnica in vitro usada no sea la adecuada para evaluar el efecto de los cultivos de levaduras sobre la digestión de la fibra.

LITERATURA CITADA

1. Adams. D. C.; Galyean. M. L.; Kiesling. H. E.; Wallace. D. J.; Finkner, M. D.; 1981.: Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. J. Anim. Sci. 53: 780 - 789
2. Arambel, M. J.; Wiedmeier, R. D.; 1986.: Effect of supplemental Saccharomyces cerevisiae and/or Aspergillus oryzae on rumen fermentation. J. Dairy Sci. 69: 1: 188
3. Arambel, M. J.; Kent, B. A.; 1988.: Effect of yeast culture on milk production response and apparent nutrient digestibility in early lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 71: 1: 220
4. Arambel, M. J.; Kent, B. A.; 1990.: Effect of yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early-to mid lactation dairy cows. J. Dairy Sci. 73: 1560 - 1563
5. Bernal, S. G.; 1990.: Amortiguadores del pH. En Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria. Edits.: Avila, G. E.; Shimada, S. A.; Llamas, L. G.. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C., México. pp 93 - 107
6. Chase, L. E.; 1989.: Yeast in dairy cattle feeding programs. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacture. pp 123-126

7. Dawson, K. A.; Newman, K. E.; 1987.: Effects of yeast culture supplements on the growth and activities of rumen bacteria in continuous culture. J. Anim. Sci. 65: 1: 452 (Abstr.)
8. Dawson, K. A.; Newman, K. E.; 1988.: Fermentations in rumen-simulating continuous cultures receiving probiotic supplements. J. Anim. Sci. 66: 1: 500 (Abstr.)
9. Dawson, K. A.; Harrison, G. A.; Newman, K. E.; 1990.: End products from cellulose degradation in cultures containing yeast and cellulolytic rumen bacteria. J. Anim. Sci. 68: 1: 505 (Abstr.)
10. Erdman, R. A.; Sharma, B. K.; 1989.: Effect of yeast culture and sodium bicarbonate on milk yield and composition in dairy cows. J. Dairy Sci. 72: 1929 - 1932
11. Frumholtz, P. P.; Newbold, C. J.; Wallace, R. J.; 1989.: Influence of Aspergillus oryzae fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). J. Agric. Sci. (Cambridge) 113: 169 - 172
12. Garza, F. J. D.; 1990.: Aditivos a base de cultivos de bacterias. En Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria. Edits.: Avila, G. E.; Shimada, S. A.; Llamas, L.

G.. Sistema de Educacion Continua en Produccion Animal en Mexico, A.C., Mexico. pp 117 - 123

13. Gómez, R.; Huber, J.T.; Higginbotham, G. E.; Wanderley, R.; 1986.: Effect of feeding a culture of A. oryzae on rumen and total tract digestion in dairy cows. J. Dairy Sci. 69: 1: 188
14. Gómez, A. R.; Dudas, C.; Huber, J. T.; 1987.: Effect of Aspergillus oryzae (Amaferm) and yeast on feed utilization by holstein cows. J. Dairy Sci. 70: 1: 218
15. Gómez, A. R.; Wiersma, F.; Ammon, D.; Higginbotham, G. E.; Huber, J. T.; 1988.: Effect of feeding Amaferm (Aspergillus oryzae extract) to cows in early lactation on milk yields and related parameters. J. Dairy Sci. 71: 1: 219
16. Gómez, A. R. A.; Dudas, C.; Huber, J. T.; 1990.: Influence of cultures of Aspergillus oryzae on rumen and total tract digestibility of dietary components. J. Dairy Sci. 73: 703 - 710
17. Gómez, A. R. A.; 1990.: Effects of microbial species introduction on site and extent of ruminal feedstuff digestion. California Nutrition Conference. pp 56 - 67
18. Gómez, A. R.; Llamas, L. G.; 1990.: Uso de cultivos de levaduras en alimentos para rumiantes. En Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria. Edits.: Avila, G. E.;

Shimada, S. A.; Llamas, L. G.. Sistema de Educacion Continua en Producción Animal en México, A.C., México. pp 125 - 129

19. Harris, B.; Van Horn, H. H.; Manookian, K. E.; Marshall, S. P.; Taylor, M. J.; Wilcox, C. J.; 1983.: Sugarcane silage, sodium hidroxide - and steam pressure - treated sugarcane bagasse, corn silage, cottonseed hulls, sodium bicarbonate, and Aspergillus oryzae product in complete rations for lactating cows. J. Dairy Sci. 58: 1474 - 1485
20. Harris, B.; Lobo, R.; 1988.: Feeding yeast culture to lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 71: 1: 276
21. Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A.; Harmon, R. J.; Newman, K. E.; Morehead, M. C.; 1987.: Yeast culture supplement in diets of lactating Cows. I. Effects on rumen fermentation patterns and microbial populations. J. Dairy Sci. 70: 1: 218
22. Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A.; Harmon, R. J.; Newman, K. E.; Morehead, M. C.; 1987.: Yeast culture supplement in diets of lactating cows. II. Effects on liquid dilution rate and apparent digestibility. J. Dairy Sci. 70: 1: 218
23. Harrison, G. A.; Hemken, R. W.; Dawson, K. A.; Harmon R. J.; Barker, K. B.; 1988.: Influence of addition of yeast culture

- supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. J. Dairy Sci. 71: 2967 - 2975
24. Herrera, S. R.; Tapia, M. N.; 1989.: The effect of four fungal compounds as probiotics on in vitro dry matter disappearance of different feedstuffs. J. Anim. Sci. 61: 1: 521 (Abstr.)
25. Herrera, S. R.; Campos, M. R.; Viniegas, G. G.; Diaz, C. M.; 1990.: The effect of Aspergillus niger and Aspergillus oryzae (Amaferm) as probiotics on in situ digestibility of a high fiber diet. J. Dairy sci. 73: 1: 133
26. Hoyos, G.; Garcia, L.; Medina, F.; 1987.: Effects of feeding viable microbial feed additives on performance of lactating cows in a large dairy herd. J. Dairy Sci. 70: 1: 217
27. Huber, J. T.; Higginbotham, G. E.; 1985.: Influence of feeding Vitaferm, containing an enzyme - producing culture from Aspergillus oryzae, on performance of lactating cows. J. Dairy Sci. 68: 1: 122
28. Huber, J. T.; Higginbotham, G. E.; Gomez, R.; 1986.: Influence of feeding an A. oryzae culture during hot weather on performance of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 69: 1: 187
29. Huber, J. T.; Sullivan, J.; Taylor, B.; Burgos, A.; Cramer,

S.; 1989.: Effect of feeding Yea - Sacc on milk production and related responses in a commercial dairy herd in Arizona. Altech, Inc. Research and Technical Bulletin

30. Huber, J. T.; 1990.: The fungal and yeast culture story in lactating dairy cows. Southwest Nutrition and Management Conference. pp 87 - 94
31. Hymes, C. U.; Solaiman, S. G.; Dembele, B.; Maloney, M. A.; 1990.: Effect of different levels of Aspergillus oryzae supplementation on cell wall fermentation in vitro. J. Anim Sci. 68: 1: 505 - 506 (Abstr.)
32. Johnston, N. P.; Wallentine, M. V.; Andrus, D.; Jones, R.; Huber, J. T.; Higginbotham, G.; 1986.: The effect of feeding an Aspergillus oryzae culture - vitamin mix on the performance of lactating dairy cows during periods of heat stress. J. Dairy Sci. 69: 1: 189
33. Kellems, R. O.; Johnston, N. P.; Wallentine, M. V.; Lagerstedt, A.; Andrus, D.; Jones, R.; Huber, J. T.; 1987.: effect of feeding Aspergillus oryzae on performance of cows during early lactation. J. Dairy Sci. 70: 1: 219
34. Kellems, R. O.; Lagerstedt, A.; Andrus, D.; Wallentine, M. V.; Jones, R.; Huber, J. T.; 1988.: Effect of feeding Amaferm and Vitaferm on performance of Holstein cows during a

- lactation cycle. J. Dairy Sci. 71: 1: 220
35. Llamas, L. G.; 1990.: Mejoradores de forrajes. En Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria. Edits.: Avila, G. E.; Shimada, S. A.; Llamas, L. G.. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C., México. pp 29 - 42
36. Llamas, L. G.; Tejada, H. I.; 1990.: Técnicas de laboratorio para el análisis de forrajes para rumiantes. Manual de Técnicas de Investigación en Rumiología. Edits.: Castellanos, R. A.; Llamas, L. G.; Shimada, S. A.. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C., México. pp 29 - 42
37. Males, J. R.; Johnson, B.; 1990.: Probiotics - what are they? what do they do?. J. Anim. Sci. 68: 1: 504 (Abstr.)
38. Marcus, K. M.; Huber, J. T.; Cramer, S.; 1986.: Influence of feeding Vitaferm during hot weather on performance of lactating cows in a large dairy herd. J. Dairy Sci. 69: 1: 188
39. Martin, A. S.; 1989.: Influence of a commercial yeast supplement (Yea - Sacc) on the in vitro ruminal fermentation. Altech, Inc. Research and Technical Bulletin
40. Mertens, R. D.; 1980.: Fiber content and nutrient density in dairy rations. Distillers Feed Conference. Proceedings vol.

35. Cincinnati, Ohio. pp 35 - 43
41. National Research Council; 1988.: Nutrient Requiriments of Domestic Animals. Nutrient Requiriments of Dairy Cattle. 6th. Revised edition Natl. Acad. Sci. Washington. D.C.
42. Newman, K. E.; Dawson, K. A.; Morehead, M. C.; 1990.: Antagonistic activities of bacterial isolates from probiotic feed supplements upon pathogenic and rumen bacteria. J. Anim. Sci. 68: 1: 505 (Abstr.)
43. Peppler, J. H.; Stone, W. C.; 1976.: Feed yeast products; an update of the properties of feed yeasts and their application. Feed Management. Garden State Pub. Co. New Jersey
44. Quinones, J. A.; Bush, L. J.; Nalsen, T.; Adams, G. D.; 1988.: Effect of yeast culture on intake and production of dairy cows fed high wheat rations. Anim. Sci. Research Report. Mp - 125: 227 - 232
45. Quinones, J.; Wagner, G. D.; Bush, L. J.; 1989.: Effect of yeast culture on intake and production of dairy cows fed corn or wheat based concentrate mixtures. Anim. Sci. Research Report Pg: 61 - 67
46. Sievert, S. J.; Shaver, R. D.; 1990.: Effects of nonfiber

carbohydrate and Aspergillus oryzae fermentation extract on intake, milk production, and digestion in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 73: 1: 127

47. Steel, R. G. D.; Torrie, J. H.; 1988.: Principios y Procedimientos de Bioestadística. Mc Graw - Hill. Ed. Interamericana, México, D.F.
48. Teh, T. H.; Sahu, T.; Escobar, E. N.; Cutshaw, J. L.; 1987.: Effect of live Yeast culture and sodium bicarbonate on lactating goats. J. Dairy Sci. 70: 1: 200
49. Tejada, H. I.; 1985.: Manual de Laboratorio Para Análisis de Ingredientes Utilizados en la Alimentación Animal. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C. (PAIPEME). México
50. Tejada, H. I.; 1990.: Micóticos, micostatos e inhibidores de levaduras. En Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria. Edits.: Castellanos, R. A.; Llamas, L. G.; Shimada, S. A., Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, A.C., México. pp 11 - 41
51. Van Horn, H. H.; Harris, B.; Taylor, M. J.; Bachman, K. C.; Wilcox, C. J.; 1984.: By - product feeds for lactating dairy cows: Effects of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane bagasse, an whole

cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonate and Aspergillus oryzae product on milk production. J. Dairy Sci. 67: 2922 - 2938

52. Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; 1985.: Analysis of Forages and Fibrous Foods. A laboratory manual for Animal Sci. 613. Cornell University
53. Wanderley, R. C.; Huber, J. T.; Theurer, C. B.; Poore, M.; 1985.: Ruminal digestion of protein and fiber in duodenally cannulated cows treated with vitaferm. J. Dairy Sci. 68: 1: 123
54. Wiedmeier, R. D.; Arambel, M. J.; Walters, J. L.; 1987.: Effect of yeast culture and Aspergillus oryzae fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient Digestibility. J. Dairy Sci. 70: 2063 - 2068
55. Williams, P. E. V.; 1986.: Understanding the biochemical mode of action of yeast culture. Alltech Technical Publications. Lexington, Kentucky
56. Williams, P. E. V.; 1989.: Effect of Yea - Sacc on protein digestion in sheep: Composition of digesta flowing to and absorbed from the small intestine. Alltech, Inc. Research and Technical Bulletin
57. Williams, P. E. V.; Newbold, C. J.; Walker, A.; Wallace, R.

J.; 1989.: Rumen probiosis: The effects of including yeast culture (Saccharomyces cerevisiae plus growth medium) in diets for sheep feed continuously or in meal fed steers. J. Anim. Sci. 61: 1: 522 (Abstr.)

58. Williams, P. E. V.; Walker, A.; MacRae, J. C.; 1989.: Rumen probiosis: The effects of addition of yeast culture [viable yeast (Saccharomyces cerevisiae) Yea - Sacc 1026 plus growth medium] in duodenal protein flow in wether sheep. Altech, Inc. Research and Technical Bulletin

APENDICE A

Cuadro 5. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la primera corrida de digestibilidad en la alfalfa

Tiempo (hr): tratamiento		12	24	48	96
control	a)	65.17	45.75	38.94	38.19
	b)	63.23	48.08	39.02	35.75
	c)	65.64	43.46	38.74	36.86
<u>S. Cerevisiae</u>	a)	75.82	49.17	38.88	41.25
	b)	65.63	50.97	40.48	40.38
	c)	75.48	47.76	42.05	39.66
<u>C. utilis</u>	a)	72.07	51.34	40.79	38.62
	b)	63.75	47.64	41.53	38.30
	c)	65.42	50.86	40.90	39.00
<u>C. utilis</u> term.	a)	63.15	48.50	49.53	41.72
	b)	64.04	48.93	41.09	40.44
	c)	64.49	53.13	41.44	39.95

Cuadro 6. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la primera corrida de digestibilidad en la avena.

tiempo (hr): tratamiento		12	24	48	96
Control	a)	73.19	51.53	33.54	29.47
	b)	75.08	94.95	33.69	28.90
	c)	74.53	50.24	32.99	29.09
<u>S. cerevisiae</u>	a)	75.31	51.06	34.16	29.29
	b)	71.74	50.12	33.21	27.68
	c)	71.79	48.42	33.09	28.53
<u>C. utilis</u>	a)	74.44	48.46	33.88	28.92
	b)	70.62	51.28	33.89	27.00
	c)	74.59	49.61	32.69	26.68
<u>C. utilis</u> term.	a)	76.21	49.38	34.11	29.08
	b)	74.95	48.37	32.76	30.03
	c)	77.26	48.69	33.69	28.36

Cuadro 7. Resultado de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la segunda corrida de digestibilidad en la alfalfa.

tiempo (hr):		12	24	48	96
Tratamiento					
Control	a)	62.11	46.58	38.54	37.19
	b)	60.82	42.74	37.34	37.73
	c)	59.04	43.48	37.37	59.04
<u>S. cerevisiae</u>	a)	59.84	42.59	37.69	35.58
	b)	59.86	41.61	37.17	33.76
	c)	61.84	42.92	39.03	33.31
<u>C. utilis</u>	a)	59.85	43.34	37.14	34.54
	b)	58.84	44.25	35.03	37.15
	c)	59.74	43.11	38.51	34.39
<u>C. utilis</u> term.	a)	66.51	47.89	36.47	37.59
	b)	60.07	45.61	37.64	33.41
	c)	61.43	43.47	37.01	33.65
<u>A. oryzae</u>	a)	57.68	45.29	39.33	34.63
	b)	58.96	44.57	37.25	34.76
	c)	58.17	42.88	38.39	32.00

Cuadro 8. Resultados de los valores obtenidos para cada una de las determinaciones de la FDN en cada una de las muestras, para cada tratamiento y cada tiempo en la segunda corrida de digestibilidad en la avena

Tiempo (hr):		12	24	48	96
Tratamientos					
control	a)	66.41	46.24	33.72	30.43
	b)	68.31	43.97	32.21	29.53
	c)	66.31	47.16	31.68	27.15
<u>S. cerevisiae</u>	a)	67.97	46.05	32.36	26.43
	b)	67.09	45.08	31.95	28.15
	c)	68.99	45.65	31.47	26.66
<u>C. utilis</u>	a)	64.80	44.55	33.40	25.64
	b)	65.62	46.30	32.10	27.27
	c)	64.33	48.06	29.89	25.90
<u>C. utilis</u> term.	a)	65.98	48.69	31.01	-----
	b)	68.13	46.34	31.79	27.48
	c)	64.74	45.39	34.29	26.49
<u>A. oryzae</u>	a)	66.07	48.74	31.15	27.29
	b)	66.60	-----	30.30	27.28
	c)	68.68	45.57	22.33	27.67

APENDICE B

Cuadro 9. Resultados del análisis de varianza usando como variable dependiente la fibra detergente neutro remanente de las muestras.

Fuente	¹ G.L.	suma de cuadrados	cuadrados medios	valor de F	P>F
² Corr	1	252.33323	252.33323	70.38	0.0001
³ Forr	1	56.62563	56.62563	15.79	0.0003
⁴ Lev	3	4.79047	1.59682	0.45	0.7219
tiempo	3	11648.34973	3882.78324	1082.93	0.0001
Forr*lev	3	8.08155	2.69385	0.75	0.5281
Forr*Hora	3	623.89041	207.96347	58.00	0.0001
Lev*Hora	9	15.00479	1.66720	0.46	0.8892
Error	40	143.417337	3.585433		

1) Grados de libertad, 2) Corrida, 3) Forraje, 4) levadura

Cuadro 10. Resultados del analisis de varianza usando como variable dependiente el punto intercepto

f fuente	G.L. ¹	suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	P>F
Forr ²	1	0.00154056	0.00154056	0.01	0.9071
Lev ³	3	0.04977886	0.01659290	0.16	0.9214
Forr*Lev	3	0.04709569	0.01569856	0.15	0.9269
Corr	1	0.24280256	0.24280256	2.31	0.1724
Error	7	0.73615594	0.10516513		

1) Grados de libertad, 2) Forraje, 3) Levadura

Cuadro 11. Resultados del analisis de varianza usando como variable dependiente el tiempo lag

Fuente	¹ G.L	suma de cuadrados	cuadrados medios	valor de F	P>F
² Forr	1	23.41834056	23.41834056	1.73	0.2299
³ Lev	3	24.65894763	8.21964921	0.61	0.6312
Forr*Lev	3	13.48833106	4.4961035	0.33	0.8028
Corr	1	65.62215056	65.62215056	4.85	0.0636
Error	7	94.78261269	13.54037324		

1) Grados de libertad, 2)Forraje, 3) Levadura

Cuadro 12. Resultados del análisis de varianza usando como variable dependiente la tasa de digestión

Fuente	G.L. ¹	suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	P>F
Forr ²	1	0.00198025	0.00198025	7.16	0.0317
Lev ³	3	0.00046050	0.00015350	0.56	0.6610
Forr*Lev	3	0.00005585	0.00001862	0.07	0.9755
Corr	1	0.00034596	0.00034596	1.25	0.3002
Error	7	0.00193558	0.00027651		

1) Grados de libertad, 2)Forraje, 3) Levadura