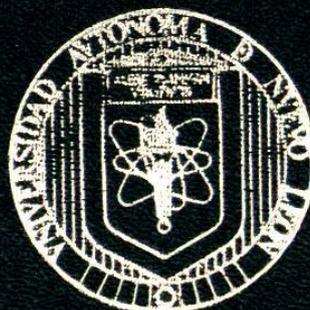


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



BACTERIAS ACIDOLACTICAS COMO
PROMOTORAS DE LA DIGESTIBILIDAD
IN VITRO E IN VIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN PRODUCCION ANIMAL

PRESENTA:
JUANA ARANDA RUIZ

MARIN, N. L.

FEBRERO DE 1997

TM
SF97
A7
C.1



1080071709

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



BACTERIAS ACIDOLACTICAS COMO
PROMOTORAS DE LA DIGESTIBILIDAD
IN VITRO E IN VIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN PRODUCCION ANIMAL

PRESENTA:

JUANA ARANDA RUIZ

MARIN, N. L.

FEBRERO DE 1997

12678

TM
SF 97
A 7

045-633
FA2
1997
C.5



**BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS COMO PROMOTORAS
DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* E *IN VIVO***

TESIS

**QUE PRESENTA, JUANA ARANDA RUIZ
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN ANIMAL**

COMISIÓN REVISORA



Ph.D. Rigoberto González González

ASESOR PRINCIPAL



Ph.D. Erasmo Gutiérrez Ornelas

ASESOR AUXILIAR



Dr. Hugo Bernal Barragán

ASESOR AUXILIAR

FEBRERO 1997

BIBLIOTEC

rono

U.A.N.I

DEDICATORIA

POR AMOR A:

MIS PADRES
Francisco y Efjenia

Y A MIS
AMORES
Javier Jaime
Javier Alejandro
Jaime Daniel

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Subdirección de Estudios de Postgrado de la FA-UANL y en especial Al Dr. Juan Francisco Villarreal A. su apoyo brindado durante mis estudios de maestría.

Quiero agradecer al Ph. D. Rigoberto González G. su valiosa asesoría y confianza depositada en mi. Al Ph. D. Erasmo Gutiérrez O. por contribuir en mi formación en el campo de la Nutrición Animal. Al Dr. Hugo Bernal B. por sus valiosas opiniones en la realización del escrito de tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Ulrrico López D. por su amistad y consejos siempre atinados.

Con mucho cariño agradezco a mi hermana María de los Ángeles su apoyo y confianza que siempre me ha brindado.

Deseo agradecer también al Ing. J. Francisco Uresti por su orientación en los análisis químicos efectuados en el presente trabajo. Al Ing. Jorge Landa y al Sr. Elías Martínez M. por su valiosa ayuda en el trabajo de campo.

Finalmente agradezco con admiración y respeto a todos mis maestros que me brindaron sus conocimientos, así también a todos mis amigos que siempre me dieron su apoyo.

ÍNDICE

Capítulo		Página
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	Bacterias acidolácticas.....	3
2.1.1	Importancia de las bacterias acidolácticas.....	3
2.1.2	Clasificación de las bacterias acidolácticas.....	4
2.2.	Microbiología del rumen (flora y fauna).....	6
2.2.1	Colonización del sistema digestivo de rumiantes.....	12
2.2.2	Adhesión microbiana y digestión del alimento.....	13
2.2.3	Avances en la manipulación de la fermentación ruminal.....	14
2.3.	Aspectos generales de los probióticos.....	14
2.3.1	Características de un probiótico.....	17
2.3.2	Mecanismo de acción de los probióticos.....	18
2.3.3	Comparación de los probióticos contra antibióticos.....	20
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1.	Primera etapa (<i>in vitro</i>).....	24
3.1.1	Preparación de cultivos bacterianos.....	25
3.1.2	Aplicación de tratamientos y análisis estadísticos.....	26
3.2.	Segunda etapa (<i>in vivo</i>).....	27
3.2.1	Preparación de cultivos bacterianos.....	29
3.2.2	Aplicación de tratamientos y análisis estadísticos.....	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31

4.1.	Primera etapa (digestibilidad <i>in vitro</i>).....	31
4.1.1.	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando forrajes como sustrato.....	32
4.1.1.1	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando heno de alfalfa como sustrato.....	32
4.1.1.2	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando rastrojo de maiz como sustrato.....	34
4.1.2.	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando concentrados como sustrato.....	35
4.1.2.1	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando grano de sorgo como sustrato.....	35
4.1.2.2	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando grano de maíz como sustrato.....	37
4.1.2.3	Digestibilidad <i>in vitro</i> utilizando un suplemento proteínico como sustrato.....	39
4.2.	Segunda etapa (digestibilidad <i>in vivo</i>).....	41
4.2.1	Consumo de materia seca.....	42
4.2.2	Digestibilidad (%) de la materia seca.....	43
4.2.3	Consumo de materia orgánica.....	44
4.2.4	Digestibilidad (%) de la materia orgánica.....	44
4.2.5	Digestibilidad (%) del nitrógeno.....	44
4.2.6	Balance del nitrógeno.....	45
4.2.7	Digestibilidad (%) de la Fibra Neutro Detergente.....	45
4.2.8	Digestibilidad (%) de la Fibra Acido Detergente.....	45
4.2.9	Ganancia de peso.....	46

5.	CONCLUSIONES.....	47
6.	RECOMENDACIONES.....	48
7.	RESUMEN.....	49
8.	LITERATURA CITADA.....	51

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro		Página
1	Bacterias más comunes en los rumiantes.....	11
2.	Formulación del suplemento proteínico utilizado en las prueba de digestibilidad (<i>in vitro</i>).....	25
3.	Ingredientes del medio de cultivo lactosado.....	26
4.	Tratamientos de la primera etapa.....	26
5.	Ración alimenticia para ovinos.....	28
6.	Tratamientos de la segunda etapa.....	29
7.	Cantidad de bacterias contenidas por ml de inóculo (primera etapa).....	31
8.	Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando heno de alfalfa como sustrato	32
9.	Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando rastrojo de maíz como sustrato.....	34
10.	Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando grano de sorgo como sustrato.....	36
11.	Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando grano de maíz como sustrato.....	37
12.	Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando un suplemento proteínico como sustrato.....	39
13.	Promedios por tratamiento de las variables analizadas en la segunda etapa (digestibilidad <i>in vivo</i>) utilizando bacterias acidolácticas.....	43

Figura	Página
1. Principales especies del género <i>Lactobacillus</i>	5
2. Principales especies del género <i>Streptococcus</i>	6
3. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y heno de alfalfa como sustrato.....	33
4. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y rastrojo de maíz como sustrato.....	35
5. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y grano de sorgo como sustrato.....	36
6. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y grano de maíz como sustrato.....	38
7. Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y suplemento proteínico como sustrato.....	40

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del campo de la nutrición animal, se han venido realizando avances biotecnológicos en la elaboración de productos alimenticios tendientes a mejorar la eficiencia alimenticia en las diferentes especies domésticas. En la actualidad no sólo se elaboran raciones que cumplan con las necesidades propias de las diferentes etapas de los animales o aditivos que incrementen la palatabilidad de un alimento, sino que se han suministrado (en forma directa, o bien, incorporados al alimento o al agua), compuestos y/o microorganismos que modifican las condiciones del tracto digestivo, incrementando la utilización de los alimentos consumidos. Dentro de estos productos se encuentran los llamados probióticos, término utilizado para describir suplementos alimenticios a base de microorganismos vivos. El principal objetivo del uso de los probióticos es lograr mejor productividad y salud en los animales, al asegurar una microflora adecuada en su sistema digestivo. Probióticos a base de bacterias de los géneros tales como *Lactobacillus* y *Streptococcus sp* pueden cumplir este objetivo, puesto que sobreviven en el paso a través del estómago y colonizan el tracto intestinal eliminando, por exclusión competitiva, a patógenos al evitar que estos microorganismos se adhieran a las células intestinales del hospedero.

Las preparaciones de probióticos basadas en cepas selectas de bacterias de lactobacilos y estreptococos son más eficientes cuando el animal está bajo stress, ya que en estas condiciones se incrementa el número de *E. coli* en el tracto gastro intestinal y el número de lactobacilos disminuye.

El exitoso desarrollo de un probiótico requiere del análisis de miles de cepas a través de varias pruebas, antes de que el producto quede disponible a los nutricionistas. Jones y Thomas (1987), mencionan siete criterios para un probiótico efectivo: que no sea patógeno, que sea Gram positivo, que sea ácido resistente-ácido productor, que sea cepa específica, que sea excretor del factor anti *E. coli*, que sea bili-resistente y que sea viable/estable.

Los microorganismos más usados como probióticos son las levaduras y las bacterias acidolácticas, las cuales son parte de la flora intestinal de los animales domésticos y proliferan en forma natural en la leche; de ésta pueden ser aisladas para posteriormente ser utilizadas en el procesamiento lechero mejorando la calidad del producto (sabor y textura), enriqueciendo la producción de queso, mantequilla y yoghurt. También de vegetales pueden aislarse microorganismos; tal es el caso de la fermentación de la col, de la cual se aísla *Lactobacillus plantarum*, microorganismo utilizado en el ensilado de forrajes, ya que incrementa la degradación de la fibra haciendo más disponibles los nutrientes existentes en este tipo de alimentos.

Por lo anteriormente señalado, se decidió realizar el presente trabajo ya que el Laboratorio de Biotecnología Microbiana cuenta con cinco cepas acidolácticas en estado puro, las cuales son *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus cremoris* y *S. lactis*; se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Valorar el efecto de diferentes cantidades de inóculo (ml de cultivo) sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de cinco ingredientes de uso común en la alimentación de rumiantes.
- 2.- Seleccionar al menos dos bacterias en base a mejora de digestibilidad *in vitro* de la materia seca, con respecto al testigo, manifestando diferencias estadística significativas y además con la menor cantidad de ml a aplicar.
- 3.- Con las bacterias seleccionadas, realizar una determinación de digestibilidad *in vivo* en jaulas metabólicas, utilizando ovinos y una ración comercial

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Bacterias acidolácticas

2.1.1 Importancia de las bacterias acidolácticas

Las bacterias acidolácticas son microorganismos de gran difusión en la naturaleza y presentan características muy interesantes, ya sea por su estrecha relación con organismos superiores, o por ser indispensables en la preparación de muchos alimentos tales como ácido láctico, col agria, encurtidos y ensilaje.

Las bacterias lácticas tienen un papel insustituible en el procesamiento tecnológico fermentativo, en el control de la función intestinal y en la prevención y terapia de diversas enfermedades del hombre y animales (Bottazzi et al., 1995). Son probablemente el grupo de bacterias de mayor importancia para la industria de la leche. La razón por la que desempeñan un papel tan importante, estriba en la capacidad de poder degradar por fermentación, diversas clases de azúcares (en especial, naturalmente azúcares de la leche), totalmente o en gran parte hasta ácido láctico.

Así, la actividad de especies y cepas escogidas hace posible la fabricación de los más diversos productos obtenidos a partir de la leche agria, de mantequilla de nata agria y de muchas clases de queso. También juega un importante papel en la producción de otros alimentos, estimulantes digestivos y forrajes (Demeter et al., 1971).

El ensilado de algunos forrajes verdes (como hierbas, maíz verde, trébol, alfalfa, hojas de remolacha), es un procedimiento importante en la agricultura, llevado a cabo principalmente por bacterias lácticas en condiciones anaerobias. Por el bajo pH final así obtenido de 4.0-4.2, la masa de forraje se conserva meses y hasta años. Con ello es posible conservar largo tiempo las cantidades de forraje

verde producido en verano y, de esta forma, proporcionar al ganado también en invierno forraje de alto valor (Demeter et al., 1971).

Finalmente debe mencionarse que el ácido láctico puro se utiliza hoy ampliamente como sustancia auxiliar, en curtiduría, en la industria textil y en la industria de materiales sintéticos. En la industria de la alimentación se emplea en cantidades considerables sustituyendo a los ácidos de frutos para la fabricación de limonadas, zumos y jarabes de frutas. Además se utiliza para fines terapéuticos en medicina y como aditivo en cosméticos. Desafortunadamente, entre las bacterias lácticas se encuentran asimismo algunas especies patógenas para el hombre y los animales. De éstas pueden ser mencionadas como de importancia en la producción lechera, los agentes productores de inflamaciones y supuraciones de mucosas externas e internas y órganos, así como los gérmenes productores de las formas más frecuentes de mastitis de las vacas lecheras (Demeter et al., 1971).

2.1.2 Clasificación de las bacterias acidolácticas

Todas las bacterias lácticas pertenecen a la familia Lactobacteriaceae. Los miembros de esta familia tienen forma de bastoncillos o cocos son gram positivos, sin movilidad, microaerófilos o anaerobios que se multiplican como bastoncillos en un solo plano. Habitualmente estos organismos se dividen en dos grupos: los que producen primordialmente ácido láctico conocidos con el nombre de homofermentantes, y los que además de ácido láctico producen ácido acético, etanol, glicerol, bióxido de carbono y otras sustancias conocidos como heterofermentantes (Foster et al., 1957).

La familia Lactobacteriaceae se divide en dos tribus

1.- Streptococae que son de forma esférica e incluye a los géneros

Streptococcus y *Leuconostoc*.

2.- Lactobacilleae que son en forma de bastoncillo, siendo importantes tres

géneros : *Lactobacillus*, *Microbacterium* y *Propionibacterium*.

Bottazzi (1995), coloca a las bacterias lácticas en dos familias y hace una distribución de las principales especies de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Figuras 1 y 2).

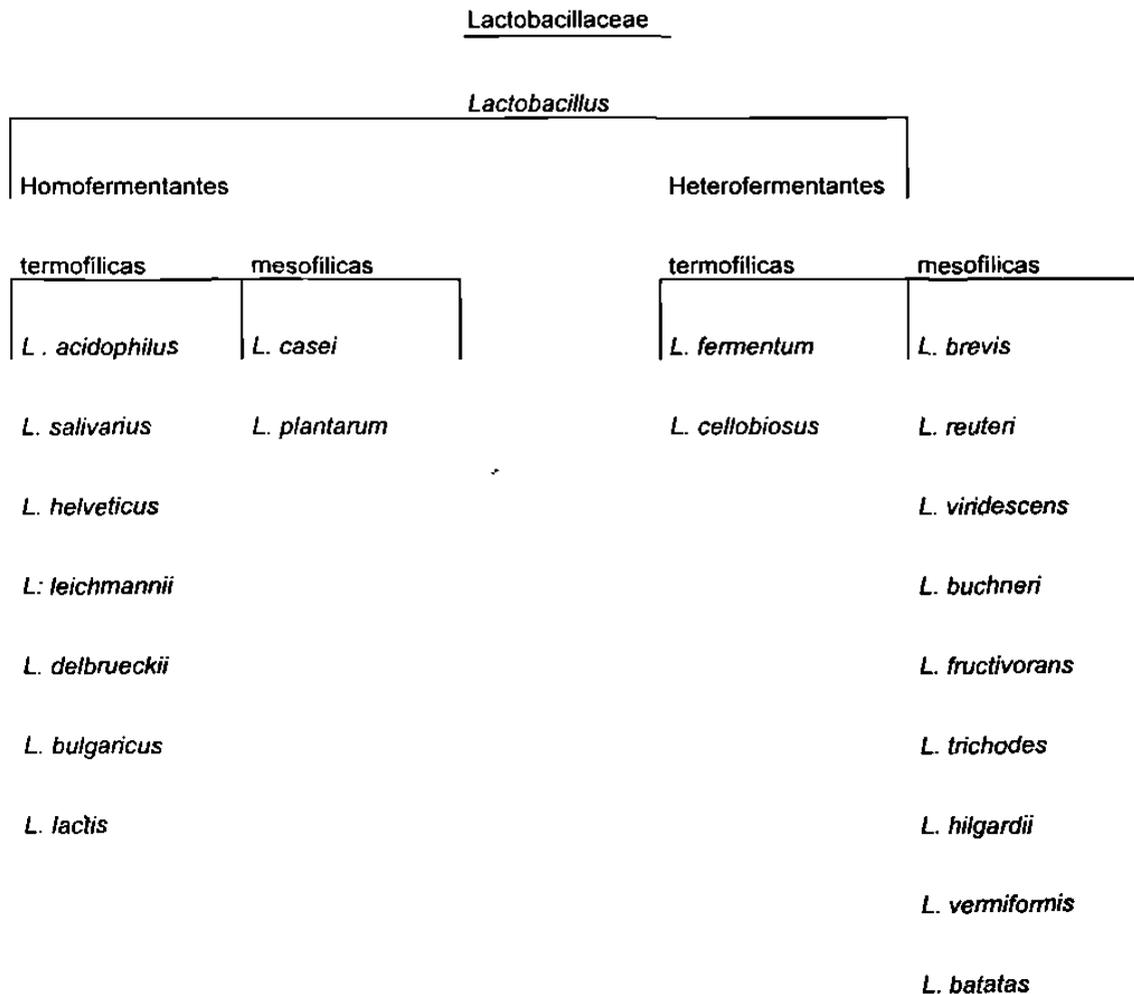


Figura 1. Principales especies del género *Lactobacillus*

<u>Streptococaceae</u>					
<u>Streptococcus</u>		<u>Leuconostoc</u>		<u>Pediococcus</u>	
Homofermentantes			Heterofermentantes		Homofermentantes
mesofílicos	meso. termo	termofílicos	mesofílicos	mesofílicos	termofílicos
<i>S. lactis</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. thermofílicos</i>	<i>Leuc. cremoris</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. acidilactici</i>
			<i>Leuc. lactis</i>		
			<i>Leuc. mesenteroides</i>		
			<i>Leuc. dextranicum</i>		

Figura 2. Principales especies del género *Streptococcus*

2.2 Microbiología del rumen (flora y fauna)

El rumen presenta un ambiente muy favorable al crecimiento microbiano. Los valores de pH, entre 5.5 y 7, y la temperatura (39-4°C) son casi óptimos para muchos de sus sistemas enzimáticos; el alimento llega a él de una forma más o menos continúa y las contracciones de las paredes del estómago favorecen el contacto de los microorganismos en todo momento con alimentos recién ingeridos o rumiados. Las condiciones de humedad son favorables para muchos microorganismos y los productos finales de fermentación, se eliminan por absorción o por paso a otras porciones del tubo digestivo. Como resultado de este ambiente favorable se registra el crecimiento de una abundante población de organismos en el rumen-retículo. Algunos cálculos indican que el protoplasma microbiano puede llegar a constituir el 10% del contenido ruminal (Church, 1974).

Los microorganismos del rumen pueden ser divididos en tres principales grupos: bacterias, protozoarios y hongos. Existe una extensa literatura al respecto, y hasta ahora han sido identificadas más de 200 especies de bacterias (flora) y más de 20 especies de protozoarios (fauna). Los contenidos filtrados del rumen consisten de una suspensión microbiana con 10^{10} bacterias y 10^6 protozoarios por ml, pero esto no es uniforme, pues considerables números de protozoarios y bacterias están asociados con la digesta sólida; las concentraciones de microorganismos dentro de la matriz sólida son mucho mayores que en suspensión libre. Los hongos (forma vegetativa) están asociados con la digesta sólida (Czerkawski, 1986).

Las bacterias del rumen varían en tamaño y forma. Entre las bacterias más pequeñas (1 a 2μ de diámetro) están los "bacilos", pequeños "óvalos", "cocos" redondos y bacilos (varas) muy cortos. La población bacteriana del rumen también contiene una pequeña proporción de bacterias grandes (ovales de 3 a 6μ de diámetro). Las bacterias muy frecuentemente forman cadenas, rosetas y otros grupos.

En general, los protozoarios son mayores que las bacterias y pueden ser divididos en dos grupos principales: los "holotricos", con cilios cubriendo su cuerpo entero, y los "entodimorfos". Los holotricos son móviles, usan carbohidratos simples y pueden almacenar carbohidratos excesivos en forma de almidón microbiano. Los entodimorfos son más exigentes en sus requerimientos nutricionales y parecen ser morfológicamente más complejos. Los protozoarios pueden ingerir pequeñas partículas de alimento y bacterias, contribuyendo así a la renovación microbiana del rumen (Czerkawski, 1986).

La mayoría de los microorganismos del rumen son estrictamente anaerobios (viven sin oxígeno). Muchas de las especies de microorganismos aislados del rumen son sensibles a pequeñas cantidades de oxígeno, pero una

proporción (las bacterias anaerobias facultativas), no sólo toleran pequeñas cantidades de oxígeno, sino que lo pueden utilizar en su metabolismo. El epitelio está bien suministrado de sangre, y puesto que los capilares están separados del lumen por sólo unas cuatro capas de células, debemos suponer que algo de oxígeno se difunde hacia dentro del rumen. Ha sido establecido que una gran proporción de las bacterias que se adhieren a la pared del rumen son facultativamente anaerobias. Además, puesto que los rumiantes toman agua y producen mucha saliva (ambas saturadas con oxígeno), y puesto que el animal pasa cerca de un tercio del tiempo rumiando (penetra aire al masticar la rumia), los microorganismos del rumen en su ambiente natural no pueden ser tan sensibles al oxígeno como antes se creyó. No obstante, dado el deficiente suministro de oxígeno en el rumen, la población microbiana ha evolucionado su actividad metabólica de tal forma que pueda realizarlas sin oxígeno (Czerkawski, 1986).

Hay muchas interrelaciones complejas entre las especies microbianas del rumen. Algunas reacciones son secuenciales, en donde el producto metabólico final de un tipo microbiano sirve de sustrato para otro microorganismo. Varias de tales asociaciones han sido identificadas, en donde ambas especies se ven beneficiadas en cuanto a eficiencia de intercambio de energía (Czerkawski, 1986).

Puesto que el líquido ruminal está en estado de flujo, para que una especie dada de microorganismo sobreviva, su tiempo de retención en el rumen debe ser mayor que su tiempo de generación. Muchos microorganismos se reproducen rápidamente y su concentración es mantenida a pesar de la dilución, pero algunas especies tienen un largo tiempo de generación o presentan largas fases "lag" en su crecimiento. Estos microorganismos serían eliminados del rumen si no fueran retenidos en la masa sólida de la digesta, la cual permanece en el rumen más

tiempo que el líquido. Los microorganismos del rumen degradan alimentos complejos, muy frecuentemente de baja calidad, convirtiéndolos en productos finales y obteniendo así energía para su propio crecimiento. El animal hospedero usa los productos finales del metabolismo microbiano como fuente de energía y usa la masa microbiana como fuente de proteína (Czerkowski, 1986).

Hungate, 1966 (citado por Church, 1974), hace una clasificación de las bacterias del rumen, basándose en parte, en los substratos utilizados y en parte en los productos finales de su metabolismo.

1.- Bacterias celulolíticas (que digieren la celulosa). Están ampliamente distribuidas por todo el mundo y se han encontrado en el tubo digestivo de rumiantes y monogástricos. Estas bacterias tienen la capacidad bioquímica de producir enzimas que pueden hidrolizar la celulosa, y también utilizar la celobiosa, disacárido que contiene glucosa unida por puentes beta.

2.- Bacterias que digieren la hemicelulosa. La hemicelulosa difiere de la celulosa en que contiene pentosas y hexosas y, en ocasiones, ácidos urónicos. Es un constituyente importante de las plantas, y los organismos que hidrolizan la celulosa suelen ser capaces de utilizar también la hemicelulosa. Sin embargo, muchos de los que digieren la hemicelulosa no pueden hacerlo con la celulosa.

3.- Bacterias amilolíticas (que digieren el almidón). Muchos de los gérmenes celulolíticos pueden digerir el almidón, mientras que los amilolíticos no suelen digerir la celulosa.

4.- Bacterias que utilizan azúcares. La mayor parte de las bacterias capaces de utilizar los polisacáridos pueden utilizar también los di- y monosacáridos. El material de las plantas, jóvenes principalmente, contiene grandes cantidades de carbohidratos solubles en agua y éstos podrían ser utilizados por las bacterias.

Quizá los azúcares procedentes de células bacterianas muertas y lisadas o el material capsular (formado principalmente por hidratos de carbono) de las células bacterianas, podrían también ser utilizados.

5.- Bacterias que utilizan ácidos. Se sabe de muchos organismos que utilizan el ácido láctico, aunque éste no está habitualmente presente en cantidades apreciables en el rumen salvo en situaciones anormales. Otros gérmenes utilizan ácido succínico u otros similares, como el málico o el fumárico. Otros emplean el fórmico mientras que hay también los que utilizan el acético, aunque probablemente no es una fuente primaria de energía.

6.- Bacterias proteolíticas. Se sabe de muchas bacterias ruminales que emplean aminoácidos como fuente principal de energía.

7.- Organismos productores de amoníaco. Esta clase puede ser una duplicidad de las proteolíticas. Sin embargo, se sabe de numerosos organismos que producen amoníaco a partir de varias fuentes, y este producto es uno de los que se encuentran en forma invariable en el líquido ruminal.

8.- Bacterias que producen metano. Son muy difíciles de cultivar *in vitro*, por lo que se saben pocas cosas de los mismos. De las cantidades de gas metano que se encuentran en el rumen (25-30% del total de los gases) se deduce que deben existir tales organismos en cantidades relativamente grandes.

9.- Bacterias lipolíticas. Suspensiones mixtas de bacterias son capaces de utilizar el glicerol y de obtenerlo por hidrólisis a partir de moléculas de grasa. Otros organismos hidrogenan ácidos grasos insaturados, e incluso hay otros que parecen metabolizar ácidos grasos de cadena larga, hasta convertirlos en cetonas.

10.- Organismos que sintetizan vitaminas. No se ha estudiado con amplitud la síntesis de vitaminas por determinadas especies de las bacterias del rumen; sin embargo, se sabe que hay muchas capaces de sintetizar varios de los miembros del grupo vitamínico B.

Wu (1987), nos presenta en el cuadro 1, una lista de las bacterias más comunes en los rumiantes (adaptada de Hungate et al., 1964; Smith, 1965; Bryant, 1970).

Cuadro 1. Bacterias más comunes en los rumiantes

<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Ruminococcus albus</i>
<i>Bacteroides succinogenes</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Clostridium welchii</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>Lachnospira multiparus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Succinimonas amylolytica</i>
<i>Methanobacterium mobilis</i>	<i>Succinovibrio dextrinosolvens</i>
<i>Methanobacterium ruminantium</i>	<i>Treponema sp.</i>

De las anteriores, dos grupos de bacterias son de nuestro interés:

Los estreptococos. Se ha demostrado que son microorganismos importantes de la flora del rumen; la bacteria principal de este grupo presente en

el rumen bovino es *Streptococcus bovis*. Resultados recientes sugieren un promedio de 10^9 células/ml de esta bacteria, que aumenta en algunas condiciones dietéticas, por ejemplo, cuando los granos son un componente importante de la ración, cuando aumenta la glucosa o cuando los animales vuelven a los pastizales.

Los lactobacilos. Se reconocen como miembros de la flora del rumen. Observaciones sugieren que los lactobacilos llegan a ser parte muy destacada de la flora del rumen, en situaciones en que los estreptococos lo son menos; por ejemplo, en una dieta rica en heno y concentrados, los lactobacilos probablemente figuran en considerable proporción de la población total, en cantidades mayores que 10^6 por ml, y atacan diversos hidratos de carbono para dar ácido láctico y en algunos casos ácido acético (Annison, 1986).

2.2.1 Colonización del sistema digestivo de rumiantes

La colonización de los sistemas digestivos de rumiantes neonatos sigue una típica sucesión ecológica, en la que las bacterias proliferan en la fase fluida inmediatamente después del nacimiento, y colonizan los tejidos del tracto digestivo a las 38 horas (Cheng et al., 1991); en consecuencia, se cree que los rumiantes jóvenes adquieren su población microbiana por contacto oral con animales más viejos, o posiblemente por inhalación de organismos suspendidos en el aire (Church, 1974). Se ha indicado que se desarrollan grandes poblaciones de lactobacilos en la primera semana de edad; su número tiende a disminuir a partir de la tercera semana, alcanzando los niveles del adulto hacia el 3-4 mes.

Las bacterias de la fase fluida facilitan la subsecuente colonización secuencial del fluido por hongos (a los 8 a 10 días) y protozoarios (a los 12 a 20

días), resultando la formación de complejos consorcios multiespecies que eventualmente se desarrollan en el fluido, sobre las partículas de alimento, y sobre la superficie de los tejidos, y efectúan las complejas actividades digestivas de los rumiantes maduros. La sucesión ecológica natural del sistema digestivo de rumiantes puede culminar en un sistema de fermentación basado en forraje, si a los animales se les da tal dieta. Los consorcios microbianos muy complejos que se adhieren a digerir ese material forrajero, llegan a ser muy eficientes si el aporte de nutrientes permanece sin cambio. Por otro lado, la alimentación con granos produce gradualmente un patrón de fermentación muy diferente, basado en las actividades de diferentes consorcios microbianos que se adhieren a los tejidos del grano (Cheng et al., 1991).

En el rumen, como en la mayoría de los ecosistemas microbianos naturales, los substratos nutritivos tienen un profundo efecto sobre el desarrollo de complejas comunidades integradas de microorganismos. Cuando se logre entender estos complicados sistemas, se podrán manipular las tasas de digestión de varios alimentos, acelerando aquellas que sean lentas, y retardando aquellas que por su alta liberación de nutrientes causan disturbios digestivos, tales como acidosis, inflamación y abscesos del hígado (Cheng et al., 1991).

2.2.2 Adhesión microbiana y digestión del alimento

El examen microscópico del rumen y su contenido, muestra poblaciones microbianas muy adheridas a partículas de alimento en la digesta. Los tejidos de los forrajes y cereales están protegidos por una cutícula que es casi completamente resistente a la acción microbiana. Usualmente, las bacterias ruminales evitan esta barrera física llegando a los tejidos internos digeribles a

través de los estomas, lenticelas y áreas dañadas. Similarmente, los hongos ruminales concentran su digestión sobre las regiones vulnerables de los tejidos vegetales, pero cuando se enfrentan con tejidos recalcitrantes, sus hifas poseen la extraordinaria capacidad de penetrar la cutícula. Esta acción debilita los tejidos y provee sitios adicionales para el ataque bacteriano (McAllister et al., 1994).

2.2.3 Avances en la manipulación de la fermentación ruminal

Los métodos actuales para manipular la fermentación ruminal que involucran biotecnología microbiana incluyen ionóforos, antibióticos y aditivos microbianos en el alimento. Los desarrollos en tecnología de ADN recombinante indican que los métodos futuros tendrán un campo mucho más amplio; se ha sugerido que en el futuro serán usados microorganismos ruminales genéticamente manejados para mejorar la fermentación ruminal. Antes de que esto sea posible, varios objetivos técnicos deben ser alcanzados: primero; deben ser desarrollados métodos para insertar genes ajenos o modificados dentro de microorganismos ruminales, asegurando su eficiente expresión. Segundo, la expresión de los productos del gen debe ser conocida y ser nutricionalmente útil en vivo. Tercero, deben ser encontrados los mecanismos para introducir y mantener la nueva cepa en la población ruminal mezclada (Wallace, 1994).

2.3 Aspectos generales de los probióticos

El aumento en la demanda mundial de alimento ha fomentado las investigaciones que promueven incrementos en cosechas y en producción animal. Los principales factores que afectan la producción animal son la eficiencia en la

utilización de alimentos ingeridos y el control de enfermedades, ambos muy relacionados con la actividad microbiana (Wu, 1987).

Los microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza; unos son patógenos para los animales mientras que otros benefician la producción animal. Así, tenemos que durante un largo proceso de evolución, los microorganismos han logrado una relación simbiótica con el animal hospedero formando la flora microbiana gastrointestinal (Rosell, 1987), otorgando beneficios en la producción animal. Entre tales beneficios se mencionan los siguientes:

- 1.- Algunos microorganismos producen vitaminas y compuestos químicos no identificados, esenciales para otros microorganismos benéficos, y producen también aminoácidos esenciales como lisina y metionina, importantes para el crecimiento animal.
- 2.- La mayoría de los alimentos para animales están compuestos de materiales crudos que necesitan enzimas esenciales para que los componentes complejos se descompongan produciendo azúcares simples, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc., los cuales pueden ser usados por el animal y los microorganismos que habitan en él. Los microorganismos producen varias enzimas, como la xilanas, lipasa, proteasa, betaglucanasa y amilasa que ayudan a la digestión del alimento.
- 3.- Los microorganismos pueden producir sabor y aroma específicos que pueden realzar la palatabilidad del alimento (Sharpell, 1985; Schindler, 1982 citados por Wu, 1987).

En los animales generalmente la colonización microbiana normal ocurre en todo el tracto digestivo, donde el papel benéfico principal de dicha microflora residente es ayudar en la digestión de alimento y excluir los patógenos ejerciendo

diferentes tipos de interacciones en las que incluyen: competición, mutualismo, comensalismo y depredación.

Un papel muy importante dentro de la Biotecnología es el que juegan los microbiólogos, ya que han probado y desarrollado organismos de acción específica para inhibir a los organismos dañinos e incrementar la eficiencia de la conversión del alimento en el animal hospedero. Esto ha traído por consecuencia que en la actualidad en la industria del alimento se incluyan cultivos de microorganismos como aditivos, productos conocidos como "Probióticos".

El concepto de probiótico aplicado a medicina preventiva fue originado por Elie Metchnikoff en 1907 (citado por Atherton y Robbins, 1987). El postuló que la gran longevidad de algunas personas de los países búlgaros se debía al consumo de leche fermentada con *Lactobacillus bulgaricus* (yoghurt). Desde entonces ha habido muchas referencias de los efectos positivos de algunas cepas de lactobacilos usados como suplementos dietéticos tanto en humanos como en animales.

El término probiótico se utiliza normalmente para describir suplementos animales a base de microorganismos vivos, que aseguran una microflora adecuada en el sistema digestivo animal (Alm, 1983). Probióticos a base de *Lactobacillus* y *Streptococcus sp* pueden cumplir este objetivo, puesto que sobreviven en el paso a través del estómago (monogástricos), y colonizan el tracto intestinal eliminando por exclusión competitiva a patógenos enterotoxigénicos tales como *E. coli*, *Vibrio cholera*. Ya que estos organismos no pueden producir enfermedad sin adherirse a las células intestinales del hospedero (Fuller y Brooker, 1974, citados por Jones y Thomas, 1987), la precolonización del intestino delgado por bacterias no patógenas tales como lactobacilos y estreptococos es

una importante herramienta de manejo. Las preparaciones de probióticos basadas en estas cepas son más eficientes si se usan cuando el animal está bajo stress. Tannock (1983) citado por Atherton y Robbins (1987), sometió a stress por hambre a varios tipos de animales, observando una disminución de lactobacilos y generalmente un incremento de coliformes en el tracto gastrointestinal. Estos resultados fueron atribuidos a la reducción del consumo, lo cual a su vez disminuye la disponibilidad de substrato para los lactobacilos, ya que estos microorganismos requieren de suministro continuo de substrato nutritivo para mantener su posición en la población microbiana. Cualquier disminución en su número, inmediatamente permite la proliferación de las coliformes. Una flora intestinal dominada por coliformes conlleva a la retención de agua y daños en la pared epitelial resultando en diarreas.

2.3.1 Características de un probiótico

Wu (1987), menciona ocho características que debe reunir un microorganismo ideal como probiótico:

- 1.- no patógeno tanto para animales como al hombre
- 2.- alta tolerancia a los medios ácidos (bilis y HCl)
- 3.- productor de ácido láctico durante la fermentación
- 4.- fácil proliferación *in vitro*
- 5.- fácil proliferación *in vivo*
- 6.- alta supervivencia a procesamientos (liofilización, deshidratación, congelación, etc.)

7.- gran estabilidad a la temperatura ambiental ya sea separado o mezclado con el alimento

8.- sin potencial para aparearse con microorganismos patógenos

Actualmente la mayoría de los probióticos son seleccionados del grupo de bacterias acidolácticas, siendo los lactobacilos los más importantes. Estos son anaerobios facultativos y pueden utilizar muchos carbohidratos como fuente de energía, produciendo ácido láctico como principal producto final. La capacidad de los lactobacilos para crecer rápidamente y tolerar ambientes ácidos, explica su efectividad para habitar en el tracto digestivo de muchas especies de animales (Shahani y Ayebo, 1980, citados por Wu, 1987). El exitoso desarrollo de un probiótico requiere del análisis de miles de cepas a través de varias pruebas a nivel laboratorio y con animales.

2.3.2 Mecanismo de acción de los probióticos

Metchnikoff en 1908 postuló la teoría de que el efecto de microbios dañinos en el tracto intestinal debe ser aliviado por la ingestión de microorganismos benéficos. En tanto que Lilley y Stillwel en 1965 demostraron que productos bioquímicos de la fermentación bacteriana pueden estimular el crecimiento de otros microbios. Esto está en contraste con lo reportado por Crawford en 1979, quien confirmó el concepto de Metchnikoff de que bacterias acidolácticas implantadas en el tracto digestivo actúan directamente en la composición de la población microbiana (todos ellos citados por Atherton y Robbins, 1987).

Consecuentemente, hay debate sobre si el probiótico debe ser un cultivo vivo (viable) de especies de bacterias o bien, un producto no viable de la

fermentación; existen productos comerciales que caen en una u otra de estas dos categorías. Así, la definición de probiótico no es concisa, y un intento de definirlo es: "cualquier producto que pueda ayudar a la flora intestinal para mantener su dominancia sobre los organismos patógenos" (Atherton y Robbins 1987).

La inclusión de probióticos en la dieta animal puede resultar en una ganancia del peso diario, incremento en la producción de leche y/o disminución de la incidencia de desórdenes gastrointestinales. Aunque el modo exacto de acción de los probióticos hasta el momento es desconocido, se manejan varias teorías al respecto:

- 1.- La bacteria prolifera sobre la superficie del tracto digestivo, por lo que los microorganismos ingeridos posteriormente tendrán gran dificultad para establecerse en el tracto (Costerton et al., 1983).
- 2.- Los ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno producidos por bacterias acidolácticas alteran el pH gástrico creando un ambiente desfavorable para los patógenos.
- 3.- Las bacterias acidolácticas tienen efecto inhibitor sobre otros organismos. Esto se ha observado en particular para *Lactobacillus sp* contra el crecimiento de algunos enterococos patógenos incluyendo *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Bacillus sp*, *Shigella sp* y *Vibrio sp*. Algunos lactobacilos pueden producir una substancia antimicrobiana específica o producir un metabolito para neutralizar la enterotoxina de *E. coli* (Witchell y Kenworthy, 1976).
- 4.- *Lactobacillus sp* puede producir amilasa, la cual ayuda en la digestión del almidón (Lindgren y Refai, 1984).

Algunas investigaciones realizadas en la década de los 80's, mostraron que ciertas especies de lactobacilos, cuando se incluyeron en la dieta, pudieron causar un efecto benéfico tanto para humanos como para animales (Gilliland, 1987) El efecto primario se dedujo que fue el control del crecimiento de microorganismos indeseables; investigaciones más recientes sin embargo, han revelado algunos beneficios adicionales de tales aditivos. Uno de estos beneficios es el mejoramiento de la utilización de la lactosa por personas con deficiente asimilación de este carbohidrato (Kim y Gilliland, 1983). Además, ciertas cepas de *Lactobacillus acidophilus* han demostrado poseer la capacidad de asimilar colesterol durante su crecimiento en el tracto digestivo. Los efectos de los probióticos en los animales varían de acuerdo a las cepas o especies de microorganismos usados, así como a la preparación de dichos productos, ya que en algunos casos pueden no haber sobrevivido los microorganismos (Pollmann et al., 1980).

2.3.3 Comparación de los probióticos contra antibióticos

El método más común para suprimir los microorganismos indeseables en la producción animal, ha sido el tratamiento con agentes antibacteriales llamados antibióticos (Rosell, 1987), de tal manera que una gran variedad de estos compuestos son usados en el control de enfermedades de animales y como promotores de crecimiento. En medicina, los antibióticos son los fármacos más importantes hechos por fermentación microbiológica. Desgraciadamente, por el uso de antibióticos se puede contaminar la leche, huevos y carne con residuos químicos. Además, los antibióticos pueden matar la microflora benéfica, dejando un vacío que puede ser ocupado posteriormente por bacterias nocivas; más aún,

el amplio uso de antibióticos han conducido a la aparición de cepas resistentes a ellos y bacterias mutantes patógenas para el hombre (Johnston et al., 1983).

En años recientes, con la preocupación creciente de las consecuencias del uso de antibióticos, se ha incrementado el interés en el uso de los probióticos, introduciéndolos como medicamentos preventivos con ventajas sobre los antibióticos. De acuerdo a Wu (1987), los probióticos muestran las siguientes características:

1. microorganismos vivos
2. no absorbidos en el tracto digestivo
3. mejoran el crecimiento y eficiencia alimenticia
4. no dejan residuos en tejidos
5. no causan mutaciones en microorganismos
6. producen ácido, reduciendo el pH y perjudican el crecimiento de organismos patógenos
7. poseen actividad antimicrobiana localizada
8. proliferan en el tracto digestivo y compiten con las bacterias patógenas

El mismo autor (Wu, 1987), señala las siguientes características de los antibióticos:

1. compuestos químicos puros
2. pueden ser absorbidos en el tracto digestivo
3. mejoran el crecimiento y eficiencia alimenticia
4. pueden dejar residuos en tejidos

5. pueden causar mutaciones en microorganismos
6. su modo de acción puede ser el bloqueo de la síntesis de ADN, ARN y proteínas en las células vivas
7. tienen amplio espectro de actividad

Dentro de los compuestos antimicrobianos más estudiados y usados en la alimentación animal se encuentran los ionóforos, que son notables por su capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana celular y actúan contra bacterias gram positivas. Tales compuestos pueden ser usados para manipular la función del rumen y se usan rutinariamente para mejorar el rendimiento del ganado de carne, disminuyendo el consumo de alimento y aumentando la conversión alimenticia (Goodrich et al., 1984). Aunque muchos ionóforos han sido estudiados y probados, sólo dos se usan rutinariamente como aditivos alimenticios: Monensina y Lasalocida.

La utilidad de estos compuestos ha estimulado la búsqueda de otros métodos de alteración de la fermentación ruminal, mediante incremento de la fermentación de propionato e inhibición de la producción de metano. La utilización de bacterias acidolácticas, en la mayoría de los casos presentan una alternativa al proporcionar ácido láctico como producto final de su metabolismo. En la mayoría de los regímenes alimenticios, el ácido láctico está considerado como intermediario transitorio en el metabolismo ruminal, y es convertido en propionato y acetato por poblaciones anaeróbicas de bacterias utilizadoras de lactato en el rumen (Dawson, 1988).

Richardson et al., (1976), estudió el efecto *in vitro* del ionóforo Monensina (33 mg/kg) y el probiótico "Lacto-Sacc" (bacterias acidolácticas y cultivo de levaduras Alltech inc 1 gr/kg), evaluando la producción de ácidos grasos volátiles.

Utilizó por separado una dieta alta en granos y otra alta en forrajes, depositadas en fermentadores de 1 lto que contenían además de la dieta y el suplemento, un inóculo de contenido ruminal de novillos fistulados alimentados con la misma dieta. El muestreo para analizar fue cada 4 o 5 días, y se encontró que el suplemento microbiano Lacto-Sacc, incrementó las concentraciones relativas de acetato y propionato, pero disminuyó las de butirato y valerato con respecto al control. La cantidad de metano producido disminuyó un 4%, también se incrementó el pH, y no se alteró la concentración de bacterias celulolíticas. Cuando la dieta fue alta en forrajes el pH fue mayor, pero no hubo significancia en la proporción de productos finales principales. De este estudio se concluyó que el suplemento con bacterias acidolácticas, puede influir significativamente la fermentación ruminal en algunas situaciones alimenticias pero no en otras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, situada en el Km. 17.5 carretera Zuazua-Marín en Marín, N. L. El trabajo se desarrolló en los laboratorios (Lab.) de Bromatología, Biotecnología Microbiana y Unidad Metabólica, durante un periodo de 8 meses. Dicho estudio se dividió en dos etapas, una *in vitro* y otra *in vivo*.

3.1 Primera etapa (*in vitro*)

El Lab. de Biotecnología Microbiana cuenta con cinco cepas de bacterias acidolácticas en estado puro; cuatro de ellas fueron aisladas a partir de productos lácteos comerciales (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*), y una a partir de la fermentación de col (*L. plantarum*). Todas ellas se encuentran sembradas sobre placa de agar lactosado y bajo refrigeración, y fueron utilizadas para medir su efecto en la digestión de los ingredientes utilizados en el experimento.

El grano de sorgo, grano de maíz, rastrojo de maíz, heno de alfalfa y un concentrado proteínico (Cuadro 2), se sometieron a una prueba de digestibilidad *in vitro*. Se les añadió líquido ruminal extraído de un ovino y diferentes cantidades (ml) de un cultivo de bacterias de 24 hrs de incubación, realizándose un total de cinco pruebas, una para cada cepa bacteriana.

Cuadro 2. Suplemento proteínico utilizado en las pruebas de digestibilidad *in vitro*

Ingredientes:	% en la ración	análisis calculado
sorgo	66.7	
soya	23.0	PC%=23.3
gluten de maíz	1.0	PS%=7.6
melaza	5.0	EM Mcal/Kg=3.0
urea	1.8	Ca%=0.53
orto fosfato	0.5	P%=0.49
carbonato	0.7	MS%=89.56
premezcla de vitaminas y minerales	0.5	
sal	0.8	

3.1.1 Preparación de cultivos bacterianos

La preparación del cultivo bacteriano se inició con la realización de un preinóculo, que se elaboró depositando una asada de colonia bacteriana dentro de 10 ml de medio de cultivo lactosado (cuadro 3), contenido en un tubo de ensayo. Se incubó por 24 hrs a 35 °C; después se transfirieron los 10 ml del cultivo a un matraz con 340 ml de medio lactosado, y se incubó nuevamente a 35 °C procediéndose a realizar la prueba de digestibilidad *in vitro* de acuerdo a la metodología citada por Tilley y Terry (1963).

Cuadro 3. Ingredientes del medio de cultivo lactosado

Ingredientes	Cantidad en g
caldo de soya tripticaseina	20
extracto de levaduras	5
dextrosa	5
lactosa	5
sacarosa	5
cloruro de sodio	4
acetato de sodio	1.5
ácido ascórbico	0.5
agua destilada	1000 ml

3.1.2 Aplicación de tratamientos y análisis estadísticos

Los diferentes tratamientos que se aplicaron sobre los alimentos se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos de la primera etapa

Tratamiento	Medio de cultivo (ml)	+	Cultivo bacteriano de 24 h (ml)
1	10	+	0
2	9	+	1
3	5	+	5
4	0	+	10

Cada tratamiento se realizó por triplicado, además de tres blancos para cada tratamiento, con 10 ml de líquido ruminal cada uno, más el volumen (ml) del cultivo bacteriano correspondiente a cada tratamiento.

La digestibilidad *in vitro* sólo fue llevada en su fase biológica, que corresponde a una fermentación bacteriana con duración de 48 h. Posteriormente, el contenido de cada tubo se hizo pasar a través de un papel filtro Whatman 541 utilizando vacío, recogiendo así la parte no digerida del substrato utilizado. El índice de digestibilidad (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Digestibilidad } in vitro (\%) = \frac{\text{Muestra depositada en el tubo (g de materia seca)} - \text{muestra recogida en el papel filtro (g de materia seca) corregidos por blanco}}{\text{Muestra depositada en el tubo (g de materia seca)}} \times 100$$

El valor de cada ingrediente se corrigió en base a materia seca. Con estos datos se procedió a realizar los análisis estadísticos, utilizando un diseño completamente al azar y una comparación de medias de la diferencia mínima significativa (Steel y Torrie, 1990).

3.2 Segunda etapa (*in vivo*)

Una vez realizada la primera etapa del experimento, fue posible seleccionar dos de las cepas bacterianas, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus lactis*, que fueron suministradas en dos tratamientos y un testigo, aplicándose sobre el alimento al momento de ofrecerlo a los animales. Se contó con 18 borregos machos de la raza Pelibuey con un peso promedio de 25 Kg, los que fueron colocados en jaulas metabólicas, por un lapso de 21 días. Se consideraron los

primeros 14 días como período de adaptación, durante el cual se suministró la ración descrita en la tabla 5. En los siguientes 7 días se registró el alimento ofrecido, el rechazado, las heces y la orina. Se tomó una muestra representativa de cada una (10 %), y se mantuvieron en refrigeración hasta que se realizaron los análisis bromatológicos correspondientes (Harris 1970). El contenido de nitrógeno fue determinado en el alimento para cada tratamiento, así como en las heces y en la orina. Con estos datos se calculó el % de digestibilidad del nitrógeno y el balance de nitrógeno. La fibra neutro detergente (FND) y la fibra ácido detergente (FAD) fueron determinadas en el alimento para cada tratamiento y en las heces fecales (Van Soest, 1963), y se calculó el % de digestibilidad de ambas determinaciones.

Cuadro 5. Ración alimenticia para ovinos

Ingredientes	% en la ración	análisis calculado
heno de sorgo	16.02	
grano de sorgo	71.28	
harina de soya	2.94	PC= 12 %
sebo de res	3.53	PS= 4.5%
melaza	3.53	E. M.=2.9
urea	0.8	Mcal/Kg
fosfato dicalcico	0.8	calcio= .53
carbonato de Ca	0.44	fósforo= .48
premezcla de vitaminas y minerales	0.22	
sal	0.44	
total	100.00	

3.2.1 Preparación de cultivos bacterianos

Se preparó un preinóculo de cada una de las dos cepas bacterianas (*L. acidophilus* y *S. cremoris*), consistente en 14 ml de medio de cultivo lactosado en

un matraz de 50 ml, más una asada de colonia bacteriana. Estos preinóculos se mantuvieron en incubación por 24 hrs a 35 °C y a 150 rpm en una incubadora con agitación, con el fin de obtener una mayor producción de biomasa. Posteriormente se inocularon 3.5 ml de *L. acidophilus* y 3.5 ml de *S. lactis* a cada uno de 3 matraces que contenían 700 ml de medio estéril, y se colocaron en una incubadora con agitación para grandes volúmenes, manteniendo una temperatura de 35 °C y 150 rpm durante 24 hrs. El crecimiento bacteriano se evaluó al terminar el período de incubación, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 690 nm.

3.2.2 Aplicación de tratamientos y análisis estadístico

Una vez obtenido el cultivo bacteriano que contenía una mezcla de las bacterias *L. acidophilus* y *S. lactis*, se prepararon los tratamientos a aplicar, (cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos de la segunda etapa

Tratamiento	Medio de cultivo (ml)	+	Cultivo bacteriano de 24 hrs (ml)
1	200	+	0
2	100	+	100
3	0	+	200

A los animales se les ofreció 1400 gr de una ración comercial para ovinos, cuya formulación se presenta en el Cuadro 5. El alimento fue humedecido uniformemente con 200 ml del tratamiento correspondiente, y se asignó aleatoriamente a cada animal, teniendo un total de 6 animales por tratamiento.

Las variables medidas en el experimento (etapa dos) fueron las siguientes:

- 1.- peso vivo inicial
- 2.- consumo de materia seca
- 3.- consumo de materia orgánica
- 4.- digestibilidad (%) de la materia seca
- 5.- digestibilidad (%) de la materia orgánica
- 6.- digestibilidad (%) del nitrógeno
- 7.- balance de nitrógeno
- 8.- digestibilidad (%) de la FND
- 9.- digestibilidad (%) de la FAD
- 10.- peso vivo final
- 11.- ganancia de peso.

En esta etapa se utilizó un diseño completamente al azar, tomando el peso inicial de los animales como covariable.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primera etapa (digestibilidad *in vitro*)

Durante esta primera etapa se realizaron 5 pruebas de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), utilizando una cepa bacteriana para cada una de ellas. El periodo de duración para cada prueba, desde preparación del inóculo hasta el cálculo del % de DIVMS fue de 2 semanas, por lo que esta etapa tuvo una duración total de 10 semanas. Correspondieron a los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre de 1993.

La cantidad de bacterias por mililitro del inóculo se determinó por densidad óptica obteniendo la cantidad de bacterias a aplicar para cada tratamiento (cuadro 7).

**Cuadro 7.- Cantidad de bacterias contenidas por
ml de inóculo (primera etapa)**

Bacteria	cantidad de bacterias por ml
<i>L. acidophilus</i>	1 X10 ⁹
<i>L. bulgaricus</i>	5 X10 ⁷
<i>L. plantarum</i>	3 X10 ⁷
<i>S. cremoris</i>	1 X10 ⁸
<i>S. lactis</i>	2 X10 ⁷

Los datos generados de esta primera etapa fueron analizados; para cada una de las bacterias en cada ingrediente, bajo un diseño completamente al azar,

Los datos generados de esta primera etapa fueron analizados; para cada una de las bacterias en cada ingrediente, bajo un diseño completamente al azar, utilizando el paquete computacional Harvey (1991). Se registraron respuestas muy significativas manifestando digestibilidades muy altas en los ingredientes utilizados, con respecto al tratamiento testigo. Para facilitar la exposición de los resultados los ingredientes fueron agrupados como forrajes y concentrados.

4.1.1 Digestibilidad *in vitro* utilizando forrajes como sustrato

4.1.1.1 Digestibilidad *in vitro* utilizando heno de alfalfa como sustrato

Resultados muy sobresalientes, se encontraron al inocular 5 ml de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* en heno de alfalfa, incrementándose en 16 unidades porcentuales la digestibilidad con respecto al testigo (cuadro 8). En el heno de alfalfa se incrementó la digestibilidad 20 unidades con 10 ml del cultivo de *Lactobacillus bulgaricus*; sin embargo no hay diferencia estadística con respecto al tratamiento 1 ml.

Cuadro 8. Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad *in vitro* (%) de heno de alfalfa

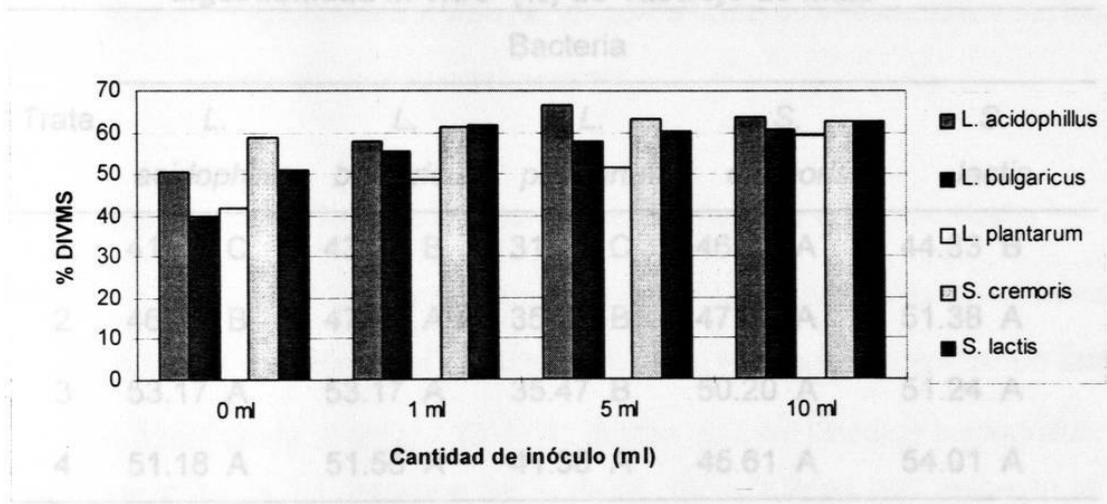
Trata.	Bacteria				
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>
1	50.40 C	40.07 B	41.97 D	58.60 B	51.18 B
2	58.04 BC	55.20 A	48.80 C	61.20 A	61.70 A
3	66.38 A	58.08 A	51.60 B	63.00 A	60.24 A
4	63.56 A	60.70 A	59.11 A	62.71 A	62.50 A

Letras diferentes A, B, C, D en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

Al utilizar cantidades mayores de inóculo de *Lactobacillus plantarum*, se observó un incremento progresivo en la digestibilidad, obteniendo un 59.11% en el tratamiento con 10 ml. Sin embargo, esta bacteria registró los menores incrementos de digestibilidad para este ingrediente. La comparación de medias entre los tratamientos revelan que el nivel 1 ml de cultivo de *Streptococcus cremoris*, fue suficiente para manifestar efecto positivo con respecto al testigo en heno de alfalfa, incrementando en 3 unidades porcentuales la digestibilidad. Al utilizar *Streptococcus lactis*; observamos que el nivel 1 ml de cultivo aumentó 10 unidades de % la digestibilidad con respecto al testigo en heno de alfalfa

En este ingrediente la bacteria más sobresaliente fue *L. acidophilus* (fig. 3), la cual es una de las bacterias más utilizadas en los probióticos (Gilliland et al., 1984).

Cuadro 9. Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad *in vitro* (%) de rastrojo de maíz



Letras diferentes A, B, C en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.01$)

Figura 3. Digestibilidad *in vitro* (%) utilizando bacterias acidolácticas

como inóculo y heno de alfalfa como sustrato

Al inocular *Lactobacillus plantarum*, las digestibilidades fueron muy bajas incluso en el testigo (31.48%), obteniendo una máxima respuesta al inocular 10 ml (fig. 4), de dicho cultivo (41.38%). No hubo diferencia estadística entre los tratamientos al inocular *Streptococcus cremoris*; por otro lado *Streptococcus lactis*

4.1.1.2 Digestibilidad *in vitro* utilizando rastrojo de maíz como sustrato

La respuesta favorable al inóculo de bacterias sobre la digestibilidad del rastrojo de maíz fue altamente significativa ($P < 0.01$). Al inocular 5 ml de un cultivo de *Lactobacillus acidophilus*, la digestibilidad se incrementó 11 unidades de % (cuadro 9) con respecto al testigo. Una respuesta similar se obtuvo al inocular 5 ml de *Lactobacillus bulgaricus*. La utilización de esta bacteria ha sido muy importante en la industria lechera, llegando a ser la base de un gran desarrollo tecnológico en la elaboración de productos lácteos, principalmente del yoghurt, y su efecto probiótico ha sido muy sobresaliente en humanos (Tamime y Robinson, 1991).

Cuadro 9. Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad *in vitro* (%) de rastrojo de maíz

Trata.	Bacteria				
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>
1	41.94 C	43.50 B	31.49 C	46.26 A	44.33 B
2	46.72 B	47.70 AB	35.71 B	47.00 A	51.38 A
3	53.17 A	53.17 A	35.47 B	50.20 A	51.24 A
4	51.18 A	51.55 A	41.38 A	45.61 A	54.01 A

Letras diferentes A, B, C en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.01$)

Al inocular *Lactobacillus plantarum*, las digestibilidades fueron muy bajas incluso en el testigo (31.49%), obteniendo una máxima respuesta al inocular 10 ml (fig. 4), de dicho cultivo (41.38%). No hubo diferencia estadística entre los tratamientos al inocular *Streptococcus cremoris*; por otro lado *Streptococcus lactis*

incrementó la digestibilidad en 7 unidades de % respecto al testigo, al inocular 1 ml de cultivo.

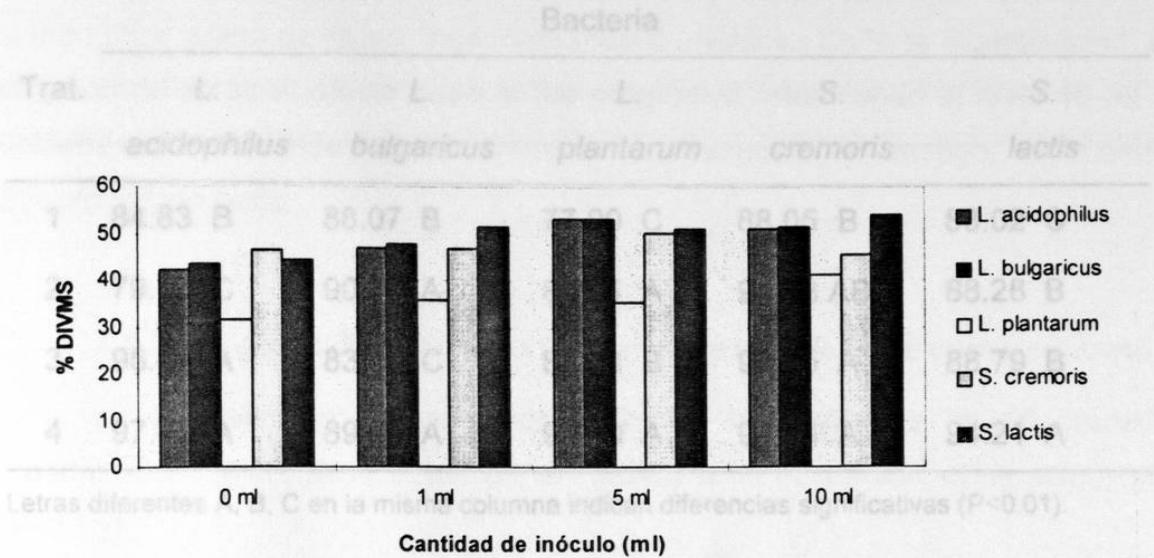


Figura 4. Digestibilidad *in vitro* (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y rastrojo de maíz como sustrato

4.1.2 Digestibilidad *in vitro* utilizando concentrados como sustrato

4.1.2.1 Digestibilidad *in vitro* utilizando grano de sorgo como sustrato

La respuesta al aplicar 10 ml de cultivo de *Lactobacillus acidophilus*, fue de un incremento de 13 unidades de % de la digestibilidad con respecto al testigo (cuadro 10). El incremento en la digestibilidad como respuesta a la aplicación de *Lactobacillus bulgaricus*, fue de tan sólo 2 unidades con respecto al testigo.

Figura 5. Digestibilidad *in vitro* (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y grano de sorgo como sustrato

Cuadro 10. Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad *in vitro* (%) de grano de sorgo

Trat.	Bacteria				
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>
1	84.83 B	88.07 B	77.00 C	88.05 B	83.02 C
2	79.16 C	90.29 A	88.94 A	91.93 AB	88.28 B
3	95.43 A	83.40 C	83.28 B	92.35 A	88.79 B
4	97.03 A	89.60 A	90.10 A	94.54 A	94.21 A

Letras diferentes A, B, C en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

El tratamiento 10 ml presentó los mejores incrementos de digestibilidad en grano de sorgo (13 unidades de %) al utilizar *Lactobacillus plantarum* (fig.5)

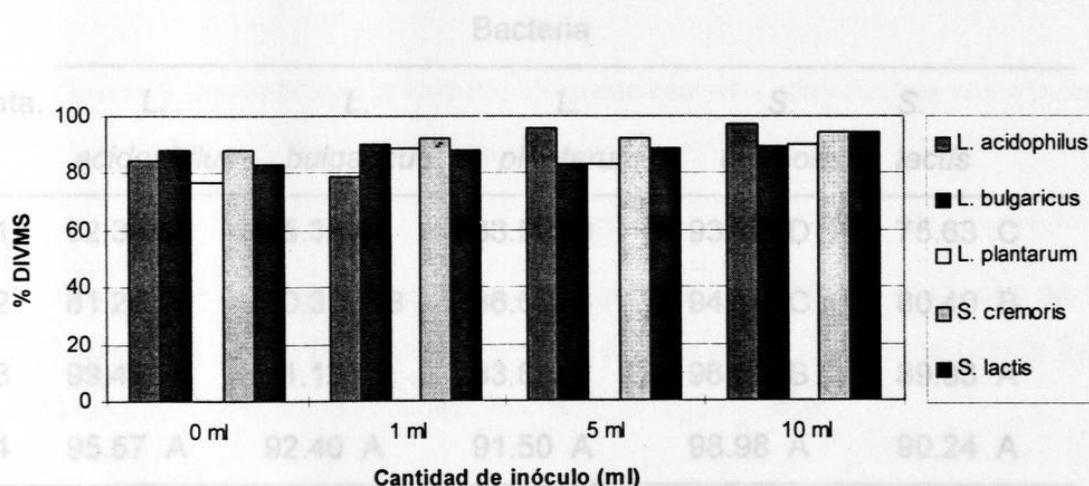


Figura 5. Digestibilidad *in vitro* (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y grano de sorgo como sustrato

La comparación de medias entre los tratamientos, revelan que el nivel 10 ml de cultivo de *Streptococcus cremoris* manifestó efecto positivo con respecto al testigo en el grano de sorgo, incrementando 6 unidades de % la digestibilidad. En el grano de sorgo el efecto positivo fue progresivo, obteniendo el nivel 10 ml 10 unidades porcentuales de incremento con respecto al testigo, al inocular *Streptococcus lactis*.

4.1.2.2 Digestibilidad *in vitro* utilizando grano de maíz como sustrato

La digestibilidad del grano de maíz fue incrementada en 16 unidades (cuadro 11), con respecto al testigo al inocular 5 ml de *Lactobacillus acidophilus* ($P < 0.01$).

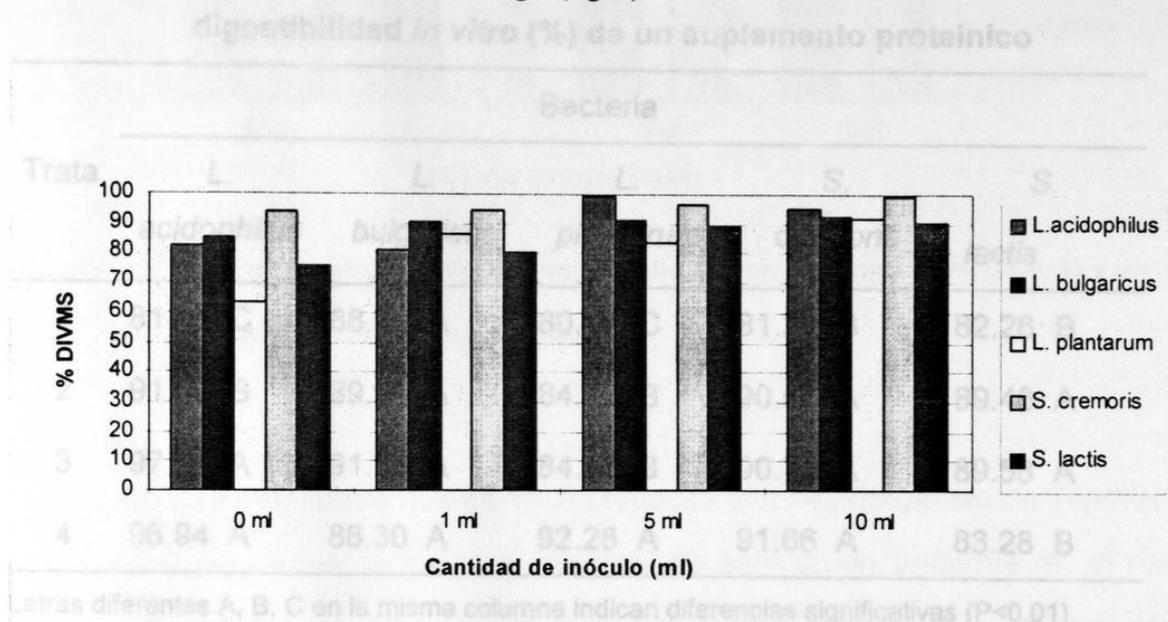
Cuadro 11. Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad *in vitro* (%) de grano de maíz como sustrato

Trata.	Bacteria				
	L. <i>acidophilus</i>	L. <i>bulgaricus</i>	L. <i>plantarum</i>	S. <i>cremoris</i>	S. <i>lactis</i>
1	82.34 B	85.35 B	63.57 D	93.67 D	75.63 C
2	81.29 B	90.31 AB	86.64 B	94.54 C	80.40 B
3	99.40 A	91.12 A	83.87 C	96.62 B	89.33 A
4	95.57 A	92.40 A	91.50 A	98.98 A	90.24 A

Letras diferentes A, B, C, D en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

Así también, una respuesta favorable fue obtenida cuando se inocularon 5 ml de *Lactobacillus bulgaricus*, incrementándose la digestibilidad en 6 unidades de % con respecto al testigo, En grano de maíz, al aplicar 10 ml del inóculo de

Lactobacillus plantarum, la digestibilidad se aumentó 28 unidades de % con respecto al testigo (63.5% DIVMS) (fig. 6), al igual que en los demás ingredientes. Esto nos hace suponer que el líquido ruminal utilizado en esta prueba era deficiente en microorganismos. En el grano de maíz la digestibilidad aumentó en forma paralela a la cantidad aplicada de inóculo de *Streptococcus cremoris*, hasta en 5 unidades con respecto al testigo (fig.6).



Figuras 6. Digestibilidad *in vitro* (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y grano de maíz como sustrato

Al inocular *Streptococcus lactis* el nivel 5 ml aumentó 13 unidades de % la digestibilidad con respecto al testigo en el grano de maíz. Es notorio que la fuente de almidón contenido en los granos favoreció la digestibilidad.

4.1.2.3 Digestibilidad *in vitro* utilizando un suplemento proteínico como sustrato

En el suplemento proteínico, la digestibilidad aumentó 16 unidades de % con respecto al testigo, al inocular 5ml de *Lactobacillus acidophilus* (cuadro 12).

No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos cuando se aplicó *Lactobacillus bulgaricus*. Al inocular *Lactobacillus plantarum* en el suplemento, la digestibilidad aumentó en 12 unidades de % ($P < 0.01$) con respecto al testigo.

Cuadro 12. Comparación de medias para cada bacteria acidoláctica de la digestibilidad *in vitro* (%) de un suplemento proteínico

Trata.	Bacteria				
	L. <i>acidophilus</i>	L. <i>bulgaricus</i>	L. <i>plantarum</i>	S. <i>cremoris</i>	S. <i>lactis</i>
1	81.11 C	88.49 A	80.12 C	81.26 B	82.26 B
2	91.56 B	89.96 A	84.28 B	90.57 A	89.46 A
3	97.61 A	91.74 A	84.23 B	90.74 A	89.58 A
4	96.94 A	86.30 A	92.28 A	91.66 A	83.28 B

Letras diferentes A, B, C en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

Con *Streptococcus cremoris*, al utilizar el suplemento proteínico como sustrato, hubo incrementos muy manifiestos en la digestibilidad, de hasta 9.4 unidades porcentuales (fig 7). Esto permite suponer que esta bacteria tal vez necesite de una mayor disponibilidad de variedad de nutrientes, siendo el caso de los suplementos proteínicos donde el balance de nutrientes es optimizado.

El nivel 5 ml de *Streptococcus lactis* aumentó 7 unidades de % la digestibilidad con respecto al testigo. *S. lactis*, junto con *S. cremoris*, son bacterias muy utilizadas en la elaboración de quesos y crema respectivamente; sin embargo, su utilización como probióticos no ha sido reportada.

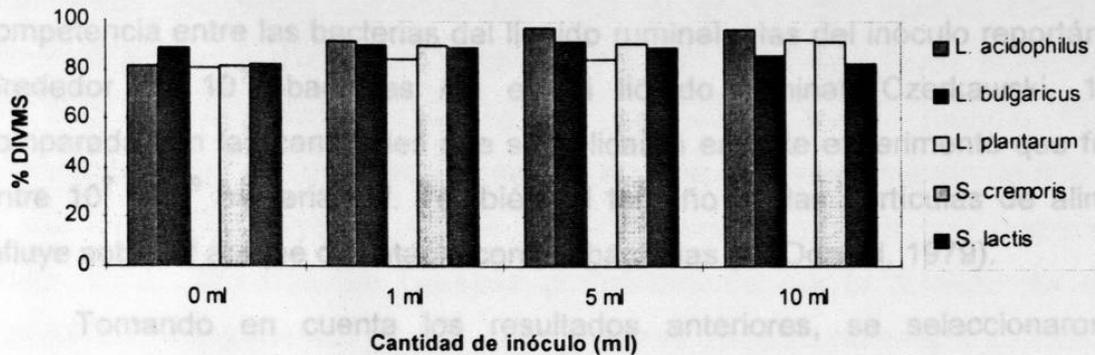


Figura 7. Digestibilidad *in vitro* (%) utilizando bacterias acidolácticas como inóculo y un suplemento proteínico como sustrato

Se ha demostrado que los estreptococos son microorganismos importantes de la flora del rumen; la bacteria principal de este grupo presente en el rumen bovino es *Streptococcus bovis*. Resultados recientes sugieren que 10^8 células/ml de esta bacteria es un promedio, y éste aumenta en algunas condiciones dietéticas, por ejemplo, cuando los granos son un componente importante de la ración, cuando aumenta la glucosa o cuando los animales vuelven a los pastizales. Por otro lado, los lactobacilos llegan a ser parte muy destacada de la flora del rumen en situaciones en que los estreptococos lo son menos; por ejemplo, en una dieta rica en heno y concentrados, los lactobacilos probablemente figuran en considerable proporción de la población total, en cantidades mayores que 10^6 por ml, y atacan diversos hidratos de carbono para dar ácido láctico y en algunos casos ácido acético (Annison, 1986).

En general todas las bacterias manifestaron incrementos en la digestibilidad, pero tal vez sobreestimados ya que todos los experimentos fueron llevados bajo condiciones controladas; además, debe considerarse la competencia entre las bacterias del líquido ruminal y las del inóculo reportándose alrededor de 10^{10} bacterias /ml en el líquido ruminal (Czerkawski, 1986), comparada con las cantidades que se aplicaron en este experimento que fueron entre 10^7 - 10^9 bacterias/ml. También, el tamaño de las partículas de alimento influye sobre el ataque o contacto con las bacterias (McDonald, 1979).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se seleccionaron las bacterias *Lactobacillus acidophilus* del grupo de los lactobacilos y *Streptococcus lactis* del grupo de los streptococos, y con estos microorganismos se elaboró el probiótico que sería evaluado más tarde en la segunda etapa de esta investigación. Dichas bacterias manifestaron efectos benéficos en la digestibilidad *in vitro* al aplicar 1 ml de inóculo, cualidad que se buscaba ya que al hacer los cálculos de proporción de ml de cultivo en cantidad de alimento, esta cantidad no debería ser exagerada ya que se elevaría grandemente la cantidad de humedad en el alimento ofrecido a los animales; esto disminuiría su palatabilidad y aumentaría la probabilidad de contaminación con otros microorganismos.

4.2 Segunda etapa (digestibilidad *in vivo*)

La segunda etapa de esta investigación tuvo una duración de 3 meses, de los cuales 21 días fueron utilizados en la prueba de digestibilidad *in vivo*, y en el resto se realizaron los análisis bromatológicos y estadísticos. Los datos fueron analizados por el modelo estadístico completamente al azar, utilizando el programa computacional Harvey (1991). A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada una de las variables analizadas.

4.2.1 Consumo de materia seca

Esta variable no resultó estadísticamente significativa para ninguno de los tratamientos aplicados, observándose que el efecto del inóculo bacteriano manifestó tendencia mínima en el tratamiento 2 (100 ml de cultivo), aumentando solo 5 g en promedio el consumo con respecto al testigo (cuadro 13). El tratamiento 3 (200 ml de cultivo), presentó el menor consumo siendo de 668.31 g en promedio, disminuyendo 102.74 g. el consumo promedio con respecto al testigo. Esta situación fue causada probablemente por la disminución de la palatabilidad del alimento; ya que el tratamiento 3 tenía una mayor cantidad de bacterias lo que incrementaba la acidez al haber una mayor cantidad de ácido láctico, metabolito producido por dichas bacterias.

Al consumo de materia seca también se le realizó un análisis de covarianza, utilizando el peso inicial de los borregos como covariable, no obteniéndose significancia entre los tratamientos, ni efecto del peso inicial sobre el consumo. Incrementos en el consumo de materia seca al incluir microorganismos en la dieta (cultivo de levaduras 10 g/día) de vacas Holstein en lactación, han sido reportados por Williams (1991), aumentando 1.2 Kg/día ($P < 0.062$) el consumo de alimento reflejando incrementos en la producción de leche de 1.4 Kg/día ($P < 0.05$).

Cuadro 13.- Promedios por tratamiento de las variables analizadas en la segunda etapa (digestibilidad *in vivo*) utilizando bacterias acidolácticas

Variables	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Consumo de MS g	771.05	774.55	668.31
Consumo de MO g	739.74	743.80	639.44
% de DMS	72.96	81.00	78.81
% de DMO	75.45	82.85	80.89
% de DN	62.95	71.71	68.76
Balance de N	4.53	7.11	4.60
% de DFND	66.47	67.69	67.27
% de DFAD*	27.64 a	45.31 ab	23.18 b
Ganan. de peso Kg	2.81	1.32	1.24

*Letras diferentes a, b en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

4.2.2 Digestibilidad (%) de la materia seca

Al realizar el análisis de varianza, se obtuvo una diferencia estadística entre los tratamientos de $P=0.099$. Al introducir la covariable consumo de materia seca se incrementó la probabilidad de significancia a $P=0.078$ entre los tratamientos, cuyos promedios los observamos en el cuadro 13. En este caso se manifiesta una tendencia positiva al inóculo de bacterias. Así, se muestra que en el tratamiento 2 (100 ml de inóculo), se incrementó la digestibilidad un 8.05% y el tratamiento 3 (200 ml de inóculo), 5.86%, con respecto al testigo. Gómez (1991), estudió el efecto de la suplementación con 3 g/día del extracto de fermentación de *Aspergillus orizae*, sobre la producción y digestibilidad de la dieta en vacas Holstein al principio y a mitad de la lactancia, encontrando que en vacas al principio de la lactancia se aumentó la producción de leche 7% respecto al control ($P<0.05$). Asimismo, se incrementó de manera semejante la digestibilidad de : MS (64.0-71.9%), MO (65.3-72.9%), PC (70.5-77.6%), FND (50.7-57.1%), FAD (40.3-48.6%).

4.2.3 Consumo de materia orgánica

No presentó diferencia significativa en ninguno de los tratamientos; sin embargo, en el tratamiento 2 hubo una ligera tendencia aumentando 4.05 g en promedio con respecto al testigo (cuadro 13).

4.2.4 Digestibilidad (%) de la materia orgánica

El análisis de varianza señala una diferencia entre los tratamientos de una probabilidad de $P=0.056$ teniendo un aumento de la digestibilidad de 7.4% en el tratamiento 2 (100 ml de cultivo bacteriano) con respecto al testigo, y de 5.4 % en el tratamiento 3 (200 ml de cultivo bacteriano) con respecto al testigo.

4.2.5 Digestibilidad (%) del nitrógeno

Esta variable manifestó diferencia estadística ($P=0.17$) entre los tratamientos, y un incremento del porcentaje de digestibilidad con respecto al testigo de 8.76% y 2.95% en los tratamientos 2 y 3, respectivamente (cuadro 13).

Tendencias a mejorar la digestibilidad de la proteína y celulosa ($P=0.25$), fueron observados por Wohlt (1991), al suplementar a vacas con Biomate 10 g/animal/día (cultivo de levaduras).

4.2.6 Balance de nitrógeno

No hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos; teniendo un balance positivo en todos los animales excepto en el animal 1 del tratamiento 2, el cual presentó un balance negativo de -0.60%. así mismo, este animal tuvo una pérdida de peso de 2 kg al final de la prueba.

Esta variable es una de las que presentan mayor complicación en su medición, ya que muchas veces se sobreestima el valor de N en la orina y en las heces debido a contaminación, ya sea con alimento o con pelo del animal. Así también, en otras ocasiones se puede subestimar la cuantificación de la producción de heces y orina, ya que los animales provocan derrames de las tinajas que contienen estas excreciones. El tratamiento 2 fue el que presentó la mayor cantidad de nitrógeno retenido, siendo este de 7.11%.del N consumido.

4.2.7 Digestibilidad (%) de la fibra neutro detergente

Esta variable no manifestó diferencia estadística significativa. La incorporación de bacterias en el alimento al valorar la fibra neutro detergente presentó diferencia numérica en el tratamiento 2 (1.22%), con respecto al testigo (cuadro 13).

4.2.8 Digestibilidad (%) de la fibra ácido detergente

La digestibilidad de la fibra ácido detergente presentó diferencia estadística significativa ($P=0.042$) entre los tratamientos 2 y 3 (cuadro 13). La diferencia numérica entre el testigo y el tratamiento 2 es, con 17.67 unidades porcentuales, bastante aceptable.

Se ha observado que al incluir cultivo de levaduras en rumiantes, ellas pueden proveer factores estimulantes para la celulólisis y proteólisis, especialmente cuando el alimento es rico en concentrado ($>50\%$). Asimismo, se ha observado un aumento en el número de bacterias celulolíticas en el rumen, reflejando un aumento en la digestibilidad de la fibra (Williams, 1989). Un aumento de *Ruminococcus albus* de 21.7 a 33.3% del total de bacterias celulolíticas ($P=0.10$) en vacas alimentadas con bromegrass más 3 gr de Amaferm/día (extracto de fermentación de *Aspergillus orizae*), fue reportado por Vicent (1994).

4.2.9 Ganancia de peso

La ganancia de peso en los animales evaluados fue de 2.81 (trata. 1), 1.32 (trata. 2) y 1.24 kg (trata 3) durante el período experimental ($P>0.05$) (cuadro 13). Las pérdidas de peso registradas en algunos animales en los tres tratamientos se debieron probablemente a la palatabilidad del alimento. Sin embargo, esta suposición no es muy confiable, ya que se necesita un período mayor de evaluación en una prueba de comportamiento y no en una prueba de digestibilidad. Ganancias de peso vivo de 100 g/día adicionales en toros Charoláis, se obtuvieron al suministrar 17 g/día de Cerbiobovis industrial (probiótico a base de: *Lactobacillus casei* subespecie *ramnosus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, plus, enzimas amilolíticas (Libersa, 1991).

En resumen, es posible concluir que el efecto de la inoculación de bacterias en el alimento consumido por ovinos, manifestó tendencias a incrementar los valores en todas las variables evaluadas a excepción del peso final, ya que el testigo fue el que obtuvo el mayor peso promedio al final de la prueba.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos muestran que

- Bajo las condiciones de estudio, las bacterias *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus lactis* fueron las más sobresalientes en las pruebas de digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, no fue posible realizar un análisis estadístico que justifique lo anterior, ya que no se realizó una prueba para todas las bacterias y todos los ingredientes, debido a la gran cantidad de material requerido y tiempo para filtrar.
- En la digestibilidad *in vivo* las diferencias entre tratamientos no fueron significativas aunque se observó una tendencia a obtener mayores tasas de digestibilidad en el tratamiento que contenía 100 ml del cultivo de bacterias y 100 ml del medio de cultivo (T2).
- Es probable que la adición de 200 ml de inóculo, haya provocado una disminución en la palatabilidad del alimento, afectando de esta forma el consumo.
- Aunque el número de bacterias adicionado fue abundante, es difícil asegurar su sobrevivencia y competencia en un ecosistema tan perfecto como es el rumen, quedando por tanto abierta la posibilidad de que las bacterias no se establecieron y sólo formaron parte de la proteína microbiana.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de comportamiento evaluando parámetros tales como aumentos de peso y consumo
- Realizar estudios para obtener una metodología adecuada que no afecte la viabilidad ni el vigor de las bacterias, concentrándolas y secándolas, ya sea mediante liofilización u otra técnica, y obteniendo de esta manera todo el inóculo para el período de prueba, siendo más fácil su almacenamiento. Así mismo al suministrar un polvo a los animales, tal vez se mejoraría el consumo reflejando aumentos en la producción.
- Probar el efecto de estas mismas bacterias en otras especies de animales zootécnicos.

7. RESUMEN

El presente estudio fue llevado a cabo en el Lab. de Biotecnología Microbiana, Lab. de Bromatología y Unidad metabólica. Todos ellos forman parte de las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la UANL, localizada en Marín, Nuevo León. El período de investigación fue de 8 meses comprendidos de Septiembre de 1993 a Abril de 1994. Los objetivos del trabajo fueron los siguientes:

- 1.- Valorar el efecto de diferentes cantidades de inóculo (ml de cultivo) por separado de cinco bacterias acidolácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus cremoris* y *S lactis*), sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), de cinco ingredientes de uso común en la alimentación de rumiantes (HA-heno de alfalfa, RM-rastrojo de maíz, GM-grano de maíz, GS-grano de sorgo, SP-suplemento proteínico).
- 2.- Seleccionar al menos dos bacterias en base a mejores porcentos de digestibilidad *in vitro* de la materia seca con respecto al testigo, manifestando diferencias estadísticas significativas y además, con la menor cantidad de ml a aplicar.
- 3.- Con las bacterias seleccionadas realizar una digestibilidad *in vivo* utilizando ovinos alimentados con una ración comercial.

Para cumplir con los objetivos planteados la investigación se dividió en dos etapas. En la primera se realizaron cinco pruebas de digestibilidad *in vitro*, una para cada bacteria ya mencionadas, abarcando solo la primera fase de la digestibilidad correspondiente a una fermentación microbiana con duración de 48 h (Tilley y Terry; 1963). Se obtuvieron resultados muy sobresalientes en todas las bacterias inoculadas, y se selecciono a *Lactobacillus acidophilus* del grupo de los lactobacilos, ya que al inocular 5 ml del cultivo, se incrementó la digestibilidad en 10 unidades de % más que el testigo en todos los ingredientes (HA: 50.40-

66.38, RM: 41.94-53.17, GS: 84.83-95.43, GM: 82.34-99.40, SP: 81.11-97.61). Así mismo se seleccionó a *Streptococcus lactis*, del grupo de los streptococos, ya que con 1 ml se mejoró la digestibilidad entre 5 y 10 unidades de % con respecto al testigo en los ingredientes (HA: 51.18-61.70, RM: 44.33-51.38, GS: 83.02-88.28, GM: 75.63-80.40, SP: 82.26-89.46).

La segunda etapa consistió en una digestibilidad *in vivo* utilizando 18 borregos Pelibuey colocados en jaulas metabólicas (Harris, 1970). Se les ofreció 1400 g de una alimento comercial, más el tratamiento correspondiente de una mezcla de las dos bacterias seleccionadas en la primera etapa, que nos daba un volumen total de 200 ml de inóculo (T1=200 ml de medio de cultivo, T2=100 ml de medio de cultivo + 100 ml de cultivo de bacterias, T3=200 ml de cultivo de bacterias). Sólo la variable %DFAD manifestó diferencia estadística ($P < 0.01$) obteniendo 27.64 y 45.31% en el testigo y en T2, respectivamente. En todas las demás variables se observó tendencia a incrementar la digestibilidad en el T2 (CMS: . testigo:777.05-T2:774.55, CMO: testigo:737.74-T2:743.80, %DMS: testigo:72.96-T2:81.00, %DMO: testigo:75.T2:45-82.85, %DN: testigo:62.95-T2:71.71, balance de N: testigo:4.53-T2:7.11, %DFND testigo:66.47-T2:67.69). Sin embargo, los animales que obtuvieron el mayor peso en promedio fueron los correspondientes al testigo (T1):

En general todas las bacterias manifestaron favorables incrementos en la digestibilidad *in vitro*, y tendencias positivas en la digestibilidad *in vivo*; por lo que sería conveniente realizar más estudios con estas bacterias.

BIBLIOTEC

U.A.T.

8. LITERATURA CITADA

- Alm, L. 1983. The effect of *Lactobacillus acidophilus* administration upon the survival of *Salmonella* in randomly selected human carriers. Proc, Fd. Nut Sci. 7:13-17.
- Annison, E.F. y M.A. Lewis. 1986. El metabolismo en el rumen. De UTEHA. Méx., D. F.
- Atherton, D. y S. Robbins, Thomson and Joseph Ltd. Norwich, and J.Bibby. 1987. Probiotics- A European perspective. Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's First Three anual Symposium (edited by Lyons, T: P:).Nicholasville, USA; Alltech Technical Publications. pags.167-176.
- Bottazi,V.,C.Zacconi, e G.S.Pier. 1995. Probiotica con batteri lattici. Collana Tecnologica a cura del Centro Sperimentale del Latte pags. 160.
- Cheng, K.J., C.W. Forsberg, H. Minato, J.W. Costerton. 1991. Microbial Ecology and Physiology of Feed Degradation within the Rumen.Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in ruminants Proceedings of the seventh International Symposium on Ruminant Physiology Edited by T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima. Academia Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers pag. 596-618.
- Church, D.C. 1974. Fisiología Digestiva y Nutrición de los Runiantes. Vol. 1. Editorial Acribia Pag.185-225.

- Costerton, J.W., R.R. Rozec y K.J. Cheng. 1983. Colonization of particulates mucous, and intestinal tissue. *Proc. Fed. Nutr. Sci.*7:91-105.
- Czerkawski, J.W. 1986. *An Introduction to Rumen Studies*. 1986. Pergamon International Library Oxford New York. pags:7-12.
- Dawson, K:A. 1988. *Manipulating Ruminant Fermentations: Are The Natural Alternatives to Ionophores for Beef Production? Proceedings of Alltech's Fourth anual Symposium (edited by Lyons, T: P:).* Nicholasville, USA; Alltech Technical Publications pags. 101-112.
- Demeter, K.J. y Elbertzhagen H. 1971. *Elementos de Microbiología Lactológica*. Editorial Acribia Zaragoza España. pags: 78-93.
- Foster, E.M., F.E. Nelson, M. L. Speck, R.N. Doetsh.1965. *Microbiología de la Leche* Editorial Herrera. Méx. pags: 8-33.
- Gilliland, S.E. 1987. *Importance of Bile Tolerance in Lactobacilli Used as DietaryAdjuncts. Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's First Three anual Symposium (edited by Lyons, T: P:).* Nicholasville, USA; Alltech Technical Publications pags.149-156.
- Gomez, A. R.A. , J.T. Huber, G.E. Higginbotham, F. Wiersma, D. Ammon y B. Taylor. 1991. *Influence of Feeding Aspergillus oryzae fermentation extract on the milk yields, eating patterns and body temperatur of lactating cows.* *Journal Animals Science.* 69:1733-1740.

Goodrich, R.D., J.E. Garrett, D.R. Goast, M.A. Kirch, D.A. Larson y J.C. Meiskel 1984. Influence of monensin on the performanse of cattle J. Anim. Sci.58:1484-1489.

Harris, L.E. 1970.Métodos para el análisis químico y la evaluación biológica de alimentos para animales Editado por The Center for Tropical Agriculture Feed Composition Project livestock Pavilion University of Florida.

Harvey,W.R. 1991. USER'S GUIDE FOR LSMLMW PC VERSION.

Jones, C.D. y C.N. Thomas 1987. The maintenance of strain specificity and bile when producing stable bacteria. Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's First Three anual Symposium (edited by Lyons, T: P:). 157-166.Nicholasville, USA; Alltech Technical Publications.

Johnston, D.W., J. Bruce and J. Hill. 1983. Incidence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in milk prôduced in the west of Scotland. J. Appl. Bacterial. 54:77-83.

Kim, H.S. y Gilliland 1983. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in human. J. Dairy Sci.66:956.

Libersa, M. 1991. Use of a complex probiotic during finishing of Charolais bulls: supplementing a diet based on dried beet pulp. Bulletin-des-G.T.V. Nº. 2, 45-54.

- Lindgren, S. y O. Refai. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* 57:221-228.
- McAllister, T.A., H.D. Bae, G.A. Jones, y K.J. Cheng. 1994. Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen. *J. Anim. Sci.* 72:3004-3018.
- McDonald, P., J.F.D. Greenhalgh 1979. *Nutrición Animal*. 2º Edición ACRIBIA. Barcelona, España.
- Pollman , D.S., D.M. Danielson y E.R. Peo. 1980. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Animal Sci.* 51:577.
- Richardson, L.F., A.P.Raun, E.L. Potter, C.O. Cooley y R.P. Rathmacher.1976. Effect of monensin on rumen fermentation in *In vitro* and *In vivo*. *J. Anim. Sci.* 43:657.
- Rosell, V. 1987. Acidification and Probiotics in Spanish Pig and Calf Rearing. *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's First Three anual Symposium* (edited by Lyons, T: P:). 177-180.Nicholasville, USA; Alltech Technical Publications.
- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1990. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2a. ed.McGraw-Hill.

- Tamime, A.Y. y R.K. Robinson. 1991. Yogur Ciencia y Tecnología. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. Pag. 235-253.
- Tilley J.,M.A., y R.A. Terry. 1963. A two stage for the "*in vitro*" digestion of forage crops. J. British Grassl. Soc. 18:104.111.
- Van Soest, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Official Agr. Chem. 46 (5):829.
- Vicent, H.V. y K.K. Krekemeier. 1994. Influence of Feeding *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract (Amoferm) on *In situ* Fiber Degradation, Ruminant Fermentation and microbial Protein Synthesis in Nonlactating Cow Feed Alfalfa or Bromegrass Hay. J. Animal Science. 72: 1814-1822.
- Wallace, R.J. 1994. Ruminant Microbiology, Biotechnology, and Ruminant Nutrition: Progress and Problems. J. Animal Science. 72:2992-3003.
- Williams, P.E.V. 1989. The mode of action of yeast culture in ruminal diets: a review of the effect on rumen fermentation patterns. in Biotechnology in the feed industry. Alltech tech. Publ. Nicholasville, Ky. pag. 65
- Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Ines, G.M.; Newbold, C.J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Sacharomyces cereviceae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Animal Science. 69:3016-3026.

- Witchell, I., DE.G. y Kenworthy, R. 1976. Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *Escherichia coli* patogenic for pig. J. Appl. Bacteriol. 41: 163-174.
- Wohlt, J.E., A.D. Finkelstein, y C.H. Chung. 1991. Yest Culture to Improve ntake, Nutrient Digestibility, and Performance by Dairy Cattle During Early Lactation. J. Dairy Sci. 74:1395-1400.
- Wu, J.F. 1987. The Microbiologist's Function in Developing Action-Specific Microorganisms. Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's First Three anual Symposium (edited by Lyons, T: P:). Nicholasville, USA; Alltech Technical Publications pags. 181-197

RIBLIOTECA Agronomía U.A.N.I

12676

