

Levaduras de manzana en la dieta de becerros destetados

Esta investigación consta de tres experimentos cuyo objetivo general fue la evaluación de la inclusión de un inóculo de levaduras (IL) y bagazo de manzana fermentado (BMZN) en la dieta de becerros precozmente destetados y su efecto sobre la digestibilidad in vitro, comportamiento productivo y salud animal. En el primer experimento se evaluó el efecto de un IL y BMZN en la dieta de becerros Angus en crecimiento sobre el comportamiento productivo y sistema inmune. Las variables de la prueba de comportamiento se analizaron con un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento, para las variables de sistema inmune se incluyeron como efectos fijos tratamiento y muestreo; y el animal como efecto aleatorio.

D. Ph. Daniel Díaz Plascencia. Catedrático e Investigador en Nutrición Animal. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Fco. R. Almada km 1. CP. 31453 Chihuahua, Chih., México.



editorial académica española

Aditivo de levaduras de manzana

ead
editorial académica española



Daniel Díaz Plascencia · Pablo Fidel Mancillas Flores ·
José Roberto Espinoza Prieto

Levaduras de manzana en la dieta de becerros destetados

Levaduras Benéficas en la Alimentación del Ganado Bovino

**Daniel Díaz Plascencia
Pablo Fidel Mancillas Flores
José Roberto Espinoza Prieto**

Levaduras de manzana en la dieta de becerros destetados

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**Daniel Díaz Plascencia
Pablo Fidel Mancillas Flores
José Roberto Espinoza Prieto**

Levaduras de manzana en la dieta de becerros destetados

**Levaduras Benéficas en la Alimentación del
Ganado Bovino**

FOR AUTHOR USE ONLY

Editorial Académica Española

Imprint

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher:

Editorial Académica Española

is a trademark of

Dodo Books Indian Ocean Ltd., member of the OmniScriptum S.R.L

Publishing group

str. A.Russo 15, of. 61, Chisinau-2068, Republic of Moldova Europe

Printed at: see last page

ISBN: 978-620-3-58859-0

Copyright © Daniel Díaz Plascencia, Pablo Fidel Mancillas Flores,
José Roberto Espinoza Prieto

Copyright © 2021 Dodo Books Indian Ocean Ltd., member of the
OmniScriptum S.R.L Publishing group

FOR AUTHOR USE ONLY

**LEVADURAS DE MANZANA EN LA DIETA DE BECERROS DESTETADOS,
SU COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y SALUD ANIMAL**

FOR AUTHOR USE ONLY

RESUMEN GENERAL

Esta investigación consta de tres experimentos cuyo objetivo general fue la evaluación de la inclusión de un inóculo de levaduras (IL) y bagazo de manzana fermentado (BMZN) en la dieta de becerros precozmente destetados y su efecto sobre la digestibilidad *in vitro*, comportamiento productivo y salud animal. En el primer experimento se evaluó el efecto de un IL y BMZN en la dieta de becerros Angus en crecimiento sobre el comportamiento productivo y sistema inmune. Las variables de la prueba de comportamiento se analizaron con un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento, para las variables de sistema inmune se incluyeron como efectos fijos tratamiento y muestreo; y el animal como efecto aleatorio. Los resultados mostraron que el IL mejoró ($P<0.05$) el consumo diario de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA). El BMZN e IL incrementaron ($P<0.05$) la actividad antioxidante (AA). El día 84 de muestreo el T1 (heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado y T2 (HA + EM + concentrado + BMZN) mostraron la mayor ($P<0.05$) concentración de leucocitos (Leu) y linfocitos (Lin). El segundo estudio consistió en evaluar el efecto en la fermentación *in vitro* de dietas con la adición de un IL y BMZN. Para el análisis de las variables de digestibilidad de la fibra se consideró como efecto fijo el tratamiento, mientras que para ácidos grasos volátiles (AGV), N-NH₃, ácido láctico y pH se incluyeron como efectos fijos tratamiento y hora. Los resultados mostraron que la mayor digestibilidad ($P<0.05$) de MS, FDN, FDA y menor contenido de LDA lo presentaron el T2 y T3 (HA + EM + concentrado + IL). Mostrando estos mismos mayor ($P<0.05$) concentración de AGV. El tercer experimento fue evaluar el efecto en la fermentación *in vitro* de dietas para becerros en crecimiento adicionadas con cuatro cepas de levadura. Las variables se analizaron de manera similar al

segundo experimento. La mayor digestibilidad ($P<0.05$) de MS lo presentaron T2 (HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* 2; KI2), T3 (HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* 11; KI11) y T4 (HA + EM + concentrado + *Issatchenkya orientalis* 3; lo3). Este último fue superior ($P<0.05$) en la digestibilidad de FDN, además, el T2 y T3 incrementaron la digestibilidad de FDA, por lo tanto, el menor ($P<0.05$) contenido de LDA lo presentaron T2, T3 y T4. Se concluye que la inclusión de IL en la dieta de becerros en crecimiento, mejora el CDA y CA, y junto con BMZN aumentan la AA. Además, KI2, KI11 e lo3 mejoran el ambiente microbial favoreciendo la digestibilidad de MS, FDN y FDA.

FOR AUTHOR USE ONLY

ABSTRACT

This research consists of three experiments whose overall objective was to evaluate the inclusion of an inoculum of yeast (YI) and fermented apple bagasse (BMZN) in early weaned calves diet on *in vitro* digestibility, productive performance and animal health. The first experiment, the objective was to evaluate the effect of a YI and BMZN added to the diet of growing Angus calves on productive performance and immune system. The variables of the performance test were analyzed with a statistical model that included treatment as a fixed effect, for immune system variables the model included treatment and sampling as fixed effects and animal as random effect. The results showed that YI improved ($P<0.05$) the daily feed intake (DFI) and feed conversion (FC). The BMZN and YI increased ($P<0.05$) the antioxidant activity (AA). At sampling day eighty four the T1 (corn silage (CS) + oat hay (OH) + concentrated) and T2 (CS + OH + concentrated + BMZN) showed the highest concentration of leukocytes (Leu) and lymphocytes (Lin). The second study was performed to evaluate the effect on *in vitro* fermentation of diets added with YI and BMZN. Fiber digestibility variables were analyzed with a model that included treatment as fixed effect volatile fatty acids (VFA), N-NH₃, lactic acid and pH analysis included treatment and time as fixed effects. The results showed that the higher digestibility ($P<0.05$) of DM, NDF, ADF and the lowest content of ADL were presented by T2 (CS + OH + concentrated + BMZN) and T3 (CS + OH + concentrated + YI). This also showed the higher concentration of VFA. The third experiment was performed to evaluate the effect on *in vitro* fermentation of growing calves diets supplemented with four yeast strains. The variables were analyzed with a similar statistical methodology as the second experiment. The higher digestibility ($P<0.05$) of DM was presented by T2 (CS + OH + concentrated +

Kluyveromyces lactis 2; KI2), T3 (CS + OH + concentrated + *Kluyveromyces lactis* 11; KI11) and T4 (CS + OH + concentrated + *Issatchenkya orientalis* 3; Io3). The latter was higher ($P<0.05$) in the NDF, also, T2 and T3 favored digestibility of ADF, therefore, the content of ADL was lower ($P<0.05$) for T2, T3 and T4. We conclude that the inclusion of YI in the diet of growing calves, increased the DFI and FC, and the addition of BMZN increased AA. Furthermore, the strains KI2, KI11 and Io3 microbial environment favoring improved digestibility of DM, NDF and ADF.

FOR AUTHOR USE ONLY

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	ii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE GRÁFICAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Temperatura Ambiental Sobre el Comportamiento Productivo....	3
Probióticos en la Alimentación Animal.....	4
Bagazo de Manzana en la Suplementación Animal.....	5
Cultivos de Levadura en la Nutrición Animal.....	6
Cultivos de Levadura en la Fermentación Ruminal.....	7
Función de la Pared Celular de Levaduras en el Sistema Inmune.....	9
Función de los Microminerales en el Sistema Inmune.....	10
Zinc.....	11
Manganeso.....	12
Cobre.....	12
Actividad Antioxidante.....	14
Biometría Hemática en Rumiantes.....	15
Digestibilidad y Fermentación de los Alimentos en el Rumen.....	16
Producción de Gas y Perfiles de AGV en el Rumen.....	17
LITERATURA CITADA.....	19
ESTUDIO I. INÓCULO DE LEVADURAS Y BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO EN LA DIETA DE BECERROS ANGUS EN CRECIMIENTO SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y	

SISTEMA INMUNE.....	29
RESUMEN.....	30
ABSTRACT.....	32
INTRODUCCIÓN.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Localización del Área de Estudio.....	36
Descripción de los Animales y Tratamientos.....	36
Material Biológico.....	38
Manejo de los Animales.....	39
Toma de Muestras.....	41
Temperatura Ambiental.....	41
Comportamiento Productivo.....	41
Muestras Sanguíneas.....	42
Determinación de minerales en suero.....	42
Medición de la actividad antioxidante en plasma (AA).....	43
Biometría hemática.....	45
Análisis Estadístico.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Temperatura Ambiental.....	46
Prueba de Comportamiento.....	46
Concentración de Minerales en Suero.....	50
Zinc.....	50
Manganeso.....	52
Cobre.....	55
Actividad Antioxidante.....	57
Biometría Hemática.....	58
Leucocitos y linfocitos.....	62

Neutrófilos.....	63
Volumen corpuscular medio.....	64
Hemoglobina corpuscular media.....	65
Plaquetas.....	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
LITERATURA CITADA.....	68
ESTUDIO II. FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DIETAS CON UN INÓCULO DE LEVADURAS Y DE BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO PARA BECERROS EN CRECIMIENTO.....	74
RESUMEN.....	75
ABSTRACT.....	77
INTRODUCCIÓN.....	79
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
Localización del Área de Estudio.....	81
Descripción de los Tratamientos.....	81
Análisis Químico de las Dietas.....	81
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta.....	82
Obtención del Líquido Ruminal.....	83
Producción de Gas <i>in vitro</i>	84
Producción y Perfiles de AGV.....	85
Nitrógeno Amoniacal (N-NH ₃).....	86
Ácido Láctico.....	87
Análisis Estadístico.....	88
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta.....	90
Digestibilidad de la materia seca.....	90
Digestibilidad de la FDN y FDA.....	93

Digestibilidad de la LDA.....	94
Producción de Gas <i>in vitro</i>	94
Parámetros de la Fermentación <i>in vitro</i>	95
Producción y Perfiles de AGV.....	99
Concentración de N-NH ₃ , Ácido Láctico y pH.....	101
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	101
Ácido láctico y pH.....	103
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	105
LITERATURA CITADA.....	106
ESTUDIO III. FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DIETAS PARA BECERROS EN CRECIMIENTO ADICIONADAS CON CUATRO CEPAS DE LEVADURA.....	111
RESUMEN.....	112
ABSTRACT.....	114
INTRODUCCIÓN.....	116
MATERIALES Y MÉTODOS.....	117
Localización del Área de Estudio.....	117
Descripción de los Tratamientos.....	117
Análisis Químico de las Dietas.....	119
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta.....	119
Obtención del Líquido Ruminal.....	120
Producción de Gas <i>in vitro</i>	120
Producción y Perfiles de AGV.....	120
Nitrógeno Amoniacal (N-NH ₃).....	121
Ácido Láctico.....	121
Análisis Estadístico.....	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	124

Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS, FDN, FDA y el Contenido LDA de la Dieta.....	124
Digestibilidad de la materia seca.....	124
Digestibilidad de la FDN y FDA.....	126
Digestibilidad de la LDA.....	127
Producción de Gas <i>in vitro</i>	128
Parámetros de la Fermentación <i>in vitro</i>	130
Producción y Perfiles de AGV.....	132
Concentración de N-NH ₃ , Ácido Láctico y pH.....	134
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	135
Ác. Láctico y pH.....	137
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	139
LITERATURA CITADA.....	140

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición del alimento concentrado por tratamiento.....	37
2	Temperatura ambiental promedio registrada durante el experimento.....	47
3	Medias ($\pm$ EE) del comportamiento productivo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	48
4	Medias ($\pm$ EE) de la concentración de zinc ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	51
5	Medias ($\pm$ EE) de la concentración de manganeso ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	53
6	Medias ($\pm$ EE) de la concentración de cobre ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	56
7	Medias ($\pm$ EE) de la actividad antioxidante ($\mu\text{mol/L FeSO}_4$) en plasma sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	59
8	Medias ($\pm$ EE) de células blancas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	60
9	Medias ($\pm$ EE) de células rojas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes.....	61
10	Medias ($\pm$ EE) de la digestibilidad <i>in vitro</i> de las fracciones de la fibra de dietas conteniendo bagazo de manzana fermentado y un inóculo de levaduras.....	91
11	Parámetros de la degradabilidad ruminal de MS de tres dietas diferentes.....	97
12	Comportamiento en la producción y perfiles de AGV entre tratamientos durante la fermentación <i>in vitro</i>	100
13	Medias ($\pm$ EE) del comportamiento en la concentración de N-NH ₃ , ácido láctico y pH de tratamientos durante la fermentación <i>in vitro</i>	102
14	Diseño de tratamientos para la preparación de los inóculos con las cuatro cepas de levaduras.....	118

15	Digestibilidad <i>in vitro</i> de las fracciones de las fibras entre tratamientos.....	125
16	Parámetros de la digestibilidad ruminal de MS entre tratamientos.....	131
17	Comportamiento en la producción y perfil de AGV entre tratamientos durante la fermentación <i>in vitro</i>	133
18	Comportamiento en la concentración de N-NH ₃ , ácido láctico y pH entre tratamientos durante la fermentación <i>in vitro</i>	136

FOR AUTHOR USE ONLY

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1 Medias ($\pm$ EE) de la producción de gas del T1 (heno de avena, ensilaje de maíz y concentrado), T2 (heno de avena, ensilaje de maíz, concentrado y bagazo de manzana fermentado) y T3 (heno de avena, ensilaje de maíz, concentrado e inóculo de levaduras) durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i>.....	96
2 Medias ($\pm$ EE) de la producción de gas durante la fermentación ruminal <i>in vitro</i> del T1, T2, T3 y T4 conteniendo todos los tratamientos heno de avena, ensilaje de maíz, concentrado y su respectiva cepa de levadura.....	129

FOR AUTHOR USE ONLY

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cuadrícula de un hematocímetro (cámara de Neubauer).....	40

FOR AUTHOR USE ONLY

INTRODUCCIÓN GENERAL

La alimentación es una de las necesidades principales de nuestra población y para satisfacerla se explotan varias especies animales domésticas y silvestres en el mundo, entre las cuales está el ganado bovino por su producción de carne. La ganadería bovina en México representa una de las principales actividades del sector agropecuario, por la contribución que realiza a la oferta de productos cárnicos, así como su participación en las exportaciones de ganado en pie (SIAP, 2012). A nivel nacional se reportaron en el año 2008 un inventario de 23.3 millones de cabezas, 87.3 % dedicadas a la producción de carne y 12.7 % especializadas en la producción de leche, teniendo el Estado de Chihuahua 1.7 millones de cabezas de las cuales 363 mil animales fueron productores de carne (INEGI, 2009).

Los bovinos productores de carne en Chihuahua se orientan a la producción de becerros para exportación, donde típicamente se utilizan dietas basadas en pastos naturales y esquilmos agrícolas limitando la digestibilidad de la fibra y respuesta productiva de los animales (Dado y Allen, 1996). Para mantener la rentabilidad en los diversos tipos de explotaciones pecuarias, los productores de todos los sectores están buscando diferentes opciones para reducir los costos de producción (Gunn *et al.*, 2010). Siendo el bagazo de manzana fermentado una alternativa como suplemento protéico que puede sustituir parte de los ingredientes en la dieta de rumiantes, con incrementos en la producción láctea (Gutiérrez, 2007) y beneficios en la salud animal (Gallegos, 2007). Aunado a ello está el efecto de los cultivos de levaduras los cuales son ricos en vitaminas del complejo B, minerales y diversos tipos de aminoácidos

(van der Peet- Schwering *et al.*, 2007) y como consecuencia, estimulan la absorción de nutrientes creando un ambiente intestinal saludable y a la vez un mejor sistema inmune (Czarnecki-Maulden, 2008).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de levadura y del bagazo de manzana fermentado en la dieta de becerros Angus sobre: 1) comportamiento productivo y función inmune, 2) digestibilidad *in vitro* de las tres dietas ofrecidas a becerros Angus, 3) digestibilidad *in vitro* de la fibra utilizando cuatro cepas de levaduras diferentes.

FOR AUTHOR USE ONLY

REVISIÓN DE LITERATURA

Temperatura Ambiental Sobre el Comportamiento Productivo

La temperatura ambiental es una de las variables más investigada y al mismo tiempo la más utilizada como indicador de estrés. Mujibi *et al.* (2010) mencionaron que los efectos de la temperatura ambiente sobre el rendimiento de los animales han sido estudiados ampliamente en el ganado bovino, ya que los rumiantes dentro de su capacidad genética y fisiológica se ajustan continuamente para enfrentar los cambios ambientales (Young *et al.*, 1989).

Arias *et al.* (2008) indicaron que animales adaptados al medioambiente en el que viven, experimentan estrés debido a las oscilaciones en las temperaturas o por una combinación de factores negativos a los que se someten durante un corto período de tiempo, enfrentándolo a través de modificaciones fisiológicas y de comportamiento. Por ende, en la mayoría de los casos la respuesta revela cambios en los requerimientos de nutrientes, siendo las necesidades de agua y la energía los más afectados cuando el ganado se encuentra fuera de la zona termo-neutral (Conrad, 1985). Arias *et al.* (2008) demostraron que los cambios en los requerimientos, así como las estrategias adoptadas por los animales para enfrentar el periodo de estrés, resultan en una disminución en su desempeño productivo. Como parte del comportamiento de aclimatación del animal, el consumo de materia seca (CMS) y el consumo diario de agua son directamente afectados, ya que ambos se relacionan con el balance térmico e impactan la regulación de la temperatura corporal (Finch, 1986). Collin *et al.* (2001) encontraron que en los animales dentro de su zona de termoneutralidad, la energía de la dieta es utilizada para mantenimiento, crecimiento, producción y actividad física; mientras que abajo o arriba de esta zona la energía es reorientada a funciones para

mantener la condición homeotérmica y en algunos casos puede existir un aumento en la demanda de energía para estos procesos.

Probióticos en la Alimentación Animal

La dieta juega un rol importante en la salud animal y humana. En años recientes, se ha dedicado especial atención a la producción de alimentos funcionales, teniendo como objetivo adicionar microorganismos o compuestos benéficos dentro del organismo a través del consumo diario de la dieta (Di Criscio *et al.*, 2010).

Los probióticos han mostrado resultados prometedores en varias áreas de producción animal. Un probiótico se define como un cultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos que benefician al hombre o animales mejorando las propiedades de la microflora autóctona del intestino (Champagne *et al.*, 2005). En otro estudio, se mencionó que los probióticos son microorganismos viables y benéficos para el huésped cuando son consumidos en cantidades apropiadas, lo que se traduce en una mejor producción y salud (Rook y Burnet, 2005). Los beneficios incluyen la inhibición de bacterias patógenas, reducción de niveles de colesterol en suero, diarrea y cáncer intestinal; mejoran la tolerancia a la lactosa, absorción de calcio, síntesis de vitaminas y estimulan el sistema inmune (Sánchez *et al.*, 2009). Bontempo *et al.* (2006) sugirieron posibles mecanismos que exhiben el papel benéfico en el animal, indicando la colonización y adhesión en la mucosa intestinal (competencia por receptores), competencia por nutrientes, producción de sustancias antimicrobiales y la estimulación de la mucosa y Sistema inmune. Las levaduras como probióticos están ganando popularidad en los sistemas de engorda, ya que son resistentes y con una alta viabilidad en condiciones ambientales adversas. Comitini *et al.* (2005) reportaron que las levaduras ejercen actividad inhibitoria sobre diferentes cepas de bacterias

patógenas, desarrollando una actividad bactericida o bacteriostática debido a ciertos compuestos metabólicos producidos por las mismas. Stephens *et al.* (2007) mencionaron que corderos alimentados con probióticos disminuyeron la excreción de *Escherichia coli* O157:H7, los mismos autores publicaron que la suplementación microbial directa en el alimento también redujo la cantidad de *Salmonella ssp.* en bovinos productores de carne. La utilización de varias especies de probióticos favorecen el incrementado de la ganancia diaria de peso (GDP) y eficiencia alimenticia de corderos y bovinos en engorda durante el periodo inicial de la alimentación (Lema *et al.*, 2001).

Bagazo de Manzana en la Suplementación Animal

Manterola *et al.* (1999) describieron que el bagazo de manzana es el residuo del proceso de extracción de jugo de manzana y representa entre 15 y 20 % de la fruta procesada. Desde tiempo, se ha incrementado el interés sobre el uso de bagazo de manzana en la dieta de bovinos; y como la mayoría de los alimentos, la utilidad de este subproducto en la alimentación de rumiantes depende de los procesos de fermentación en el rumen (Rumsey, 1978). El bagazo de manzana es equivalente al silo de maíz en el contenido de nutrientes digestibles totales, deficiente en proteína digestible y alto en pectinas, pentosanos y extracto de éter que la mayoría de los alimentos comunes (NAS, 1971). Sunvold *et al.* (1995) mencionaron que existe poca información sobre la fermentación de la fibra de vegetales y frutas. Sin embargo, existe evidencia que la fibra de frutas y vegetales contienen varios compuestos bioactivos (flavonoides y carotenoides) lo que aumenta su valor nutricional en alimentos para perros (Swanson *et al.*, 2001). Saura-Calixto y Larrauri (1996) demostraron que la fibra de frutas y vegetales contienen una cantidad balanceada de fibra soluble e insoluble, que

promueve la salud gastrointestinal. Existe evidencia que el subproducto de manzana puede adicionarse en dietas de vacas productoras de leche (12 a 15 L/d) hasta en un 40 % de la materia seca de la ración (Edwards y Parker, 1995). Otros investigadores reportaron que, al suplementar vacas productoras de leche con bagazo de manzana, incrementaron la producción de 5.9 a 9 % y aumentaron el contenido de grasa y proteína (Anrique y Dossow, 2003). Rodríguez *et al.* (2006) encontraron que becerros alimentados con bloques multinutricionales elaborados con 14.6 % de manzanina, pueden tener ganancias diarias de 0.570 kg d. Por otra parte, Gutiérrez (2007) reportó que el subproducto de manzana fermentado puede sustituir parte de los ingredientes utilizados en la alimentación de vacas productoras de leche, teniendo rendimientos positivos en la producción y salud animal (Gallegos, 2007) debido a sus características físico químicas.

Cultivos de Levadura en la Nutrición Animal

Una gran variedad de aditivos alimenticios que manipulan la actividad del rumen están disponibles en el mercado. Los rumiantes establecen una simbiosis con los microorganismos ruminales, mediante la cual aportan nutrientes y un medio ruminal adecuado para la supervivencia de los microorganismos mejorando la fermentación de los alimentos, incrementando la capacidad de utilizar la fibra y proteína microbiana sintetizada en el rumen, lo que constituye la fuente principal de energía y proteína (Calsamiglia *et al.*, 2005). Desnoyers *et al.* (2009) demostraron en una recopilación de 157 experimentos que la suplementación con levaduras incrementó el consumo de alimento, producción de leche, pH ruminal, ácidos grasos volátiles (AGV) en rumen y la digestibilidad de materia orgánica; así mismo, el efecto de levaduras fue mejorado cuando los animales consumieron dietas con alta proporción de concentrado. Estos

mismos resultados, sugirieron que las levaduras limitan la disminución de pH ruminal típicamente asociado con un incremento en la concentración de AGV y reducción de ácido láctico, produciendo mayor capacidad buffer. Ingvarsen (2006) reportó diferentes estrategias nutricionales para ayudar a incrementar el consumo de materia seca (CMS) y evitar al máximo el balance energético negativo durante las primeras semanas de lactación en ganado productor de leche. Sin embargo, muchos de estos estudios se han realizado en novillos y vacas secas fistuladas o *in vitro* (Al Ibrahim *et al.*, 2010). Estos mismos autores, mencionaron que numerosos productos comerciales están disponibles, variando ampliamente en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), viabilidad y número de células presentes. Algunas cepas de Sc han favorecido el establecimiento de las bacterias celulolíticas en el tracto digestivo de corderos, acelerando la actividad microbial en el rumen, favoreciendo potencialmente el cambio de una dieta líquida a una sólida en animals prerumiantes (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2001). Por otra parte, Davis y Drackley (1998) mencionaron que a medida que el becerro joven madura y cambia de una dieta líquida a una dieta a base de grano y forraje, el riesgo a diarrea tiende a disminuir.

Cultivos de Levadura en la Fermentación Ruminal

La inclusión de Sc en el alimento resulta en un aumento en el número total de bacterias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*), tanto *in vitro* como *in vivo* (Lila *et al.*, 2004). En otro estudio, Chaucheyras *et al.* (1995) observaron la estimulación del crecimiento del hongo *Neocallimastix frontalis*.

Los mismos autores reportaron que Sc parece estimular la utilización de lactato por *Megasphaera elsdenii* y *Staphylococcus ruminantium* propiciando un aumento en la síntesis de propionato (Lila *et al.*, 2004). Estos últimos autores reportaron que la disminución del nivel de ácido láctico resulta en un incremento del pH ruminal favoreciendo el crecimiento de las bacterias celulolíticas, provocando un incremento en la digestión de la fibra y en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). Por otra parte, el efecto de Sc sobre la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) es muy variable, y se ha observado tanto una reducción como un incremento (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2001).

Calsamiglia *et al.* (2005) han reportado evidencia del efecto de las levaduras sobre la fermentación ruminal, mencionando que las levaduras y sus medios de cultivos pueden contener nutrientes (ácidos orgánicos, vitaminas del grupo B, enzimas, aminoácidos, etc.) que estimulan el crecimiento de las bacterias que digieren la celulosa y utilizan el ácido láctico. Estos mismos autores reportaron que las levaduras vivas mediante su acción de respiración, consumen el oxígeno residual disponible en el medio ruminal, protegiendo a las bacterias anaeróbicas estrictas. Newbold *et al.* (1996) compararon varias cepas de Sc y observaron una fuerte correlación entre la capacidad de las levaduras de consumir oxígeno y el crecimiento bacteriano, lo que les permitió concluir que el efecto de estimulación de Sc sobre las bacterias ruminales podría atribuirse, al menos parcialmente, a su actividad respiratoria.

En otro estudio, Yoon y Stern (1996) reportaron un mecanismo de acción para levaduras y hongos mediante el cual el aumento del pH ruminal y la reducción de la disponibilidad de oxígeno estimulan el incremento del crecimiento de las bacterias

celulolíticas y, por ende, se mejora la degradabilidad de la fibra, disminuye el llenado ruminal, aumenta la ingestión de materia seca e incrementa la producción, sin que mejore necesariamente la eficacia de utilización de nutrientes. Chung *et al.* (2011) publicaron que la levadura también tiene un potencial de incrementar el proceso de fermentación en el rumen de manera que disminuya la formación de gas metano (CH₄). En otro estudio propusieron que, a través de una selección de cepas, puede ser posible desarrollar un producto de levadura comercial que disminuya la producción de CH₄ mientras minimiza la acidosis ruminal y promueva la digestión de la fibra y fermentación ruminal (Newbold y Rode, 2006).

Función de la Pared Celular de Levaduras en el Sistema Inmune

La pared celular de las levaduras contiene mananoligosacáridos (MOS) que pueden actuar como receptores de alta afinidad compitiendo con los sitios de unión con las bacterias gram negativas, las cuales poseen fimbrias específicas de manosa tipo 1 (Ofek *et al.*, 1977), eliminando patógenos del sistema digestivo y evitando la colonización y fijación del patógeno a la mucosa (Nocek *et al.*, 2011). Ferket (2003) mencionó que este beneficio puede provocar una respuesta antigénica importante, mejorando así la inmunidad humoral contra patógenos específicos a través de la presencia de antígenos a las células inmune atenuada, además, este proceso puede suprimir la respuesta inmune proinflamatoria, la cual es perjudicial para el comportamiento productivo. Otro componente predominante de la pared celular de levaduras, es el β -1,3/1,6-glucano (β -glucano), el cual a mostrado tener efecto inmunomodulatorio cuando las levaduras se usaron como suplementos en dietas para aves (Chae *et al.*, 2006), cerdos (Li *et al.*, 2006) y animales acuáticos (Dalmo y Bogwald, 2008).

Pocos estudios han investigado el uso de los componentes de la pared celular de levaduras sobre la función inmune en ganado lechero (Nocek *et al.*, 2011). Sin embargo, Franklin *et al.* (2005) observaron que la suplementación de vacas secas con MOS mejoró la respuesta inmune humoral contra rotavirus e incrementaron la transferencia de anticuerpos para sus crías. Reed y Nagodawithana (1991) publicaron que los oligosacáridos presentes en la pared celular de *Sc* tales como glucanos y mananos mejoran el sistema inmune e influyen en la interacción patógeno-huésped en el tracto digestivo de animales y humanos. Animales de laboratorio, que consumieron glucanos de avena mejoraron la función de neutrófilos incrementando la defensa contra patógenos (Murphy *et al.*, 2007). Esto puede ser particularmente importante en becerros jóvenes, que son comúnmente afectados por protozoarios, virus y bacterias que causan enfermedades del tracto digestivo y algunos otros que pueden dar lugar a infecciones sistémicas (Magalhães *et al.*, 2008). Así mismo, productos solubles de cultivos de levaduras inhiben la actividad y crecimiento microbiano y modulan el sistema inmune (Jensen *et al.*, 2008).

Función de los Microminerales en el Sistema Inmune

Los minerales traza (MT) tales como el cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn) y cobalto (Co) son importantes para el correcto crecimiento, reproducción y respuesta inmune (Dorton *et al.*, 2007), y en muchos procesos fisiológicos de los animales (Spolders, 2007). Sin embargo, el impacto de la suplementación de MT sobre la inmunidad en rumiantes ha sido variable (Spears, 2000). Este mismo autor mencionó que la suplementación de oligoelementos se centró en un principio en prevenir signos clínicos de deficiencia y la disminución de la producción, pero el rol de estos elementos en la inmunidad ha sido enfatizado en estudios más recientes.

La concentración de Zn y Cu en suero están influenciados por muchos factores, tales como el tiempo de muestreo y el animal (Spolders *et al.*, 2010). Por otro lado, en los componentes de la sangre pueden influir muchos factores externos (clima, estación del año y hora del día) y factores internos tales como la raza, edad y etapa de lactación (McDowell, 2003).

Las deficiencias de MT resultan en un daño en la tasa de crecimiento (Blackmon *et al.*, 1967), dificultades al parto (James *et al.*, 1987), y disminución en la producción de células T, células B, neutrófilos y macrófagos, propiciando un incremento en la susceptibilidad a infecciones (Chandra, 1999).

Zinc. Es un microelemento esencial para el buen funcionamiento de las células, también ha sido identificado como un componente estructural, catalítico o regulador de más de 200 enzimas involucradas en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Vallee y Auld, 1990), siendo esencial para la integridad del sistema inmune (Hambridge *et al.*, 1986), aunque su rol específico sobre la respuesta inmune no está muy claro. Así mismo, Murray *et al.* (2000) mencionaron que es un componente estructural de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que ayuda a eliminar radicales libres producto de varios procesos en el cuerpo. Por otro lado, la función protectora de Zn contra la formación de radicales libres y estrés oxidativo, ha dado lugar a estudios sobre el efecto antioxidante de Zn y su participación en el sistema de defensa antioxidante (de Oliveira *et al.*, 2009). Al considerar la gran variedad de enzimas que contienen Zn (lactato dehidrogenasa, fosfatasa alcalina, alcohol dehidrogenasa, anhidrasa carbónica, superóxido dismutasa, carboxipeptidasas, málico dehidrogenasa, etc.) resulta fácil suponer las graves consecuencias que ocasiona una deficiencia celular de Zn (Kirchgessner *et al.*, 1993).

Hambridge *et al.* (1986) publicaron que una deficiencia de Zn, daña la función inmune a través de una reducción en la función de células T, así como una disminución en la función de muchos componentes claves del sistema inmune (timo y neutrófilos). Cymbaluk *et al.* (1986) mencionaron que altas concentraciones de Zn obstaculizan la utilización de Cu y van acompañados de cojeras, anomalías óseas y puede producir anemia (De Auer y Seawright, 1988).

Manganeso. Es otro antagonista potencial del Cu, por lo tanto, ingredientes con alto contenido de Mn en la dieta pueden tener impacto negativo en la absorción de Cu (Hansen *et al.*, 2009). Grace (1994) publicó que la concentración de Mn de algunos forrajes puede contener más de 100 mg/kg de MS, mientras que el contenido de Cu es típicamente bajo. El papel antagónico del Mn sobre el Cu es limitado, sin embargo, estudios con ratas han mostrado una interacción complicada entre el efecto de Mn en la dieta (10 a 50 mg/kg de MS) y Cu (<1 a 6 mg/kg de MS) sobre índices de niveles de hierro (Fe) en suero sanguíneo (Reeves *et al.*, 2004). Hidiroglow (1979) menciona que el Mn se absorbe pobremente (1% o menos) en dietas de rumiantes. En otro estudio, mencionaron que los factores dietéticos que pueden influir en la biodisponibilidad de Mn han recibido poca atención, probablemente porque la deficiencia no es considerada como problema principal en rumiantes (van Bruwaene *et al.*, 1984). Por otro lado, la limitada evidencia sugiere que dietas altas en calcio y fósforo puede reducir la biodisponibilidad de Mn (Hidiroglow, 1979).

Cobre. Es un elemento esencial en la nutrición animal, y participa en muchos procesos biológicos del organismo, la mayoría relacionados con actividades enzimáticas (Grace, 1994). Así mismo, Swenson y Reece (1993) publicaron que forma parte integral del sistema citocromo, de enzimas Cu- superóxido dismutasa (CuSOD),

CuZn-superóxido dismutasa (CuZnSOD), ceruloplasmina (Cp), citocromo oxidasa, tirosinasa (polifelin oxidasa), ácido ascórbico oxidasa, monoamina oxidasa plasmática. Spears (2000) mencionó que en bovinos y otras especies se ha documentado que el Cu ejerce efecto sobre el sistema inmune. En otro estudio, se encontró que la habilidad fagocítica de neutrófilos se incrementó al doble cuando administraron Cu a terneros con deficiencia (Jones y Suttle, 1981). Prohaska y Failla (1993) reportaron que la inmunidad humoral y células mediadoras fueron dramáticamente disminuidas en ratas y ratones con deficiencia de Cu. Así también, la respuesta inmune humoral de novillos en crecimiento fue mejorada cuando fueron inyectados con 90 mg de Cu antes del destete y alimentados con 7.5 mg Cu/kg de MS durante la fase de crecimiento (Ward y Spears, 1999).

La deficiencia de Cu en bovinos es un desorden bastante común en todo el mundo y sus dietas son regularmente altas en la concentración de Cu (arriba de 35 mg/kg de MS), el máximo nivel de suplementación de Cu para ganado lo estableció la Unión Europea (Council Regulation (EC) No. 1334/2003/EC), muy por encima de los requerimientos fisiológicos generales (10 mg/kg MS; NRC, 1996). Kendall *et al.* (2001) comentaron que el margen relativamente amplio en la suplementación de Cu es porque en bovinos, y en rumiantes en general, los requerimientos nutricionales no dependen exclusivamente de la concentración de Cu en la dieta, si no que estriban altamente de la suplementación y disponibilidad del Cu, lo cual justifica la interferencia con antagonistas, principalmente molibdeno (Mo), azufre (S), hierro (Fe) y Zn. Hansen *et al.* (2009) publicaron que la deficiencia de Cu en ganado productor de carne, puede presentarse en forma de una disminución de crecimiento, despigmentación del pelo y anemia.

Este signo puede ser explicado por la reducida actividad de cuproenzimas tales como citocromo c oxidasa, tirosinasa y ceruloplasmina, que son importantes en la producción de energía, melanina y metabolismo de Fe, respectivamente (NRC, 1996).

Actividad Antioxidante

La nutrición tiene un gran efecto sobre la salud y la inmunidad en los animales, las deficiencias nutricionales perjudican la respuesta inmune y por lo tanto, incrementan la morbilidad y mortalidad (Chew, 1995). Este mismo autor mencionó que los antioxidantes sirven para estabilizar los radicales libres altamente reactivos, por lo que mantienen la integridad funcional y estructural de las células. Los antioxidantes han sido agrupados en enzimáticos y no enzimáticos, y son las sustancias capaces de controlar en el organismo la producción de radicales libres (RL) que se generan como consecuencia del metabolismo aerobio, ya sea secuestrando RL o estabilizándolos (Halliwell y Whiteman, 2004). Tremellen (2008) mencionó que para contrarrestar los RL existe en primera instancia el sistema antioxidante enzimático, que incluye la seleno-enzima glutatión peroxidasa (GPx) que actúa fundamentalmente reduciendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y la SOD que actúa sobre el anión superóxido (O_2^-) transformándolo en un radical secundario (H_2O_2) para una posterior acción de la GPx.

La mayoría de las moléculas presentes en el organismo son químicamente estables, es decir, tienen un número par de electrones en su orbital externo, pero existen otras cuyo número de electrones es impar, estas sustancias químicas altamente inestables y reactivas se conocen como radicales libres (Barquinero, 1992). Halliwell (1992) reportó que cuando un radical interactúa con una sustancia estable, toma de ella un electrón cargando positivamente la molécula; así el compuesto estable se convierte en un radical libre altamente agresivo, pudiendo generar más radicales,

dando lugar a una reacción en cadena. Por otra parte, el oxígeno aun siendo esencial para la vida, también es tóxico por ser una sustancia oxidante ya que puede aceptar electrones desestabilizando a la molécula que lo pierde, por tanto, en el metabolismo aerobio se producen oxidantes denominados metabolitos oxigenados reactivos, entre los que se encuentra el O_2 , hidróxido (OH) y H_2O_2 (Ceballos *et al.*, 1998).

El confinamiento y el estrés calórico pueden contribuir a incrementar los requerimientos de antioxidante en los animales. Por lo que se ha motivado en realizar estudios en los que se ofrecen suplementos antioxidantes a los animales, en la dieta o en forma parenteral, observándose que la suplementación mejora la respuesta inmune y disminuye el estrés oxidativo, provocando una mayor resistencia a enfermedades infecciosas y degenerativas (Chew, 1995). Así mismo, González-San José *et al.* (2001) publicaron que a medida que un individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, lo que hace de interés la necesidad de ingerir alimentos con antioxidantes para disminuirlos. En otro estudio, mencionaron que la vitamina E es un antioxidante fenólico lipídico soluble; por lo que su actividad antioxidante se basa en la habilidad de donar un átomo de hidrógeno a radicales libres (Yurttaş *et al.*, 2000).

Biometría Hemática en Rumiantes

En la práctica clínica de la Medicina Veterinaria los parámetros de los valores de biometría hemática (BH) son una ayuda diagnóstica fundamental en el análisis y orientación del estado clínico de un animal y en el seguimiento de un determinado hato; esta información es útil en los casos de control, valoración de procesos de estabilidad enzoótica y el estado nutricional de los animales. Así mismo, la BH es un examen de ayuda diagnóstica que en la evaluación clínica permite tomar decisiones profilácticas y curativas. Barrio *et al.* (2003) mencionaron que la BH es la evaluación numérica y

descriptiva de los elementos celulares de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas); constituyendo una de las pruebas más solicitadas en el laboratorio clínico, ya que acompaña casi todos los protocolos de diagnóstico con precisión, exactitud y rapidez.

Los componentes celulares sanguíneos, transportan oxígeno (glóbulos rojos o eritrocitos), protegen de organismos extraños y antígenos (glóbulos blancos o leucocitos), fagocitando, capturando o destruyéndolos, e inician la coagulación (Aiello y Mays, 2000). Estos mismos autores, mencionaron que las células sanguíneas se dividen en leucocitos (fagocitos y linfocitos); los fagocitos se subdividen en monocitos (mononucleares) y granulocitos (polimorfonucleares), así mismo, estos últimos se subdividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Por otro lado, los linfocitos son glóbulos blancos responsables de la inmunidad humoral y celular, su producción se origina en la médula ósea. En otro estudio, Aiello y Mays (2000) reportaron que los análisis hematológicos muestran las cantidades de los elementos celulares; su evaluación permite determinar problemas de salud, inflamación de tejidos o funciones proliferativas de la médula ósea.

Digestibilidad y Fermentación de los Alimentos en el Rumen

Por algunos años, los microbiólogos y nutriólogos de rumiantes se han interesado en la manipulación del ecosistema microbial del rumen para mejorar la eficiencia en producción (Callaway y Martin, 1997). La adición de extractos de *Aspergillus oryzae* y cultivos de *Sc* en la dieta de rumiantes mejoran la digestibilidad de MS, proteína cruda (PC) y hemicelulosa; aumentando el número de bacterias en el rumen, disminuyendo la concentración de lactato e incrementado la producción de leche en vacas frescas (Gomez-Alarcon *et al.*, 1990). Sin embargo, la

respuesta a la suplementación con cultivos de levaduras u hongos han sido variables (Martin y Nisbet, 1992). Estudios previos (Newbold *et al.*, 1996) han mostrado que el cultivo de levadura incrementa el número de bacterias celulolíticas en el rumen, y en algunos casos incrementan la degradación de celulosa. Por otra parte, los microorganismos que se adhieren a la digesta, representan más del 75 % de la microflora total del rumen, y Sc estimula el crecimiento principalmente de *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens* siendo las más activas en la degradación de la fibra (Chaucheyras- Duran y Fonty, 2001). Así también, otros autores han utilizado la levadura Sc como aditivo en dietas fibrosas para rumiantes produciendo mejoras en la eficiencia de utilización y disponibilidad de los nutrientes (Newbold *et al.*, 1998) e incrementos en la digestión ruminal de la MS, materia orgánica y FDN, tanto *in vivo* como *in vitro*, así también, en la degradabilidad de FDA y nitrógeno (Biricik y Turkman, 2001).

Producción de Gas y Perfiles de AGV en el Rumen

Se conoce que la cuantificación de la producción de gas en fermentaciones *in vitro* se utiliza para determinar la digestibilidad y la cinética de la fermentación ruminal de los alimentos (Theodorou *et al.* 1994), lo que unido a las ecuaciones de regresión múltiple y los componentes nutricionales del sustrato (Noguera *et al.*, 2004) propician con bastante precisión la estimación de la degradabilidad *in vivo* y la digestibilidad aparente de la MS de forrajes (Blümmel *et al.*, 1997); ajustando los perfiles acumulados de gas a una ecuación apropiada que permita resumir la información cinética (Groot *et al.*, 1996).

Por otro lado, la energía para el crecimiento microbiano se deriva de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce AGV, succinato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO_2), CH_4 y trazas de hidrógeno (H_2); sin embargo, estos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Opatpatanakit *et al.*, 1994). En otro estudio (Getachew *et al.*, 1998) reportaron que la producción de gas es generada principalmente cuando el sustrato es fermentado hasta acetato y butirato, produciéndose propionato únicamente desde la neutralización del ácido y, por consiguiente, es de menor cantidad. Por otra parte, los microorganismos ruminales son muy sensibles a cambios en el pH y la mayoría prefieren un rango entre 6.5 a 6.8. Grant y Mertens (1992) comentaron que las bacterias celulolíticas, en particular, son más sensibles a bajos pH que las amilolíticas. Así mismo, Hoover *et al.* (1984) demostraron que un pH alto (7.5) o bajo (5.5) compromete severamente la digestión de la fibra.

Noguera *et al.* (2004) reportaron que la técnica de producción de gas permite detectar diferencias entre sustratos generados por su madurez, condiciones de crecimiento, especie o cultivo y métodos de preservación. De la misma manera ha sido usada para determinar diferencias en la fermentación de los residuos de cosechas sometidos a diversos tratamientos químicos o físicos (Williams, 2000).

LITERATURA CITADA

- Aiello, S. E. y A. Mays. 2000. El Manual Merck de Veterinaria. 5ta ed. Océano Grupo Editorial, S. A. España.
- Al Ibrahim, R. M., A. K. Kelly, L. O'Grady, V. P. Gath, C. McCarney y F. J. Mulligan. 2010. The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, and rumen fermentation of dairy cows in early lactation. J. Dairy Sci. 93:5318-5328.
- Anrique, G. R. y C. C. Dossow. 2003. Efecto de la pulpa de manzana ensilada en la ración de vacas lecheras sobre el consumo, la tasa de sustitución y la producción de leche. Arch. Med. Vet. 35:13-22.
- Arias, R. A., T. L. Mader y P. C. Escobar. 2008. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. Arch. Med. Vet. 40:7-22.
- Barquinero, J. 1992. Los Radicales Libres: Una Amenaza para la Salud. En: Crystal, R. G. y J. R. Ramon. 1992. Sistema GSH. Glutación: Eje de la Defensa Antioxidante. Excerpta Médica. Medical Communications B. V., Amsterdam. Reino de los Países Bajos.
- Barrio, M., M. C. Correa y M. E. Jiménez. 2003. El hemograma: análisis e interpretación de valores sanguíneos. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia.
- Biricik, H. y I. I. Turkmen. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber of different forage: concentrate ratios in diets. Veteriner Fakultesi Dergisi, Uludag University. 20:29-37.
- Blackmon, D. M., W. J. Miller y J. D. Morton. 1967. Zinc deficiency in ruminants, occurrence, effects, diagnosis, and treatments. Vet. Med. 62:265-272.
- Blümmel, M., H. P. S. Makkar y K. Becker. 1997. *In vitro* gas production: A technique revisited. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 77:24-34.
- Bontempo, V., A. Giancamillo, G. Savoini, V. Dell'Orto y C. Domeneghini. 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspect and growth in weaning piglet. Anim. Feed Sci. Technol. 129:224-236.
- Callaway, E. S. y S. A. Martin, 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J. Dairy Sci. 80:2035-2044.

- Calsamiglia, S., L. Castillejos y M. Busquet. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. Página 161 en Memoria XXI del curso de especialización FEDNA. Barcelona. España.
- Ceballos, A., F. Wittwer, P. A. Contreras y T. M. Böhmwald. 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según y época del año. Arch. Med. Vet. 30:13-22.
- Chae, B. J., J. D. Lohakare, W. K. Moon, S. L. Lee, Y. H. Park y T. W. Hahn. 2006. Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers. Res. Vet. Sci. 80:291-298.
- Champagne, C. P., N. J. Gardner y D. Roy. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:61-84.
- Chandra, R. K. 1999. Nutrition and immunology: From the clinic to cellular biology and back again. Proc. Nutr. Soc. 58:681-683.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin y P. Gouet. 1995. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an *Archaea methanogen* is stimulated by a probiotic strain. Appl. Environ. Microbiol. 61:3466-3467.
- Chaucheyras-Durand, F. y G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. Reprod. Nutr. Dev. 41:57-68.
- Chew, B. P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. J. Nutr. 125:1804-1808.
- Chung, Y. H., N. D. Walker, S. M. McGinn y K. A. Beauchemin. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. J. Dairy Sci. 94:2431-2439.
- Collin, A., J. Van Milgen, S. Dubois y J. Noblet. 2001. Effect of high temperature on feeding behavior and heat production in group-housed young pigs. Br. J. Nutr. 86:63-70.
- Comitini, F., R. Ferretti, F. Clementi, I. Mannazzu y M. Ciani. 2005. Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and malonic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compounds active against *Oenococcus oeni*. J. Appl. Microbiol. 99:105-111

- Conrad, J. H. 1985. Feeding of farm animals in hot and cold environments. In: Yoursef MK 5ta ed. Stress Physiology in Livestock Volumen II Ungulates. CRC Press Boca Raton, Florida, E. U. A.
- Council Regulation (EC) No 1334/2003/EC on amending the conditions for authorization of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. Off. J. Eur. Union.
- Cymbaluk, N. F., F. M. Bristol y D. A. Christensen. 1986. Influence of age and breed of equid on plasma copper and zinc concentrations. Am. J. Vet. Res. 47:192-195.
- Czarnecki-Maulden, G. L. 2008. Effect of dietary modulation of the intestinal microbiota on reproduction and early growth. Theriogenology. 70:286-290.
- Dado, R. G. y Allen M. S. 1996. Enhanced intake and production of cow offered ensiled alfalfa with higher neutral detergent fiber digestibility. J. Dairy Sci. 79:418-428.
- Dalmo, R. A. y J. Bogwald. 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. Fish Shellfish Immunol. 25:384-396.
- Davis, C. L. y J. K. Drackley. 1998. The Development, Nutrition and Management of the Young Calf. Iowa State Press. Ames. Iowa. E. U. A.
- De Auer, J. C. y A. A. Seawright. 1988. Assessment of copper and zinc status of farm horses and training thoroughbreds in south-east Queensland. Aust. Vet. J. 65:317-320.
- de Oliveira K. J., C. M. Donangelo, A. V. de Oliveira, Jr., C. L. de Silveira y J. C. Koury. 2009. Effect of zinc supplementation on the antioxidant, copper, and iron status of physically active adolescents. Cell Biochem. Funct. 27:162-166.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter y D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92:1620-1632.
- Di Criscio, T., A. Fratianni, R. Mignogna, L. Cinquanta, R. Coppola, E. Sorrentino y G. Panfili. 2010. Production of functional probiotic, prebiotic and synbiotic ice creams. J. Dairy Sci. 93:4555-4564.

- Dorton, K. L., T. E. Engle, R. M. Enns y J. J. Wagner. 2007. Effects of trace mineral supplementation, source, and growth implants on immune response of growing and finishing feedlot steers. *The Professional Animal Scientist*. 23:29-35.
- Edwards, J. y W. Parker. 1995. Apple pomace as a supplement to pasture for dairy cows in late lactation. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 55:67-69.
- Ferket, P. R. 2003. Controlling gut Health with the Use of Antibiotics. Pag. 57-68 in *Proc. 30th Annu. Carolina Poult. Nutr. Conf.*, Research Triangle Park, NC. North Carolina State University, Raleigh. E. U. A.
- Finch, V. A. 1986. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *J. Anim. Sci.* 62:531-542.
- Franklin, S. T., M. C. Newman, K. E. Newman y K. I. Meek. 2005. Immune parameters of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. *J. Dairy Sci.* 88:766-775.
- Gallegos, A. M. A. 2007. Conteo de células somáticas en leche, actividad antioxidante del plasma y componentes celulares sanguíneos de vacas Holstein en producción alimentadas con manzanarina en la dieta. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chihuahua, Chih. Mex.
- Getachew, G., M. Blümmel, H. P. Makkar y K. Becker. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72:261-281.
- Gomez-Alarcon, R. A., C. Dudas y J. T. Huber. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.* 73:703-710.
- González-San José, M. L., R. P. Muñiz y V. B. Valls. 2001. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información cerveza y salud. Departamento de biotecnología y ciencia de los alimentos. Universidad de Burgos. Departamento de pediatría, ginecología y obstetricia. Universidad de Valencia. España.
- Grace, N. 1994. Managing Trace Element Deficiencies. New Zealand: AgResearch, New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Ltd. New Zealand.
- Grant, R. J. y D. R. Mertens. 1992. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 75:1581-1587.

- Groot, J. C., J. W. Cone, B. A. Williams, F. M. Debersaques y E. A. Lantinga. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:77-89.
- Gunn, P. J., M. K. Neary, R. P. Lemenager y S. L. Lake. 2010. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. *J. Anim. Sci.* 88:1771-1776.
- Gutiérrez, P. F. J. 2007. Efecto de manzanarina sobre los componentes fisicoquímicos y producción de leche. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. Mex.
- Halliwell, B. 1992. Especies Reactivas de Oxígeno en los Seres Vivos: Procedencia, Bioquímica y Papel Patógeno en el Hombre. En: Cristal, R. G. y J. R. Ramon, 1992. Sistema GSH. Glutación: Eje de la Defensa Antioxidante. Excerpta Médica. Medical Communications B. V., Amsterdam. Reino de los Países Bajos.
- Halliwell, B. y M. Whiteman. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231-255.
- Hambridge, K. M., C. E. Casey y N. F. Krebs. 1986. Zinc. In trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. Walter Mertz. Academic press, Inc., London. U. K.
- Hansen, S. L., M. S. Ashwell, L. R. Legleiter, R. S. Fry, K. E. Lloyd y J. W. Spears. 2009. The addition of high manganese to a copper-deficient diet further depresses copper status and growth of cattle. *British J. Nutr.* 101:1068-1078.
- Hidiroglow, M. 1979. Manganese in ruminant nutrition. *Can. J. Anim. Sci.* 59:217-236.
- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Vargas, W. H. Thayne y L. L. Junkins. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58:692-699.
- INEGI. 2009. Estados Unidos Mexicanos, Censo Agropecuario. VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal. Aguascalientes, Ags., México.
- Ingvartsen, K. L. 2006. Feeding and management related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding related diseases. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:175-213.

- James, S. J., M. Swendseid y T. Makinodan. 1987. Macrophage-mediated depression of T-cell proliferation in zinc-deficient mice. *J. Nutr.* 117:1982-1988.
- Jensen, G. S., K. M. Patterson y I. Yoon. 2008. Nutritional yeast culture has specific anti-microbial properties without affecting healthy flora. Preliminary results. *Anim. Feed Sci. Technol.* 17:247-252.
- Jones, D. G. y N. F. Suttle. 1981. Some effects of copper deficiency on leukocyte function in sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* 31:151-156.
- Kendall, N. R., D. V. Illingworth y S. B. Telfer. 2001. Copper responsive infertility in british cattle: the use of a blood caeruloplasmin to copper ratio in determining a requirement for copper supplementation. In: Diskin, M. G. (ed), fertility in the high-producing dairy cow. British Society of Animal Science, vol. 26(2). Occasional Publication, Edinburgh. Reino Unido.
- Kirchgessner, M. P. y B. R. P. Roth. 1993. Zinc in animal nutrition. *Sci. Invest. Agr.* 20:182-201.
- Lema, M., L. Williams y D. R. Rao. 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin. Res.* 39:31-39.
- Li, J., D. F. Li, J. J. Xing, Z. B. Cheng y C. H. Lai. 2006. Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 84:2374-2381.
- Lila, Z. A., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda y H. Itabashi. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Magalhães, V. J. A., F. Susca, F. S. Lima, A. F. Branco, I. Yoon y J. E. P. Santos. 2008. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 91:1497-1509.
- Malecki, E. A. y J. L. Greger. 1996. Manganese protects against heart mitochondrial lipid peroxidation in rats fed high levels of polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* 126:27-33.
- Manterola, B. H., A. D. Cerda y J. J. Mira. 1999. Los Residuos Agrícolas y su Uso en la Alimentación de Rumiantes. Pomasa de Manzana (*Malus pumila*), Uso en Bovinos Productores de Leche. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Chile.

- Martin, S. A. y D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.
- McDowell, L. R. 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition*, 2a ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands. Reino de los Países Bajos.
- McNaught, C. E. y J. MacFie. 2001. Probiotics in clinical practices: a critical review of evidence. *Nutr. Research.* 21:343-353.
- Morelli, L. 2002. Probiotics: Clinics and/or nutrition. *Dig. Liver Dis.* 34:8-11.
- Mujibi, F. D. N., S. S. Moore, D. J. Nkrumah, Z. Wang y J. A. Basarab. 2010. Season of testing and its effect on feed intake and efficiency on growing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 88:3789-3799.
- Murphy, E. A., J. M. Davis, A. S. Brown, M. D. Carmichael, A. Ghaffar y E. P. Mayer. 2007. Oat β -glucan effects on neutrophil respiratory burst activity following exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39:639-644.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayers y V. W. Rodwell. 2000. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. McGraw Hill Health Professional Division, New York, E. U. A.
- NAS, 1971. *Atlas of Nutrition Data on United States and Canadian feeds*. National Academy of Sciences, Washington, DC. E. U. A.
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh y R. J. Wallace. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. *Canadian J. Animal Sci.* 78:241-244.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace y F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British J. Nutr.* 76:249-261.
- Newbold, C. J. y L. M. Rode. 2006. Dietary Additives to Control Methanogenesis in the Rumen. Pages 138-147 in *Greenhouse Gases and Animal Agriculture: An update*. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. Reino de los Países Bajos.
- Nocek, J. E., M. G. Holt y J. Oppy. 2011. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:4046-4056.
- NRC. 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*, 7th ed. Washington, DC: National academy Press. E. U. A.

- Ofek, I., D. Mirelman y N. Sharon. 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*. 265:623- 625.
- Opatpatanakit, Y., R. C. Kellaway, I. J. Lean, G. Annison y A. Kirby. 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Aust. J. Agric. Res.* 45:1247-1263.
- Noguera, R. R., E. O. Saliba y R. M. Mauricio. 2004. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 16, Art. No. 86. <http://www.lrrd.org/lrrd16/11/nogu16086.htm>. Consultado en Octubre 10, 2012.
- Prohaska, J. R. y M. L. Failla. 1993. Copper and Immunity. In: Klurfeld, D. M. *Human Nutrition a Comprehensive Treatise*, 5th ed. Plenum press, New York. E. U. A.
- Reed, G. y T. Nagodawithana. 1991. *Yeast Technology*. 2a ed. AVI, Van Nostrand Reinhold Publ. New York. E. U. A.
- Reeves, P. G., N. V. C. Ralston, J. P. Idso y H. Lukaski. 2004. Contrasting and cooperative effects of copper and iron deficiencies in male rats fed different concentrations of manganese and different sources of sulfur amino acids in an AIN-93G-based diet. *J. Nutr.* 134:416-425.
- Rodríguez, M. C., J. F. Lucero, A. N. Meléndez, H. E. Rodríguez, C. G. Hernández y O. B. Ruiz. 2006. Consumo de forraje y ganancia de peso en becerros comerciales para exportación, suplementados con bloques multinutricionales elaborados con manzanina. *Memorias*, pagina 86, XXXIV reunión anual de la asociación mexicana de producción animal y X reunión bienal del grupo norte mexicano de nutrición animal. Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México.
- Rook, G. A. y L. R. Burnet. 2005. Microbes, immunoregulation and the gut. *Gut*. 54:317-320.
- Rumsey, T. S. 1978. Ruminant fermentation products and plasma ammonia of fistulated steers fed apple pomace-urea diets. *J. Anim. Sci.* 47:967-976.
- Sánchez, B., C. G. De Los Reyes-Gavilán, A. Margolles y M. Gueimonde. 2009. Probiotic fermented milks: Present and future. *Int. J. Dairy Technol.* 62:472-483.
- Saura-Calixto, Y. y J. A. Larrauri. 1996. Nuevos tipos de fibras dietéticas de alta calidad. *Rev. Alim. Equip. Technol.* 1:71-74.

- SIAP. 2012. Población Ganadera. Bovinos, 1999-2008. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=3&Itemid=29. Consultado septiembre 15, 2012.
- Spears, J. W. 2000. Micronutrients and immune function in cattle. *Proc. Nutr. Soc.* 59:587-594.
- Spolders, M. 2007. New Results of Trace Element Research in Cattle. In: M. Fürll (ed.), *Proceedings of 13th International Conference on Production Diseases in Farm Animals*, Leipzig, Germany.
- Spolders, M. S. Öhlschläger, J. Rehage y G. Flachowsky. 2010. Inter- and intra-individual differences in serum copper and zinc concentrations after feeding different amounts of copper and zinc over two lactations. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94:162-173.
- Stephens, T. P., G. H. Longergan, E. Karunasena y M. M. Brashears. 2007. Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. *J. Food Prot.* 70:2386-2391.
- Sunvold, G. D., G. C. Fahey, Jr., N. R. Merchen y G. A. Reinhart. 1995. *In vitro* fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: Influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production. *J. Anim. Sci.* 73:1110-1122.
- Swanson, K. S., C. M. Grieshop, G. M. Clapper, R. G. Shields, Jr., T. Belay, N. R. Merchen y G. C. Fahey, Jr. 2001. Fruit and vegetable fiber fermentation by gut microflora from canines. *J. Anim. Sci.* 79:919-926.
- Swenson, M. J. y W. O. Reece. 1993. *Duke's Physiology of Domestic Animals*. 11th ed. Comstock Publications Assoc. New York. E. U. A.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. D. B. McAllan y J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feeds Sci. Technol.* 48:185-197.
- Tremellen, K. 2008. Oxidative stress and male infertility-A clinical perspective. *Hum. Reprod. Update.* 14:243-258.
- Vallee, B. L. y D. S. Auld. 1990. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochem.* 29:5647-5659.

- van Bruwaene, R., G. B. Gerber, R. Kirchmann, J. Colard y J. van Kerkom. 1984. Metabolism of Cr. Mn. Fe y Co in lactating dairy cows. *Health Phys.* 46:1069-1082.
- van der Peet-Schwering, C. M. C., A. J. M. Jansman, H. Smidt y I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 85:3099-3109.
- Waller, K. P., U. Gronlund y A. Johannisson. 2003. Intramammary infusion of beta 1,3-glucan for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Vet. Med. B.* 50:121-127.
- Ward, J. D. y J. W. Spears. 1999. The effects of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on specific immune responses of stressed cattle. *J. Anim. Sci.* 77:230-237.
- Williams, B. A. 2000. Cumulative Gas Production Techniques for Forage Evaluation. In: Givens D. I., Owen E, Omed H. M. y Axford R. F. E. (ed). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford. Reino Unido.
- Yoon, I. K. y M. D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79:411-417.
- Young, B. A., B. Walker, A. E. Dixon y V. A. Walker. 1989. Physiological adaptation to the environment. *J. Anim. Sci.* 67:2426-2432.
- Yurttas, H. C., H. W. Schafer y J. J. Warthesen. 2000. Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (*Corylus spp.*) phenolics. *J. Food Sci.* 65:276-280.

ESTUDIO I.
INÓCULO DE LEVADURAS Y BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO EN
LA DIETA DE BECERROS ANGUS EN CRECIMIENTO SOBRE EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y SISTEMA INMUNE

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de levaduras (IL) y bagazo de manzana fermentado (BMZN) en la dieta de becerros Angus en crecimiento sobre el comportamiento productivo y sistema inmune. Se utilizaron 26 becerros (PV=112±6.2 kg) de cuatro meses de edad, los cuales fueron distribuidos al azar en tres tratamientos: T1 (testigo, n=9), T2 (BMZN, n=9) y T3 (IL, n=8), alimentados con las siguientes dietas: T1: heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2: HA + EM + concentrado + BMZN; T3: HA + EM + concentrado + IL. Las dietas fueron isoproteicas (28.8 % PC) e isoenergéticas (1.26 Mcal/kg MS). Las variables evaluadas fueron peso vivo (PV), ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA), conversión alimenticia (CA) y concentración de Zn, Mn y Cu en suero sanguíneo. Además, se cuantificó actividad antioxidante (AA) en plasma sanguíneo y biometría hemática (BH) en sangre completa. Las variables fueron evaluadas cada 28 d de la prueba, excepto BH (56 y 84 d). Las variables de la prueba de comportamiento se analizaron con un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento. En la concentración de Zn, Mn, Cu, AA y BH se incluyeron como efectos fijos tratamiento y muestreo; y como efecto aleatorio el animal. El T3 fue superior ($P<0.05$) en CDA y CA (8.512±0.12 kg/d y 1.530±0.03, respectivamente). En Zn el T1, T2 y T3 mostraron las concentraciones más bajas ($P<0.05$) el día 56 del muestreo (11.14±2.77, 10.56±2.81 y 12.30±2.90 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). El Mn presentó diferencia significativa ($P<0.05$) el día 28 de muestreo, siendo T2 y T3 quienes manifestaron la menor concentración (4.29±2.11 y 7.28±2.22 $\mu\text{mol/L}$). El día 28 de muestreo el T1, T2 y T3 mostraron menor ($P<0.05$) concentración de Cu (8.04±2.34, 8.32±2.34 y 9.76±2.47 $\mu\text{mol/L}$). La AA reveló efecto de tratamiento ($P<0.05$) el día 84 de la prueba,

siendo superiores el T2 y T3 con 15.72 ± 0.03 y 15.71 ± 0.03 mmol/L, respectivamente. El T1 y T2 mostraron la concentración más alta ($P < 0.05$) de Leu el día 84 (9.82 ± 0.95 y $11.11 \pm 0.95 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente) y Lin (7.30 ± 0.92 y $8.73 \pm 0.92 \times 10^3/\mu\text{L}$). Se concluye que el T3 incrementó el CDA y CA, por otra parte, mantuvo la cantidad de Leu y Lin cerca del nivel máximo, sin mostrar variaciones significativas a través del tiempo.

FOR AUTHOR USE ONLY

ABSTRACT

INOCULUM OF YEAST AND FERMENTED APPLE BAGASSE IN THE DIET OF GROWING ANGUS CALVES ON PRODUCTIVE PERFORMANCE AND IMMUNE SYSTEM

The objective of the study was to evaluate the effect of an inoculum of yeast (YI) and fermented apple bagasse (BMZN) in the diet of growing Angus calves and their effect on productive performance and immune system. Twenty-six calves ($PV=112\pm6.2$ kg) of four months of age, were randomized into three feeding treatments: T1 (control, $n=9$): oat hay (OH) + corn silage (CS) + concentrated; T2 (BMZN, $n=9$): OH + CS + concentrated + BMZN; T3 (YI, $n=8$): OH + CS + concentrated + YI. Diets were isoenergetic (1.26 Mcal/kg MS) and isoproteic (28.8 %). The variables evaluated were weight, average daily gain (ADG), daily feed intake (DFI), feed conversion (FC) and Zn, Mn and Cu concentration in blood serum. In addition, the antioxidant activity (AA) was quantified in plasma and hematic biometry (HB) in full blood. All the variables were evaluated every 28 days, except hematic biometry, which was measured only on days 56 and 84. The variables of the performance test were analyzed with a statistical model that included treatment as a fixed effect. The concentration of Zn, Mn, Cu, AA y BH were analyzed with a model that included treatment and sampling day as fixed effects; and animal as random effect. The T3 showed improved ($P<0.05$) DFI and FC (8.512 ± 0.12 kg/d and 1.530 ± 0.03 , respectively). In Zn the T1, T2 and T3 showed the lowest concentration ($P<0.05$) the 56th day of sampling (11.14 ± 2.77 , 10.56 ± 2.81 and 12.30 ± 2.90 $\mu\text{mol/L}$). The Mn showed significant difference ($P<0.05$) at day 28 of sampling, being the T2 and T3 who expressed the lowest concentration (4.29 ± 2.11 and 7.28 ± 2.22 $\mu\text{mol/L}$). The 28th day of sampling the T1, T2 and T3 showed the lowest

($P < 0.05$) concentration of Cu (8.04 ± 2.34 , 8.32 ± 2.34 and 9.76 ± 2.47 $\mu\text{mol/L}$). The AA revealed effect of treatment ($P < 0.05$) the 84th day of the sampling, being superior the T2 and T3 with 15.72 ± 0.03 and 15.71 ± 0.03 mmol/L , respectively. The T1 and T2 showed the highest ($P < 0.05$) concentration of Leu 84th day (9.82 ± 0.95 and $11.11 \pm 0.95 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectively) and Lin (7.30 ± 0.92 and $8.73 \pm 0.92 \times 10^3/\mu\text{L}$). We conclude that the T3 increased the ADG and DFI, moreover, maintained the amount of Leu and Lin near the maximum level, without showing significant variations over time.

FOR AUTHOR USE ONLY

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son aditivos alimenticios que contienen microorganismos que al ser adicionados en la alimentación animal permanecen activos en el tracto digestivo, ejerciendo importantes efectos fisiológicos que contribuyen al equilibrio del ambiente ruminal y del sistema inmune, con efectos benéficos en el rendimiento productivo (Desnoyers *et al.*, 2009); sin embargo, el mecanismo del efecto de los productos de levaduras no se ha entendido completamente. Los cultivos vivos de *Saccharomyces cerevisiae* producen enzimas, vitaminas del complejo B, minerales y diversos tipos de aminoácidos (van der Peet- Schwing *et al.*, 2007) y como consecuencia, estimulan la absorción de nutrientes creando un ambiente intestinal saludable y mejorando el sistema inmune (Czarnecki-Maulden, 2008). Por otra parte, los minerales traza tales como el Zinc, Cobre y Manganese son elementos que juegan un papel importante en varias funciones corporales, necesarias para mantener una salud óptima y por lo tanto son nutrientes esenciales para todos los animales (Aksu *et al.*, 2011), ejercen su efecto sobre un correcto crecimiento, reproducción, rutas de secreción hormonal y respuesta inmune (Dorton *et al.*, 2007). Del mismo modo, los antioxidantes pueden formar parte de enzimas que directa o indirectamente protegen a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas (Huerta *et al.*, 2005). La adición de antioxidantes en la dieta de animales domésticos mejora la respuesta inmune y disminuye el estrés oxidativo, generando una mayor resistencia a enfermedades infecciosas y degenerativas (Chew, 1995). El bagazo de manzana fermentado es rico en antioxidantes, minerales orgánicos y levaduras que pueden ayudar a mantener la salud del animal que lo consume. Es de bajo costo y posee nutrientes altamente fermentables por microorganismos como levaduras y

bacterias en el rumen (Becerra *et al.*, 2008 y Rodríguez-Muela *et al.*, 2010).

Con base en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un inóculo de levaduras y de bagazo de manzana fermentado en la dieta de becerros Angus en crecimiento y su efecto sobre el comportamiento productivo, concentración de minerales en suero, actividad antioxidante en plasma y biometría hemática. Los resultados de esta investigación permitirán a los productores y nutriólogos pecuarios tomar una decisión que permita mejorar los rendimientos productivos y sistema inmune en becerros sometidos al estrés por el destete.

FOR AUTHOR USE ONLY

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones del rancho La Cañada, localizado en el municipio de Guerrero, Chihuahua, Chih., México. Ubicada en las coordenadas 28° 33' 05" latitud norte y 106° 30' 07" longitud oeste, con una altitud de 2,010 msnm, según sistema de posicionamiento global (GPS por sus siglas en inglés, MAGELLAN®, MobileMapper-Pro).

El clima es semihúmedo templado; la temperatura media anual es de 13 °C, con una media máxima de 42 °C y una media mínima de -17.6 °C. La precipitación promedio anual es de 517.2 mm, con una humedad relativa del 65 % y un promedio anual de 90 días de lluvia (INAFED, 2010). El experimento inicio el 17 de febrero y finalizo el 25 de mayo de 2011.

Descripción de los Animales y Tratamientos

Se utilizaron 27 becerros Angus destetados con peso inicial de 112±6.2 kg y edad promedio de cuatro meses. Los becerros se asignaron aleatoriamente a tres tratamientos; T1 (testigo, n=9): heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 (BMZN, n=9): HA + EM + concentrado + BMZN y T3 (IL, n=8): HA + EM + concentrado + IL. Los concentrados (Cuadro 1) se adicionaron al HA y EM al momento de ofrecer el alimento.

El BMZN se preparó con 75 kg de manzana de desecho, al cual se le adicionaron 350 gr de urea + 100 gr de sulfato de amonio + 200 gr de premezcla de vitaminas y minerales traza, posteriormente se mezclaron en un fermentador aeróbico por 72 h, manteniendo el mezclado por 15 min en cada tiempo (0, 6, 12, 24, 48 y

Cuadro 1. Composición del alimento concentrado por tratamiento

Ingredientes	T1	T2	T3
	% (BS)		
Maíz rolado	32.0	30.6	32.0
Melaza	10.0	5.0	8.0
Harinolina 41 % PC	20.6	15.0	20.6
Pasta de soya 44 % PC	30.0	30.0	30.0
Carbonato de calcio	2.4	2.4	2.4
BMZN ²	0.0	12.0	0.0
Sal común	2.0	2.0	2.0
Minerales y vitaminas ^{12:10}	3.0	3.0	3.0
Inoculo de levaduras	0.0	0.0	2.0
Análisis calculado			
ENg Mcal/kg	1.26	1.25	1.26
PC %	28.81	28.83	28.89
PD %	53.91	51.78	53.07
Ca %	1.67	1.77	1.68
P %	0.98	0.99	0.99
Cu mg/kg	16.12	13.75	15.32
Mn mg/kg	31.66	30.18	31.17
Zn mg/kg	42.48	40.32	42.70

¹Mezcla de minerales y vitaminas 12:10: P, Ca y Mg (12.0, 11.5, 0.6 %), Mn, Zn, Fe, Cu, I, Co y Se (2160, 2850, 580, 1100, 102, 13, 9 ppm), Vitamina A, D3 y E (220000, 24500, 30 UI/kg).

²BMZN = Bagazo de manzana fermentado.

72 h). Esta cantidad de mezcla se preparó en dos etapas, la primera para preparar el concentrado para los meses febrero y marzo (600 kg), y la segunda para los meses abril y mayo (600 kg).

Material Biológico

Las cuatro cepas de levaduras que se utilizaron para este trabajo fueron obtenidas a partir de la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana (BM), las cuales fueron identificadas a través de la extracción y amplificación del ADNr 18S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), en el laboratorio de transgénesis animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Para la identificación se realizó un cultivo de levaduras por dilución seriada y se aislaron 16 colonias a las cuales se les extrajo ADN para amplificar una región del ADNr 18S (752 pb). El producto de PCR obtenido se sometió a secuenciación, realizando su análisis por medio del programa Blast de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

El análisis de las secuencias mostró que las levaduras correspondientes a las 16 colonias aisladas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*; *Issatchenkia orientalis* y *Kluyveromyces lactis* (Villagrán *et al.*, 2009). Las cepas utilizadas para este trabajo fueron *K. lactis* cepas 2 y 11; *I. orientalis* cepa 3 y *S. cerevisiae* cepa 6. Todas obtenidas a partir de la fermentación en estado sólido del BM. Las cepas se mantuvieron viables mediante resiembras periódicas en cuñas y en cajas petri. El medio que se utilizó fue Extracto de Malta a razón de 33.6 g/L y el tiempo de incubación fue de 48 horas a una temperatura de 30 °C. Posteriormente, se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C. El IL que se utiliza en el presente experiment, se prepare en 5 botes de 20 L, a 4 de ellos se les agregaron cultivos de levaduras provenientes de 3

cajas Petri cada una de las cepas descritas anteriormente, adicionando a cada uno de los 5 botes, 6 g de urea, 1 g de sulfato de amonio, 500 g de melaza de caña, 2.5 g de premezcla de vitaminas y minerales y 6 L de agua destilada. A cada bote se le adaptó un oxigenador portátil durante 96 h con la finalidad de suministrar el oxígeno necesario para favorecer el crecimiento de las levaduras.

Posteriormente se tomaron muestras de 10 mL de cada bote en frascos de plástico de 50 mL cerrados herméticamente, los cuales se trasladaron al Laboratorio de Nutrición Animal para realizar el conteo de levaduras por microscopia, con la ayuda de una micropipeta (Nichiryo LE) de un volumen de 10 a 100 μ L y puntas desechables, así mismo, se preparó una dilución serial de 1 mL de muestra utilizando como diluyente agua destilada, posteriormente se tomaron 10 μ L de la dilución de cada muestra y se colocaron en un hematocímetro (cámara de Neubauer) para el conteo (Díaz, 2006).

La cantidad de células individuales o en gemación se contaron en los 4 cuadrantes (1 mm² cada uno) como se indica en la Figura 1. Se determinó el promedio por cuadrante y se calculó la cantidad de células por mililitro (cel/mL), ajustando la cantidad de cada cepa a 3.7×10^9 cel/mL en 500 mL por medio de diluciones con el sustrato sin levaduras, para adicionar 2 L de inóculo en el concentrado del T3.

Manejo de los Animales

Previo al inicio del experimento los becerros fueron pesados e identificados con arete plástico, vacunados vía intramuscular (IBR, DVB, PI3, VRSB) con una dosis de 2 ML/ animal, desparasitados interna y externamente vía subcutánea con Ivermectina 1 % (1 mL/50 kg de PV). Posteriormente, fueron divididos al azar en tres grupos de nueve becerros, cada grupo estuvo formado por tres corrales (18 m²) con piso de tierra,

Área (Cuadrante) para conteo de células de mayor tamaño (e.g. levaduras)

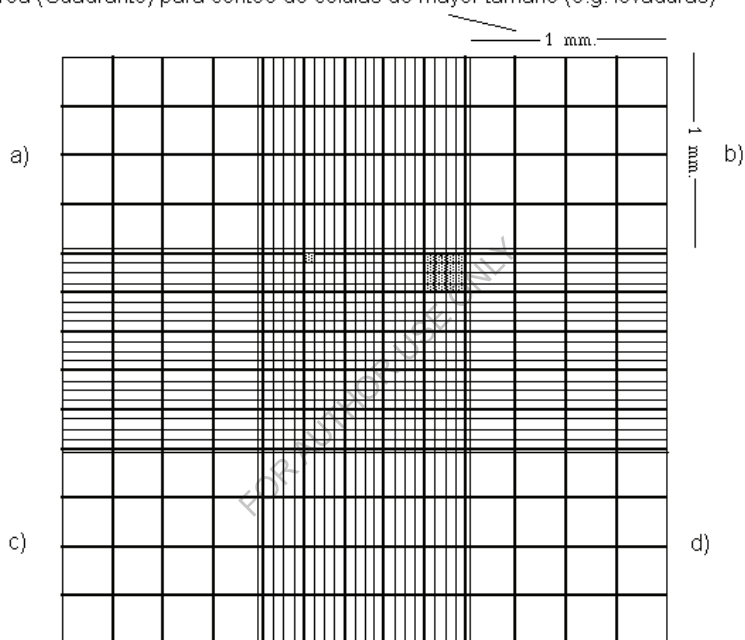


Figura 1. Cuadrícula de un hematocímetro (cámara de Neubauer). a, b, c y d, fueron los cuatro cuadrantes utilizados para el conteo de levaduras, su superficie suma un total de 4 mm^2 , el espacio entre un cubre objetos y la superficie de la cámara de Neubauer, utilizando los límites de cada cuadrante como guía tiene 0.1 mm^3 de volumen.

provistos con bebedero y comedero alojando tres animales cada uno, con disponibilidad permanente de agua y alimentados *ad libitum* una vez al día a las 9:00 h. Se utilizaron tres dietas de crecimiento durante el experimento (NRC, 1996), ofreciendo 1.2 kg de HA y 1.7 kg de EM en base a materia seca (MS), adicionando 1.2 kg de MS de concentrado por animal por día según el tratamiento correspondiente. Cada 14 d se ajustó el consumo de alimento, pesando el alimento ofrecido y rechazado por tres días consecutivos, donde únicamente se aumentaron los kg de HA y SM en un 15 %, asegurando la disponibilidad de la dieta durante todo el día. Un becerro fue descartado de la prueba, debido a causas ajenas al efecto de tratamiento, por lo que el tamaño de muestra del T3 fue de 8 becerros.

Toma de Muestras

Temperatura ambiental. La temperatura ambiental (TA) máxima y mínima se registró diariamente con un termómetro de mercurio a las 7:00 am y 1:00 pm.

Comportamiento productivo. Las variables de la prueba de comportamiento se midieron al inicio y cada 28 d durante todo el experimento, pesándose individualmente a los becerros los días 1, 28, 56 y 84 de la prueba, utilizando una báscula REVUELTA® con capacidad de 1500 kg para conocer su peso vivo (PV). El alimento ofrecido y el rechazado fueron registrados tres días consecutivos por corral a mitad de cada periodo de pesaje mediante una báscula manual PEXA, para calcular el consumo de materia seca (CMS), ajustándose a un rechazo de un 10 %.

Para calcular la ganancia diaria de peso (GDP) se realizó una resta entre pesos consecutivos y el producto se dividió entre 28, siendo el número de días que transcurrieron entre un pesaje y otro. La información obtenida sobre el CMS y GDP fue

usada para determinar la conversión alimenticia (CA), la cual es la cantidad resultante entre la cantidad de alimento consumido y la ganancia de peso en un periodo de 28 d.

Muestras sanguíneas. Por animal se colectaron cuatro tubos de muestra de sangre por punción directa de la vena yugular después del pesaje individual y antes que recibieran la dieta durante la mañana, estas muestras se preservaron en hielera abastecida con hielo.

Determinación de minerales en suero. Para la medición de Zinc (Zn), Manganese (Mn) y Cobre (Cu) se colectaron dos tubos Vacutainer® (sin anticoagulante), al inicio y cada 28 d de la prueba. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 3500 xg durante 10 min a 4 °C para extraer el suero sanguíneo; se colectó el sobrenadante en viales color ámbar de 10 mL previamente marcados y posteriormente se congelaron a -20 °C hasta realizar su análisis. Previo a su medición, se descongelaron en refrigeración a 4 °C, posteriormente se tomaron tres submuestras de 2 mL para cada mineral (Zn, Mn y Cu) en tubos (BD Falcon) de 5 mL, adicionándole ácido tricloroacético (ATCA) al 20 % (1 mL ATCA: 1 mL de suero), mezclándose en vórtice (Vortex Genie II) por 10 segundo (s) para después centrifugar a 3500 xg durante 10 min y 4 °C para obtener un sobrenadante desproteínizado, posteriormente la cantidad de sobrenadante se diluyó con agua destilada en la misma proporción (1 mL:1 mL). El análisis fue realizado con estándares preparados con glicerol para mantener las características de viscosidad de las muestras diluidas. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua tridestilada.

La solución estándar de Zn ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) fue preparada con 1.09 g diluidos en 250 mL de agua tridestilada, adicionando el 5 % de glicerol; el estándar de Mn ($MnSO_4 \cdot H_2O$) fue preparado con 0.77 g diluidos en 250 mL de agua tridestilada,

adicionando el 10 % de glicerol; y la solución estándar de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) fue preparada con 9.71 mL diluidos en 100 mL de agua destilada, adicionando 10 % de glicerol. Las soluciones de trabajo de los estándares fueron preparadas un día antes de analizar las muestras. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado por medio de espectrofotometría de absorción atómica (AAnalyst 200, Perkin-Elmer instruments), siguiendo las recomendaciones de Makino y Takahara (1981) reportando los resultados en partes por millón (ppm).

Medición de la actividad antioxidante en plasma (AA). Para la medición de actividad antioxidante (AA) se colectó una muestra en tubo Vacutainer® (7.2 mg de EDTA como anticoagulante) al inicio y cada 28 d del experimento. Las muestras destinadas para determinar AA, se trasladaron al laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología donde fueron centrifugadas a 3500 $\times g$ por 10 min a 4 °C, el plasma se decantó en viales color ámbar de una capacidad de 10 mL, previamente rotulados, posteriormente se congelaron a - 20 °C hasta el momento de su medición. Esta variable se analizó con la técnica desarrollada por Benzie y Strain (1996), la cual tiene como objetivo medir la habilidad del plasma para reducir el hierro o FRAP por sus siglas en inglés (Ferric Reductive Ability of Plasma). Esta técnica se realiza por colorimetría, diluyendo las muestras de plasma en agua destilada y metanol (73.75 % de agua destilada, 25 % de metanol y 1.25 % de plasma).

Para la medición de AA se prepararon tres soluciones: 1. - Solución búfer (300 mM de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH 3.6) se agregaron 3.1 g de acetato de sodio trihidratado, se añadieron 16 mL de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) y se aforó a 1 litro (L) con agua destilada, esta solución se preservó a 4 °C; 2.- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 40 mM, se adicionó 1.46 mL de HCl concentrado en un matraz de 1 L, aforándose con

agua destilada, esta solución se preservó a temperatura ambiente; 3.- Solución trispiridil-triacina (TPTZ; 10 mM/L de 2,4,6- trispyridyl-s-triazine), se mezclaron 0.031 g de TPTZ en 10 mL de la solución 2, este reactivo se preparó al momento en que fue utilizado; 4.- Solución de cloruro férrico hexahidratado (20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), se mezclaron 0.054 g en 10 mL de agua destilada, esta solución se preparó un día antes de ser utilizada y se preservó en refrigeración (4 °C).

La solución FRAP estuvo compuesta por las soluciones 1, 3 y 4 en una relación de 10:1:1 (v/v/v), este reactivo fué preparado al momento en que fueron preparadas las muestras para su análisis, ya que no puede ser preservado.

La solución estándar para la curva de calibración se preparó con 0.0417 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) diluido en 50 mL de metanol grado HPLC (CH_3OH), con esta mezcla se prepararon muestras de 0.0 (blanco), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL, a dichas cantidades se les agregó metanol (excepto a la última) hasta completar 1 mL y posteriormente a cada una se le adicionó 3 mL de agua destilada, se agitaron en vórtice por 10 s, posteriormente cada punto de la curva se analizó por triplicado, extrayendo 200 μL de cada punto y adicionándole 1,800 μL de solución FRAP por cada tubo del triplicado, nuevamente se agitaron en vórtice y después de 10 min de reposo a temperatura ambiente se procedió a tomar la lectura en un espectrofotómetro Junior® II Coleman modelo 6/20 a una absorbancia de 593 nanómetros (nm). Con los datos que se obtuvieron se elaboró una curva de predicción en base a una ecuación de regresión.

Una vez descongelado el plasma se procedió a preparar las muestras, se tomaron 7 μL de plasma y se añadieron a un tubo en el que previamente se habían adicionado 200 μL de agua, enseguida se agregaron 195 μL de metanol y se mezclaron

195 μL de metanol y se mezclaron en vortex, a dicha mezcla se le añadieron 2,000 μL de solución FRAP, pasados 10 min de reposo se procedió a tomar la lectura a una absorbancia de 593 nm. El blanco se preparó de la misma forma que las muestras, excepto que se le adicionaron 7 μL de agua destilada, las muestras y el blanco se prepararon por triplicado. Con la ecuación y la cantidad de absorbancia de la muestra, se calculó la AA por micromolar (μM) de plasma sanguíneo, los resultados se expresaron en micromolar equivalentes a Fe_2 ($\mu\text{M Fe}_2$).

Biometría hemática (BH). Para analizar biometría hemática (BH) se colectó un tubo Vacutainer[®] (7.2 mg de EDTA como anticoagulante) los días 56 y 84 del experimento. Se determinaron diferentes componentes sanguíneos en cantidad, porcentaje y peso, siendo los siguientes: Leucocitos (Leu), Neutrófilo (Neu), Linfocitos (Lin), Células mixtas (Cm), Eritrocitos (Er), Hemoglobina (Hem), Hematocrito (Hto), Volumen corpuscular medio (VCM), Hemoglobina corpuscular medio (HCM), Concentración de hemoglobina corpuscular medio (CHCM) y Plaquetas (Pq). Las muestras para BH se enviaron a las instalaciones de ASSAY Laboratorio Clínico S. de R. L. de C. V., donde realizaron su análisis mediante un citómetro Beckman Coulter[®]/act/dif/1al.

Análisis Estadístico

Las variables de la prueba de comportamiento, como el PV, CDA, GDP y CA se analizaron tomando como efecto fijo el tratamiento y el peso inicial como covariable en un diseño completamente al azar. Por otra parte, se analizaron Zn, Mn, Cu, AA y BH tomando como efectos fijos tratamiento y muestreo, y su interacción, y como efecto aleatorio al animal, se utilizó la prueba de Tukey para establecer las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos (Steel y Torrie, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura Ambiental

La TA promedio que se registró durante los meses transcurridos en este experimento, se muestra en el Cuadro 2. La TA es probablemente la variable más investigada y al mismo tiempo la más utilizada como indicador de estrés. Los efectos de la temperatura ambiente sobre el rendimiento de los animales han sido estudiados ampliamente en el ganado bovino (Mujibi *et al.*, 2010), y se ha encontrado que un animal dentro de su capacidad genética y fisiológica, se ajusta continuamente para enfrentar los cambios ambientales (Young *et al.*, 1989). Por otro lado, Arias (2006) mencionó que la temperatura ambiente efectiva de confort es el estado constante de temperatura corporal, la cual puede ser mantenida sin necesidad de ajustes fisiológicos o de comportamiento.

En este estudio es probable que los animales hayan experimentado un cuadro de estrés por frío, y como respuesta incrementaron el consumo de alimento para generar calor metabólico lo que coincide con Young (1983) quien reportó que animales expuestos a bajas temperaturas desencadenan diversos mecanismos de termorregulación donde los requerimientos para mantenimiento permanecen sin cambios hasta que la temperatura crítica sea superada; por el contrario, puede provocar daños de tejidos, del sistema inmune y disminución en la respuesta reproductiva y de crecimiento (Moberg, 1987).

Prueba de Comportamiento

Se observó un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el CDA y CA como consecuencia de la dieta (Cuadro 3). Los becerros del T3 fueron superiores

Cuadro 2. Temperatura ambiental promedio registrada durante el experimento

Fecha	Día de muestreo ^b	Temperatura °C ^a	
		Máxima	Mínima
17-Febrero / 01-Marzo	1	24.3	-7.3
02-Marzo / 30-Marzo	28	27.2	-3.0
31-Marzo / 27-Abril	56	30.4	0.9
28-Abril / 25-Mayo	84	30.7	2.6
Promedio		28.1	-1.7

^a La temperatura máxima y mínima corresponde al promedio registrado en el transcurso de los días de las fechas indicadas.

^b Son los días de muestreo durante el tiempo que duró el experimento.

Cuadro 3. Medias ($\pm$ EE) del comportamiento productivo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Variables	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
Peso vivo, kg	184.96 $\pm$ 4.34 ^a	178.34 $\pm$ 4.36 ^a	183.60 $\pm$ 4.61 ^a
CDA, kg/d	7.89 $\pm$ 0.12 ^b	7.54 $\pm$ 0.12 ^b	8.51 $\pm$ 0.12 ^a
GDP, kg/d	0.86 $\pm$ 0.05 ^a	0.79 $\pm$ 0.05 ^a	0.85 $\pm$ 0.05 ^a
CA	1.39 $\pm$ 0.03 ^b	1.38 $\pm$ 0.03 ^b	1.53 $\pm$ 0.03 ^a

^{a,b} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamiento.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

($P < 0.05$) en el CDA (8.512 ± 0.12 kg/d) y en la CA (1.530 ± 0.03) que aquellos que se les ofreció bagazo de manzana fermentado y la dieta testigo. Sin embargo, a pesar de que los becerros que recibieron un IL en su dieta mostraron un efecto sobre CDA y CA, no hubo ($P > 0.05$) diferencia en PV y GDP al compararse con los otros dos tratamientos. Es posible que el IL haya estimulado el crecimiento numérico de las bacterias celulolíticas e incrementado la fermentación de la fibra a nivel ruminal, aumentando así el consumo de alimento sin mejorar el PV y GDP.

De acuerdo con otras investigaciones, el aumento en el consumo diario de alimento observado es resultado de un incremento en la degradación ruminal de la fibra por efecto de la adición del cultivo de levadura (Newbold *et al.*, 1996), lo que parece estar asociado al estímulo en crecimiento y actividad de las bacterias celulolíticas, incrementando el flujo de proteína hacia el intestino delgado por lo que se espera un mejor desarrollo del animal por tener más disponibilidad de nutrientes (Birıcık y Ürkmen, 2001). Young (1983) indicó que animales expuestos a condiciones de frío por abajo de la temperatura corporal crítica, está asociada con la aclimatación metabólica, lo que se traduce en mayor producción de calor para mantener las funciones vitales del organismo. Delfino y Mathison (1991) reportaron evidencia de que las bajas temperaturas provocan un comportamiento pobre en términos de eficiencia alimenticia.

En el presente estudio, posiblemente la TA extrema que se registró durante el desarrollo de la prueba limitó la expresión del potencial productivo de los animales. La menor producción durante el invierno está asociada a mayor demanda de energía para mantenimiento y menor digestibilidad del alimento (Arias *et al.*, 2008) por incremento en la actividad de la glándula tiroides que influye en el tracto gastrointestinal, causando

incremento de la motilidad intestinal y tasa de pasaje de los alimentos (NRC, 1996). En otro estudio mencionaron que el consumo de alimento se incrementó en invierno sin tener efecto en la eficiencia alimenticia, por lo que la energía del alimento fue dirigida para mitigar los efectos de las condiciones climáticas adversas, tales como, incrementar la producción de calor o la acumulación de grasa corporal para ayudar a disminuir la pérdida de calor (Mujibi *et al.*, 2010).

Concentración de Minerales en Suero

Zinc. El Cuadro 4 presenta la concentración en suero sanguíneo, mostrando significancia ($P<0.05$) el día de muestreo. El Zn superó el nivel más alto dentro de la especie, excepto el día 56, siendo este día donde los tres tratamientos registraron la concentración más baja ($P<0.05$), con valores de 11.14 ± 2.77 , 10.56 ± 2.81 y 12.30 ± 2.90 $\mu\text{mol/L}$ para el T1, T2 y T3, respectivamente. Así mismo, al final del experimento el T2 reveló diferencia ($P<0.05$) mostrando 22.29 ± 2.81 $\mu\text{mol/L}$, inferior al 1 y 28 d de muestreo, pero superior al 56 d. Los valores de referencia para el Zn van desde 13.96 a 16.43 $\mu\text{mol/L}$ (McDowell y Arthington, 2005).

La concentración de Zn mostró significancia al incrementarse los niveles cuando se presentaron las temperaturas más bajas. El rol específico del Zn en la respuesta inmune no está completamente claro, sin embargo, se considera esencial para la integridad del sistema inmune (Hambridge *et al.*, 1986). Murray *et al.* (2000) mencionaron que el Zn es un componente estructural de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual ayuda a eliminar los radicales libres producidos en el cuerpo durante una respuesta inmune. Droke y Spears (1993) publicaron que la respuesta inmune de corderos alimentados con deficiencia marginal de zinc (8.7 mg/kg MS) en su dieta, no revelaron diferencias con respecto a los corderos que recibieron

Cuadro 4. Medias ($\pm$ EE) de la concentración de zinc ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	31.38 $\pm$ 2.77 ^x	31.65 $\pm$ 2.81 ^x	31.15 $\pm$ 2.90 ^x
28	30.03 $\pm$ 2.77 ^x	36.75 $\pm$ 2.81 ^x	29.62 $\pm$ 2.90 ^x
56	11.14 $\pm$ 2.77 ^y	10.56 $\pm$ 2.81 ^z	12.30 $\pm$ 2.90 ^y
84	29.05 $\pm$ 2.77 ^x	22.29 $\pm$ 2.81 ^y	24.76 $\pm$ 2.90 ^x

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

cantidades adecuadas de zinc (44.0 mg/kg MS). Sin embargo, en este estudio se obtuvieron los límites fisiológicos más bajos el día 56 de muestreo sin observarse signos clínicos, lo que concuerda con Cuesta *et al.* (2011) quienes observaron valores promedio de 13.19 $\mu\text{mol/L}$ inferiores al límite más bajo para la especie con un 87.5 % de los animales por abajo del rango inferior sin observarse animales físicamente enfermos.

Spears (2000) reportó que la deficiencia de zinc en corderos disminuye el porcentaje de linfocitos e incrementan los neutrófilos en la circulación sanguínea; de acuerdo a lo publicado por este autor, en nuestro estudio la disminución de Zn el día 56 propició una reducción en la cantidad de linfocitos, pero no un incremento en el número de neutrófilos, lo que coincide con lo publicado por (Hambridge *et al.*, 1986). Cerone *et al.* (2000) reportaron que la deficiencia de Zinc y Cobre provoca en bovinos atrofia del bazo y del timo, linfopenia, monocitosis y disminución de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, afecta a las células T y B y por tanto la producción de anticuerpos.

Manganeso. La mayor ($P<0.05$) concentración de Mn que presentaron los tratamientos fué al inicio y al final de la prueba (Cuadro 5), sin embargo, el día 28 se observaron las concentraciones más bajas ($P<0.05$) con 4.97 ± 2.15 , 4.29 ± 2.11 y 7.28 ± 2.22 $\mu\text{mol/L}$ para T1, T2 y T3, respectivamente. Excepto para el T1 con niveles similares el día 28 y 56 ($P>0.05$).

Cuadro 5. Medias ($\pm$ EE) de la concentración de manganeso ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	22.57 $\pm$ 2.15 ^x	21.10 $\pm$ 2.11 ^x	21.81 $\pm$ 2.22 ^x
28	4.97 $\pm$ 2.15 ^y	4.29 $\pm$ 2.11 ^z	7.28 $\pm$ 2.22 ^z
56	8.50 $\pm$ 2.15 ^y	12.56 $\pm$ 2.11 ^y	14.92 $\pm$ 2.22 ^y
84	22.30 $\pm$ 2.15 ^x	23.71 $\pm$ 2.11 ^x	23.37 $\pm$ 2.22 ^x

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

La absorción de Mn es influenciada por muchos factores tales como la forma química e interacciones entre diferentes micronutrientes (Sanchez-Morito *et al.*, 1999). Así mismo, el Mn es otro antagonista potencial del Cu que afecta su absorción a nivel intestinal (Grace, 1973), limitados estudios han examinado el efecto antagónico que ejerce el Mn sobre el Cu en dietas de rumiantes. Arredondo *et al.* (2003) sugirieron que el Mn y Cu pueden compartir la misma ruta en la absorción y transporte a nivel intestinal, por medio de la proteína transportadora 1 de metales divalentes lo que los hace competir entre ellos. En su estudio Ivan y Grieve (1976) encontraron que la adición de 50 mg Mn/kg MS a una dieta que contenía 12 mg Mn/kg MS resulto en una disminución en la absorción de Cu en el tracto gastrointestinal de becerros Holstein; sin embargo, la dinámica del antagonismo en rumiantes no está muy clara.

En el presente estudio, la disminución de Mn y Cu el día 28 de muestreo tal vez se debió a la alta concentración de Zn que ocurrió el mismo día, siendo el Cu para el día 56 quien propicio la menor cantidad de Mn y Zn.

Aunque existen otros minerales que pueden provocar su disminución tal como la deficiencia de Mg puede modificar indirectamente la absorción de Mn por la alteración de la disponibilidad de otros cationes divalentes tales como Ca, Zn (Planells *et al.*, 1993) y Cu (Jimenez *et al.*, 1997). Sanchez-Morito *et al.* (1999) asumieron que la disminución en la concentración de Mn estuvo relacionada a un incremento en la actividad metabólica en la medula ósea, como un mecanismo para incrementar la eritropoyesis e intentar compensar la hemolisis inducida por la deficiencia de Mg (Piomelli *et al.*, 1973). Por otra parte, Jenkins y Hiridoglou (1991) publicaron que el exceso de Mn afecta negativamente el metabolismo de Fe en bovinos, resultando en una disminución del volumen del paquete celular y de la hemoglobina, reduciendo

la capacidad de unión de Fe en suero.

Cobre. La concentración de Cu de los tres tratamientos sobrepasó el nivel máximo dentro de la especie durante la prueba (Cuadro 6), excepto en el día 28, este mismo día los tres tratamientos fueron inferiores ($P<0.05$) al resto de los días de muestreo (8.04 ± 2.34 , 8.32 ± 2.34 y 9.76 ± 2.47 $\mu\text{mol/L}$ para el T1, T2 y T3, respectivamente). Sin embargo, los tres tratamientos el día 56 revelaron la más alta ($P<0.05$) concentración que el resto de los días de muestreo, excepto el día 56 y 84 del T3 los cuales fueron similares ($P>0.05$). El rango de valores de referencia para Cu en suero de bovinos es de 11.0 a 18.0 $\mu\text{mol/L}$ (McDowell y Arthington, 2005).

Castillo *et al.* (2012) mencionaron que el Cu es un elemento traza esencial para los procesos de respuesta inmune, juega un rol de cofactor para muchas enzimas (citocromo oxidasa, ceruloplasmina y superóxido dismutasa), por lo que puede realizar varias funciones en el sistema inmune de las cuales el mecanismo directo de acción no está muy claro (Solaiman *et al.*, 2007). Se ha observado que animales con deficiencias de Cu pueden tener cupremias dentro de rango, ya que en los tejidos donde se acumula sigue enviando sus reservas a la circulación (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Asimismo, animales con intoxicación crónica por Cu pueden tener acumulación excesiva principalmente en hígado y los niveles séricos encontrarse dentro de rangos de referencia (Wikse *et al.*, 1992).

En este estudio, el día 28 de muestreo los tres tratamientos presentaron niveles inferiores a los límites fisiológicos de la especie, esto tal vez debido al incremento de Zn que haya competido en la absorción de Cu y repercutido en su concentración, o posiblemente porque el Cu fue incorporado a la SOD en las células rojas durante

Cuadro 6. Medias ($\pm$ EE) de la concentración de cobre ($\mu\text{mol/L}$) en suero sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	22.17 $\pm$ 2.34 ^y	24.48 $\pm$ 2.34 ^y	23.83 $\pm$ 2.47 ^y
28	8.04 $\pm$ 2.34 ^z	8.32 $\pm$ 2.34 ^z	9.76 $\pm$ 2.47 ^z
56	33.36 $\pm$ 2.34 ^x	38.06 $\pm$ 2.34 ^x	31.29 $\pm$ 2.47 ^x
84	23.16 $\pm$ 2.34 ^y	20.96 $\pm$ 2.34 ^y	29.29 $\pm$ 2.47 ^x

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

la hematopoyesis y vida útil de eritrocitos la cual es alrededor de 150 días (Suttle y McMurray, 1983). En otro estudio, Cuesta *et al.* (2011) diagnosticaron valores promedio de Cu de 11.5 $\mu\text{mol/L}$ y el 40 % de sus bovinos presentaron valores inferiores al límite crítico de 11.0 $\mu\text{mol/L}$ sin presentar signos clínicos. Los rumiantes en su mayoría, excepto el ovino, tienen alta capacidad de almacenar Cu en el hígado (Mertz y Davis, 1987), esto se debe a su capacidad de síntesis de metalotioneínas que ayudan a retener al Cu y otros minerales en el hepatocito (Gooneratne *et al.*, 1989). Durante la hipocuprosis disminuye la actividad de enzimas Cu dependientes como el citocromo oxidasa, que es necesaria para la actividad fagocítica y de la superóxido dismutasa (SOD), lo que reduce la vida media de los leucocitos al ser estas células dependientes de esta enzima y todo ello causa predisposición de enfermedades infecciosas y virales afectándose negativamente el sistema inmunológico del animal y con ello la capacidad de respuesta a la infección (Spears, 2003).

Actividad Antioxidante

La mayor AA ($P<0.05$) se observó al inicio del experimento en los tres tratamientos, mostrando un incremento significativo ($P<0.05$) el T2 (15.99 ± 0.03 $\mu\text{mol/L}$) al compararse con el T1 y T3, sin embargo, el T1 el día 84 fué inferior ($P<0.05$) al T2 y T3 (15.62 ± 0.03 $\mu\text{mol/L}$). Así también, el día 28 y 56 el T2 y T3 fueron similares entre sí, pero inferiores ($P<0.05$) al día 1 y 84 de la prueba (Cuadro 7). Tanaka *et al.* (2008) mencionaron que el estrés por calor estimula la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otra parte, el estrés oxidativo corresponde a un desequilibrio entre la tasa de producción de oxidantes y la de su degradación (Sorg, 2004), (Cuadro 7). Tanaka *et al.* (2008) mencionaron que el estrés

por calor estimula la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otra parte, el estrés oxidativo corresponde a un desequilibrio entre la tasa de producción de oxidantes y la de su degradación (Sorg, 2004).

Los resultados del presente estudio, mostraron que, al exponer los becerros al frío en los primeros días del experimento, los niveles de los minerales y BMZN del T2 ejercieron efecto sobre las enzimas antioxidantes, disminuyendo la liberación de ROS en los becerros, pudiendo protegerlos de un estrés oxidativo, mostrando el mismo patrón el día 84 para los T2 y T3. Lo que coincide con Prior y Cao (1999) quienes publicaron que un incremento en la producción de ROS puede causar una disminución en la capacidad antioxidante total *in vivo*. Rodríguez (2008) reportó que ovinos engordados con una dieta con manzarina, presentaron un incremento de AA con respecto al grupo testigo (24.34 y 21.79 $\mu\text{mol/L}$). En otro estudio Gallegos (2007) publicó que vacas Holstein en producción alimentadas con manzarina, mostraron mayor AA (22.52 $\mu\text{mol/L}$) con respecto al grupo control (18.65 $\mu\text{mol/L}$) al final de la prueba. Hahn y Mander (1997) reportaron que los bovinos requieren alrededor de 3 o 4 días después de iniciado un cambio calórico para disminuir totalmente los efectos de la carga calórica, seguido de una recuperación del poder total antioxidante en su cuerpo (Worapol *et al.*, 2011).

Biometría Hemática

El Cuadro 8 y 9 muestran los niveles hematológicos y los parámetros de referencia. Los leucocitos (Leu), linfocitos (Lin), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y plaquetas (Pq) presentaron

Cuadro 7. Medias ($\pm$ EE) de la actividad antioxidante ($\mu\text{mol/L FeSO}_4$)² en plasma sanguíneo de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Día de muestreo	Tratamientos ¹		
	T1	T2	T3
1	15.73 $\pm$ 0.03 ^{b x}	15.99 $\pm$ 0.03 ^{a x}	15.81 $\pm$ 0.03 ^{b x}
28	15.62 $\pm$ 0.03 ^{a y}	15.64 $\pm$ 0.03 ^{a z}	15.62 $\pm$ 0.03 ^{a z}
56	15.58 $\pm$ 0.03 ^{a y}	15.61 $\pm$ 0.03 ^{a z}	15.62 $\pm$ 0.03 ^{a z}
84	15.62 $\pm$ 0.03 ^{b y}	15.72 $\pm$ 0.03 ^{a y}	15.71 $\pm$ 0.03 ^{a y}

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamiento.

^{x,y,z} Medias con diferente literal en columna, son diferentes ($P < 0.05$) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

² $\mu\text{mol/L FeSO}_4$ (micromolar de actividad reductiva de FeSO_4), por litro de plasma sanguíneo.

Cuadro 8. Medias ($\pm$ EE)² de células blancas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Células	Día de muestreo	Tratamiento			Valores de BH ³
		T1	T2	T3	
Leucocitos (10 ³ /μL)	56	7.58 $\pm$ 0.95	8.18 $\pm$ 0.95 ^y	9.65 $\pm$ 1.00 ^y	4-12
	84	9.82 $\pm$ 0.95 _x	11.11 $\pm$ 0.95 ^x	10.80 $\pm$ 1.00 ^y	
Neutrófilos (%)	56	3.22 $\pm$ 0.76	6.67 $\pm$ 0.76 ^a	5.87 $\pm$ 0.80 ^a	15-45
	84	4.44 $\pm$ 0.76 _a	4.22 $\pm$ 0.76 ^a	5.00 $\pm$ 0.80 ^a	
Linfocitos (%)	56	65.00 $\pm$ 4.6	73.00 $\pm$ 4.69	74.00 $\pm$ 4.97	45-75
	84	74.44 $\pm$ 4.6 _a	76.89 $\pm$ 4.69	71.50 $\pm$ 4.97	
Cél. Mixtas (%)	56	31.78 $\pm$ 4.5	20.33 $\pm$ 4.51	20.12 $\pm$ 4.78	2-20
	84	21.11 $\pm$ 4.5 _a	18.89 $\pm$ 4.51	23.50 $\pm$ 4.78	
Neutrófilos (10 ³ /μL)	56	0.24 $\pm$ 0.08	0.53 $\pm$ 0.08 ^a	0.61 $\pm$ 0.09 ^a	0.6-4
	84	0.43 $\pm$ 0.08 _a	0.48 $\pm$ 0.08 ^a	0.56 $\pm$ 0.09 ^a	
Linfocitos (10 ³ /μL)	56	4.84 $\pm$ 0.92	5.99 $\pm$ 0.92 ^y	7.12 $\pm$ 0.98 ^y	2.5-7.5
	84	7.30 $\pm$ 0.92 _x	8.73 $\pm$ 0.92 ^x	7.75 $\pm$ 0.98 ^y	
Cél. mixtas (10 ³ /μL)	56	2.49 $\pm$ 0.40	1.65 $\pm$ 0.40	1.91 $\pm$ 0.42	0-2.4
	84	2.09 $\pm$ 0.40	1.90 $\pm$ 0.40	2.49 $\pm$ 0.42	

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamiento.

^{xy} Medias con diferente literal en columna, son diferentes (P<0.05) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

² Medias sin literal en fila y columna, no mostraron diferencia (P>0.05).

³ Valores de biometría hemática de bovinos.

Cuadro 9. Medias ($\pm$ EE)² de células rojas de biometría hemática de becerros alimentados con tres dietas diferentes

Células	Día de muestreo	Tratamiento			Valore de BH ³
		T1	T2	T3	
Eritrocitos (10 ⁶ /μL)	56	5.14 $\pm$ 0.41	5.40 $\pm$ 0.41	5.32 $\pm$ 0.44	5-10
	84	5.51 $\pm$ 0.41	6.54 $\pm$ 0.41	5.92 $\pm$ 0.44	
Hemoglobina (g/dL)	56	11.45 $\pm$ 0.50	11.33 $\pm$ 0.50	11.72 $\pm$ 0.53	8-15
	84	11.20 $\pm$ 0.50	12.62 $\pm$ 0.50	11.60 $\pm$ 0.53	
Hematocrito (%)	56	38.42 $\pm$ 2.41	34.02 $\pm$ 2.41	33.77 $\pm$ 2.56	24-46
	84	33.60 $\pm$ 2.41	37.87 $\pm$ 2.41	34.80 $\pm$ 2.56	
VCM (fL)	56	73.78 $\pm$ 3.26 ^x	63.51 $\pm$ 3.25 ^x	64.09 $\pm$ 3.45 ^x	40-60
	84	61.87 $\pm$ 3.26 ^y	59.69 $\pm$ 3.25 ^x	59.31 $\pm$ 3.45 ^x	
HCM (Pg)	56	22.50 $\pm$ 0.86 ^x	21.15 $\pm$ 0.86 ^x	22.36 $\pm$ 0.91 ^x	11-17
	84	20.17 $\pm$ 0.86 ^y	19.89 $\pm$ 0.86 ^x	19.77 $\pm$ 0.91 ^y	
CHCM (g/dL)	56	31.47 $\pm$ 1.07	33.29 $\pm$ 1.07	35.35 $\pm$ 1.14	30-36
	84	33.30 $\pm$ 1.07	33.30 $\pm$ 1.07	33.30 $\pm$ 1.14	
Plaquetas (10 ⁵ /μL)	56	5.69 $\pm$ 0.37 ^x	5.67 $\pm$ 0.37 ^x	4.35 $\pm$ 0.40 ^x	1-8
	84	2.41 $\pm$ 0.37 ^y	2.70 $\pm$ 0.37 ^y	2.06 $\pm$ 0.40 ^y	

^{xy} Medias con diferente literal en columna, son diferentes (P<0.05) entre día de muestreo.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

² Medias sin literal en fila y columna, no mostraron diferencia (P>0.05).

³ Valores de biometría hemática de bovinos.

efecto ($P<0.05$) del día de muestreo; los neutrófilos (Neu) en % y μL presentaron diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos.

Leucocitos y linfocitos. Las concentraciones de Leu y Lin el día 84 de muestreo presentaron aumento significativo ($P<0.05$) en el T1 y T2 mostrando 9.82 ± 0.95 y $11.11\pm0.95 \times 10^3/\mu\text{L}$ para Leu y 7.30 ± 0.92 y $8.73\pm0.92 \times 10^3/\mu\text{L}$ para Lin, respectivamente. Cabe mencionar que el T2 y T3 superaron el nivel máximo dentro de la especie en Lin (Cuadro 8). Los becerros que recibieron IL en su dieta mantuvieron la cantidad de Leu y Lin cerca del nivel máximo para estas variables, sin mostrar variaciones significativas a través del tiempo.

El día 56 de muestreo fué donde se observó la menor cantidad de Leu y Lin, tal vez debido a la presencia de un cuadro de estrés, provocado por las bajas temperaturas promedio registradas durante los días 1, 28 y 56 (-7.3 , -3.0 y 0.9 °C) del experimento seguido por la disminución en la concentración de Zn, Mn y AA lo que repercutió en la disminución de estas células exponiendo a los becerros a una liberación de ROS. Sin embargo, el día 84 incrementaron la cantidad de células blancas, minerales y AA, lo cual puede relacionarse con la recuperación de su confort, superando el desafío de estrés térmico sin haber mostrado signos clínicos adversos.

Gupta *et al.* (2007) mencionaron que existe una estrecha relación entre el perfil de leucocitos y el nivel de glucocorticoides plasmáticos durante el estrés fisiológico; estas hormonas pueden actuar incrementando el número y porcentaje de neutrófilos, mientras que disminuyen los linfocitos (Blanco *et al.*, 2009). Buckham *et al.* (2008) publicaron que los linfocitos circulantes se adherían a las células endoteliales que cubren las paredes de los vasos sanguíneos como respuesta al incremento de los

glucocorticoides durante el estrés, y posteriormente pasan de la circulación a tejidos como los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo y piel donde son retenidos, produciendo por lo tanto una disminución del número de linfocitos circulantes.

En otra investigación, Rodríguez (2008) reportó que ovinos engordados con manzanarina en su dieta, presentaron un incremento de leucocitos (9.49 y $8.78 \times 10^3/\mu\text{L}$) al finalizar la prueba. Gallegos (2007) publicó que vacas Holstein en producción alimentadas con y sin manzanarina, no presentaron efecto ($P>0.05$) en la cantidad de leucocitos en sangre.

Neutrófilos. Los tres tratamientos durante la prueba estuvieron por abajo del límite inferior de Neu en porcentaje y concentración, excepto el T3 al día 56. A pesar de este comportamiento, el T1 presentó la menor ($P<0.05$) cantidad de Neu el día 56 ($3.22\pm0.76\%$ y $0.24\pm0.08 \times 10^3/\mu\text{L}$), con respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 8).

La baja cantidad de Neu tal vez se debió a la baja concentración de Zn y Mn el día 56, sin lograr alcanzar la cantidad óptima al final de la prueba a pesar del incremento de los minerales en mención. Por otra parte, aún y cuando estuvieron por abajo del límite inferior, el T1 el día 56 fue el más perjudicado con respecto al T2 y T3. Aunado a esto, se observó que los animales del T2 y T3 mostraron mayor nivel de Neu que el T1 durante la prueba. Rodríguez (2008) reportó efecto de sexo en ovinos alimentados con manzanarina, donde las hembras que recibieron manzanarina tuvieron mayor cantidad de neutrófilos que los machos (59.2 y 50.2 %, respectivamente) del grupo control. Por otro lado, Gallegos (2007) no encontró diferencia en vacas Holstein en producción alimentadas con y sin manzanarina (34.27 y 35.98 %).

Romero *et al.* (2011) mencionaron que los neutrófilos proliferan en la circulación como respuesta a infecciones, inflamaciones y al estrés; disminuyendo en ciertas infecciones y estados de anafilaxia. Por otro lado, los glucocorticoides de animales estresados estimulan el flujo de neutrófilos desde la médula ósea hacia la sangre y reducen el paso de estos hacia otros compartimentos, generando un incremento de neutrófilos maduros e inmaduros en la circulación sanguínea (Buckham *et al.*, 2008).

Volumen corpuscular medio. Los valores de VCM de los tres tratamientos el día 56 superaron el nivel máximo dentro de la especie, así mismo, el VCM del T1 el día 84 aún y cuando fué inferior (61.87 ± 3.26 fentolitros (fL)) al día 56, sobre pasó el nivel máximo (Cuadro 9).

La alta cantidad de VCM que se observó el día 56 y 84 de la prueba en el T1, tal vez le perjudicó la baja cantidad de Zn, Mn y AA, lo que pudo haber incrementado una reacción inflamatoria y anemia macrocítica. El incremento del VCM es un indicador de anemia macrocítica, mientras los eosinófilos disminuyen ante el aumento a la reacción inflamatoria (Rodostitis *et al.*, 2000). En este estudio puede ser que haya existido una disminución de la concentración de Fe por efecto de los niveles altos de Mn y Cu mostrados en esta investigación, lo que coincidió con lo publicado de Reeves *et al.* (2004). Así mismo, Jenkins y Hiridoglou (1991) mencionaron que altas concentraciones de Mn afectan el metabolismo de Fe en bovinos, resultando en una disminución del volumen del paquete celular y de la hemoglobina, lo que reduce la capacidad de unión de Fe en suero. Por otro lado, Rodríguez (2008) encontró un comportamiento similar al adicionar manzanarina en la dieta de ovinos, donde los animales suplementados disminuyeron la cantidad de VCM en comparación con el grupo testigo (32.99 y 33.57 fL) pero sin desviarse de los valores normales dentro

de la especie. En otro estudio, Coppo y Mussart (2006) no encontraron efecto significativo al suplementar vaquillas con orujo de citrus en época invernal durante 90 días con respecto al grupo control (46.5 y 47.0 fL).

Hemoglobina corpuscular media. Los niveles de HCM de los tres tratamientos en los dos días de muestreo superaron el nivel máximo de referencia (Cuadro 9), el día 84 el T1 y T3 disminuyeron ($P<0.05$) con respecto al día 56 (20.17 ± 0.86 y 19.77 ± 0.91 picogramos (Pg), respectivamente), pero superaron lo reportado por Aiello y Mays, 2000. Existen reportes que la HCM indica la concentración de hemoglobina en base a la cantidad de glóbulos rojos, de manera similar a lo que indica la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), aunque esta última es la que se considera más adecuada. Rodríguez (2008) encontró diferencia significativa entre sexo de ovinos y muestreo, donde los machos fueron superiores a las hembras (12.74 y 12.10 Pg), así mismo, superaron el rango mayor dentro de la especie. En otro estudio, Coppo y Mussart (2006) encontraron efecto significativo al suplementar vaquillas con orujo de citrus en época invernal durante 90 d con respecto al grupo control (16.6 y 14.5 fL, respectivamente).

Plaquetas. La cantidad de Pq de los tres tratamientos (Cuadro 9) fue mayor ($P<0.05$) el día 56 con respecto al día 84 (5.69 ± 0.37 , 5.67 ± 0.37 y $4.35\pm0.40 \times 10^5/\mu\text{L}$ para el T1, T2 y T3, respectivamente). Las Pq presentaron efecto de muestreo, el día 56 fué donde se observaron las mayores cantidades, lo que pudo deberse al incremento de anticuerpos que se observaron durante la prueba, como lo han indicado otros estudios. Aiello y Mays (2000) mencionaron que la disminución en la producción de plaquetas puede deberse a fármacos, toxinas y en algunos casos a la actividad inmunológica, debido a la producción de anticuerpos que se pueden unir a la superficie

de las mismas. Los tres tratamientos mostraron la menor cantidad de Pq el día 84, debido tal vez al incremento numérico de glóbulos blancos observados. Rodríguez (2008) reportó un efecto entre sexo de ovinos y muestreo, donde los machos en el segundo muestreo fueron superiores que las hembras mostrando valores de 7.6 y 5.4 x 10³/μL. Por otro lado, Gallegos (2007) no encontró diferencia (P>0.05) en la cantidad de plaquetas al suplementar vacas Holstein en producción con y sin manzarina (4.5 y 3.8 x 10³/μL).

FOR AUTHOR USE ONLY

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó este trabajo, se concluye que la adición de un inóculo de levaduras en la dieta de becerros en crecimiento aumentó el CDA y CA.

A temperaturas ambientales bajas se observó la mayor concentración de Zn en suero sanguíneo, disminuyendo el Mn y Cu el día 28. Así mismo, los becerros que recibieron BMZN e IL tuvieron mayor AA al final de la prueba. Sugerimos que este comportamiento se debió a que favorecieron a las enzimas antioxidantes y por lo tanto disminuyeron la liberación de ROS.

Los leucocitos, linfocitos, VCM, HCM y plaquetas mostraron diferencia a través de los días de muestreo. Así mismo, el T1 presentó menor cantidad de Neu en % y en μL el día 56. Estos cambios indican a que el estrés térmico ocurrido en los animales, perjudicó a las células blancas disminuyendo su cantidad e incrementando el número de células rojas.

Es recomendable que se realice más investigación con los suplementos de BMZN e IL, exponiendo a los becerros precozmente destetados a temperaturas menos estresantes.

LITERATURA CITADA

- Aiello, S. E. y A. Mays. 2000. El Manual Merck de Veterinaria. 5ta ed. Océano Grupo Editorial, S. A. España.
- Aksu, T., B. Özsoy, D. S. Aksu, M. A. Yörük y M. Gül. 2011. The effects of lower levels of organically complexed zinc, copper and manganese in broiler diets on performance, mineral concentration of tibia and mineral excretion. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17: 141-146.
- Arias, R. A. 2006. Environmental factors affecting daily water intake on cattle finished in feedlots. Master Thesis, University of Nebraska-Lincoln, Nebraska, E. U. A.
- Arias, R. A., T. L. Mader y P. C. Escobar. 2008. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch. Med. Vet.* 40:7-22.
- Arredondo, M., P. Munoz, C. V. Mura y M. Nunez. 2003. DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284:C1525-C1530.
- Becerra, A., C. Rodríguez, J. Jiménez, Q. Ruiz, A. Elías y A. Ramírez. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. *TECNOCIENCIA Chihuahua.* 2:7-14.
- Benzie, I. F. F. y J. J. Strain. 1996. Ferric reductive ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.
- Biricik, H. y İ. İ. Türkmen. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber of different forage: concentrate ratios in diets. *J. Fac. Vet. Med.* 20:29-37.
- Blanco, M., I. Casasús y J. Palacio. 2009. Effect of age at weaning on the physiological stress response and temperament of two beef cattle breeds. *Animal.* 3:108-117.
- Buckham Sporer, K. R., P. S. D. Weber, J. L. Burton, B. Earley y A. Crowe. 2008. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *J. Anim. Sci.* 86:1325-1334.
- Castillo, C., J. Hernández, M. García Vaquero, M. López Alonso, V. Pereira, M. Miranda, I. Blanco y J. L. Benedito. 2012. Effect of moderate Cu supplementation on serum metabolites, enzymes and redox state in

- feedlot calves. Vet Res. Commun. 93:269-274.
- Cerone, S. I., A. S. Sansinanea, S. A. Streitenberg, M. C. García y N. J. Auza. 2000. Bovine monocyte-derived macrophage function in induce copper deficiency. Gen Phy Biophys. 19:49-58.
- Chew, P. B. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. J. Nutr. 125: 1804S-1808S.
- Coppo, J. A. y N. B. Mussart. 2006. Orujo de citrus como suplemento invernal de vaquillas cruza cebú en Argentina. Vol. VII, No. 04, abril.
- Cuesta, M. M., D. J. R. García, P. E. A. Silveira y G. Y. Pino. 2011. Administración parenteral de un compuesto de zinc, cobre y manganeso en vacas lecheras. Revista Electrónica de Veterinaria. 12:28-36.
- Czarnecki-Maulden, G. L. 2008. Effect of dietary modulation of the intestinal microbiota on reproduction and early growth. Theriogenology 70:286-290.
- Delfino, J. G. y G. W. Mathison. 1991. Effects of cold environment and intake level on the energetic efficiency of feedlot steers. J. Anim. Sci. 69:4577-4587.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter y D. Sauvant. 2009. Metaanalysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92:1620-1632.
- Díaz, P. D. 2006. Producción de proteína microbial a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih. Mex.
- Dorton, K. L., T. E. Engle, R. M. Enns y J. J. Wagner. 2007. Effects of trace mineral supplementation, source and growth implants on immune response of growing and finishing feedlot steers. The Professional Animal Scientist. 23:29-35.
- Droker, A. E. y J. W. Spears. 1993. *In vitro* and *in vivo* immunological measurements in growing lambs fed diets deficient, marginal or adequate in zinc. J. Nutr. Immunol. 2:71-90.
- Gallegos, A. M. A. 2007. Conteo de células somáticas en leche, actividad antioxidante del plasma y componentes celulares sanguíneos de vacas holstein en producción alimentadas con manzanarina en la dieta. Disertación Doctoral. Facultas de Zootecnia y Ecología. Universidad

Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. Mex.

- Gooneratne, S. R., W. T. Buckley y D. A. Christensen. 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci.* 69:819-845.
- Grace, N. D. 1973. Effect of high dietary Mn levels on the growth rate and the level of minerals elements in the plasma and soft tissues of sheep. *New Zeal J. Agric. Res.* 16:177-180.
- Gupta, S., B. Earley y M. A. Crowe. 2007. Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and hematological parameters in bull housed at different space allowances. *Vet. J.* 173:605-616.
- Hambridge, K. M., C. E. Casey y N. F. Krebs. 1986. Zinc. In trace elements in human and animal nutrition. 5th ed. Walter Mertz. Academic Press. Inc., Londres. Reino Unido.
- Huerta, J. M., M. E. C. Ortega y M. P. Cobos. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Revista de Ciencia y Tecnología de America.* 30:728-734.
- INAFED. 2010. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/chihuahua/>. Consultado en septiembre 10, 2012.
- Ivan, M. y C. M. Grieve. 1976. Effects of zinc, copper and manganese supplementation of high-concentrate ratio non gastrointestinal absorption of copper and manganese in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 59:1764-1768.
- Jenkins, K. J. y M. Hidirolou. 1991. Tolerance of the preruminant calf for excess manganese or zinc in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 74:1047-1053.
- Jimenez, A., E. Planells, P. Aranda, M. Sánchez-Viñas y J. Llopis. 1997. Changes in bioavailability and tissue distribution of copper caused by magnesium deficiency in rats. *J. Agric. Food Chem.* 45:4023-4027.
- Makino, T. y K. Takahara. 1981. Direct determination of plasma copper and zinc in infants by atomic absorption with discrete nebulization. *Clin. Chem.* 27:1445-1447.
- McDowell, L. R. y J. D. Arthington. 2005. *Minerales para Ruminantes en Pastoreo en Regiones Tropicales*. 4ta. ed. Dep. Zoot. Universidad de Florida. Gainesville. IFAS. E. U. A.

- Mertz, W. y G. K. Davis. 1987. Copper. In: Mertz W, editor. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Vol I. 5th ed. Philadelphia: Academic Press. E. U. A.
- Moberg, G. P. 1987. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. J. Anim. Sci. 65:1228-1235.
- Mujibi, F. D. N., S. S. Moore, D. J. Nkrumah, Z. Wang y J. A. Basarab. 2010. Season of testing and its effect on feed intake and efficiency on growing beef cattle. J. Anim. Sci. 88: 3789-3799.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes y V. W. Rodwell. 2000. Harper's Biochemistry. 25th ed. p 135, 223. McGraw Hill Health Professional Division, New York. E. U. A.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace y F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. British J. Nutr. 76:249-251.
- NRC. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC. E. U. A.
- Piomelli, S., V. Jansen y F. Dancis. 1973. The hemolytic anemia of magnesium deficiency in adult rats. Blood. 41:451-459.
- Planells, E., P. Aranda, A. Lerma y J. Llopis. 1994. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. Brit. J. Nutr. 72:315-323.
- Prior, R. L. y G. Cao. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radic Biol Med. 27:1173-1181.
- Quiroz-Rocha, G. F. y J. Bouda. 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. Vet. Méx. 32:289-296.
- Reeves, P. G., N. V. C. Ralston, J. P. Idso y H. Lukaski. 2004. Contrasting and cooperative effects of copper and iron deficiencies in male rats fed different concentrations of manganese and different sources of sulfur amino acids in an AIN-93G-based diet. J. Nutr. 134:416-425.
- Rodostitis, O. M., C. C. Gay, D. C. Blood y K. W. Hinchliff. 2000. Veterinary Medicine, 9th ed. Harcourt Publisher, Londres. Reino Unido.
- Rodríguez, R. H. E. 2008. Obtención de Manzanarina a Partir de Subproductos de Manzana y su Efecto Sobre la Salud de Borregos en Engorda. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih. Mex.

- Rodríguez-Muela, C., D. Díaz, F. Salvador, O. Ruiz, C. Arzola, A. Flores, O. La O y A. Elías. 2010. Efecto del nivel de urea y pasta de soya en la concentración de proteínas durante la fermentación en estado sólido de la manzana (*Malus domestica*). Rev. Cubana de Cien. Agríc, 44:23-26.
- Romero, P. M. H., L. F. Uribe-Velásquez y V. J. A. Sánchez. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. Biosalud. 10:71-87.
- Sanchez-Morito, N., E. Planells, P. Aranda y J. Llopis. 1999. Magnesium-Manganese Interactions Caused by Magnesium Deficiency in Rats. J. Am. Coll. Nutr. 18:475-480.
- SAS. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.
- Solaiman, S. G., T. J. Craig Jr., G. Reddy y C. E. Shoemaker. 2007. Effect of high levels of Cu supplement on growth performance, rumen fermentation, and immune responses in goats kids. Small Rumin. Res. 69:115-123.
- Sorg, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? C. R. Biol. 327:649-662.
- Spears, J. W. 2000. Micronutrient and immune function in cattle. Proceedings of the Nutrition Society. 59:587-594.
- Spears, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability ruminants. J. Nutr. 133:1506-1509.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1997. Bioestadística. Principios y Procedimientos. 2a ed. McGraw-Hill. México.
- Suttle, N. F. y C. H. McMurray. 1983. Use of erythrocyte copper-zinc superoxide dismutase activity and hair or free concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. Res. Vet. Sci. 35:47-52.
- Tanaka, M., Y. Kamiya, T. Suzuki, M. Kamiya y Y. Nakai. 2008. Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows. J. Anim. Sci. 79:481-486.
- van der Peet-Schwering, C. M. C., A. J. M. Jansman, H. Smidt y I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. J. Anim. Sci. 85:3099-3109.
- Villagran, D., Rodríguez-Muela, C., Burrola, E., González, E., Ortega, A. 2009. Identificación de levaduras involucradas en la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana. Página 2 en Memorias de la XLV Reunión

Nacional de Investigación Pecuaria. Saltillo, Coah, Méx.

Wikse, S. E., D. Herd, R. Field y P. Holland. 1992. Diagnosis of copper deficiency in cattle. *J. Anim. Vet. Med. Assoc.* 200:1625-1629.

Worapol, A., K. Watee y B. Thongchai. 2011. Effects of shade on physiological changes, oxidative stress and total antioxidant power in Thai Brahman cattle. *Int. J. Biometeorol.* 55:741-748.

Young, B. A. 1983. Ruminant cold stress: Effect on production. *Can. J. Anim. Sci.* 57:1601-1607.

Young, B. A., B. Walker, A. E. Dixon y V. A. Walker. 1989. Physiological Adaptation to the Environment. *J. Anim. Sci.* 67:2426-2432.

FOR AUTHOR USE ONLY

ESTUDIO II.
FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS CON UN INÓCULO DE
LEVADURAS Y DE BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO PARA
BECERROS EN CRECIMIENTO

RESUMEN

FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS CON LA ADICIÓN DE UN INOCULO DE LEVADURAS Y BAGAZO DE MANZANA FERMENTADO PARA BECERROS EN CRECIMIENTO

El objetivo fue evaluar el efecto en la fermentación *in vitro* de dietas con la adición de un inóculo de levaduras y bagazo de manzana fermentado para becerros en crecimiento. Los tratamientos consistieron en: T1 (testigo): heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2: HA + EM + concentrado + bagazo de manzana (BMZN) y T3: HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL). Las variables evaluadas fueron, determinar la digestibilidad de materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y el contenido de lignina detergente ácido (LDA), el volumen de producción de gas, la concentración de ácido acético, propiónico y butírico, nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$), ácido láctico y pH. La digestibilidad *in vitro* se realizó a las 48 h, en tanto que para el resto de las variables a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Se realizó un diseño completamente al azar, las variables de la digestibilidad de la fibra se analizaron con un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento, la concentración de ácidos grasos volátiles, $N-NH_3$, ácido láctico y pH fueron analizadas con un modelo que incluyó como efectos fijos tratamiento y hora. Para producción de gas se consideraron como efectos fijos tratamiento, hora y su interacción. Para analizar los parámetros A, B y C del modelo de regresión no lineal ajustado se utilizó como efecto fijo el tratamiento. La mayor digestibilidad ($P < 0.05$) de MS (72.02 y 72.49 %), FDN (70.77 y 70.25 %), FDA (64.07 y 64.56 %) y el menor contenido de LDA (4.25 y 4.14) lo mostraron el T2 y T3. El T3

fue superior ($P<0.05$) en el volumen de producción de gas con valores de 4.20, 5.93, 6.73 y 7.33 mL/0.2 g de MS a la hora 24, 48, 72 y 96, respectivamente. La mayor concentración ($P<0.05$) de AGV la presentaron el T2 y T3 (con valores para acético, propiónico y butírico de 16.00 y 17.19, 6.54 y 6.13, 2.63 y 2.67 mmol/L, respectivamente). El T2 y T3 mostraron un incremento ($P<0.05$) al finalizar la fermentación *in vitro* en la concentración de N-NH_3 (0.21 y 0.22 mM/mL) y una disminución ($P<0.05$) de ácido láctico (1.46 y 1.37 mM/mL), en tanto que el T3 presentó un incremento ($P<0.05$) del pH (6.74). Se concluye que el adicionar BMZN e IL a la dieta de becerros en crecimiento favorece la digestibilidad de MS, FDN y FDA, disminuyendo el contenido de LDA, incrementan la concentración de AGV y N-NH_3 , provocando una disminución de ácido láctico.

ABSTRACT

IN VITRO FERMENTATION OF DIETS ADDED WITH AN INOCULUM OF YEAST AND FERMENTED APPLE BAGASSE FOR GROWING CALVES

The objective was to evaluate the effect on *in vitro* fermentation of diets added with an inoculum of yeast and fermented apple bagasse for growing calves. Treatments consisted of: T1 (control): oat hay (OH) + corn silage (CS) + concentrated; T2: OH + CS + concentrated + apple bagasse (BMZN); T3: OH + CS + concentrated + yeast inoculum (YI). The evaluated variables were dry matter digestibility (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin content (ADL), the volume of gas production, the concentration of acetic acid, propionic acid, butyric acid, ammoniacal nitrogen (N-NH₃), lactic acid and pH. The *in vitro* digestibility was conducted for forty eight h and for the rest of the variables sampling times were at 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Under a randomized design, the variables of fiber digestibility were analyzed with a statistical model that included treatment as a fixed effect, the concentration of volatile fatty acids, N-NH₃, lactic acid and pH were analyzed with a model that included treatment and time as fixed effects, for the production of gas treatment, times and their interaction were considered as fixed effects, and to examine the parameters A, B and C treatment was used as a fixed effect. The best digestibility ($P<0.05$) of the DM (72.02 and 72.49 %), NDF (70.77 and 70.25 %), ADF (64.07 and 64.56 %) and the lowest content of ADL (4.25 y 4.14) were showed by T2 and T3. The T3 was higher ($P<0.05$) in volume of gas. Production with values of 4.20, 5.93, 6.73 and 7.33 mL/0.2 g MS at 24, 48, 72 and 96 h. The highest concentration ($P<0.05$) of VFA were presented by T2 and T3 with values for acetic acid, propionic, and butyric of 16.00 and 17.19, 6.54 and 6.13, and 2.63 and 2.67 mmol/L, respectively. The T2 and

T3 showed an increased ($P<0.05$) of concentration of N-NH_3 at the end (0.21 and 0.22 mM/mL) and a decrease ($P<0.05$) of lactic acid (1.46 and 1.37 mM/mL), while the T3 increased ($P<0.05$) the pH (6.74). We conclude that adding YI and AB to the diet of the growing calves improve digestibility of DM, NDF, ADF and reduced the content of ADL, increase the concentration of VFA and N-NH_3 , causing a decrease in lactic acid.

FOR AUTHOR USE ONLY

INTRODUCCIÓN

El valor nutritivo de los alimentos se encuentra determinado por la biodisponibilidad de nutrientes y la dinámica de los procesos de solubilidad en el tracto gastrointestinal. Van Soest (1994) mencionó que la pared celular es el mayor constituyente orgánico de los forrajes, ya que comprende del 40 al 80 % de la materia seca y está constituida por polisacáridos estructurales como celulosa, hemicelulosa y lignina. Sin embargo, la digestibilidad de la fibra es limitada por el grado de madurez y lignificación de los forrajes (Akin, 1989). Diversas estrategias han sido utilizadas para mejorar la digestibilidad de los forrajes, tal como los avances agronómicos y programas de cruzamientos de forrajes (Beauchemin *et al.*, 2003).

En años anteriores, los cultivos de levaduras han sido utilizados para mejorar el valor nutritivo y la utilización eficiente de los pastos de baja calidad. Las adiciones de cultivos de levaduras en dietas para rumiantes pueden incrementar el consumo de materia seca, rendimiento productivo, degradación de celulosa y la digestibilidad de nutrientes (Lesmeister *et al.*, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ha sido ampliamente usada como suplemento en la dieta de rumiantes. Los beneficios asociados con Sc incluyen un incremento en la digestión de fibra detergente neutra (FDN) y materia seca (MS; Plata *et al.*, 1994), aumento de la tasa inicial de la digestión de la fibra (Williams *et al.*, 1991), mejora en la eficiencia microbiana y degradación de la proteína cruda (PC) *in situ* (Olson *et al.*, 1994).

Bruni y Chilibroste (2001) mencionaron que de manera alternativa a la desaparición de sustrato, se mide la producción acumulada de gas como Indicador del metabolismo del carbono, centrando su atención en la acumulación de los productos

finales de la fermentación tales como bióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y ácidos grasos volátiles (AGV). Sin embargo, las levaduras *Kluyveromyces lactis* e *Issatchenkya orientalis* han sido poco estudiadas como aditivos para mejorar la digestibilidad de dietas fibrosas en rumiantes.

Por lo anterior, el objetivo fue evaluar el efecto de un inóculo de levadura y de bagazo de manzana fermentado que contienen *Kluyveromyces lactis*, *Issatchenkya orientalis* y *Saccharomyces cerevisiae*, adicionados en la dieta de becerros destetados sobre la digestibilidad de la fibra, producción de gas y perfiles de AGV. Los resultados del presente estudio permitirán a los productores y nutriólogos pecuarios tener un mayor conocimiento sobre el uso de estos aditivos alimenticios sobre la digestibilidad de la fibra y perfil de AGV, permitiendo optimizar su uso en este tipo de animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

Esta investigación fue realizada en las instalaciones de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Chih., México, ubicada en las coordenadas 28° 35' 07" latitud norte y 106° 06' 23" longitud oeste, con una altitud de 1,517 msnm, según el sistema de posicionamiento global (GPS por sus siglas en inglés, MAGELLAN®, MobileMapper-Pro). La temperatura media anual es de 18.2 °C, con una media máxima de 37.7 °C y una media mínima de -7.4 °C. La precipitación promedio anual es de 387.5 mm, con 71 días de lluvia al año y una humedad relativa del 49 %; predominando un clima semiárido extremoso (INAFED, 2008).

Descripción de los Tratamientos

Para el desarrollo de este experimento se utilizaron las tres dietas ofrecidas a los becerros en crecimiento como se mencionó en el Experimento I. T1 (testigo): heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2: HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3: HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

Análisis Químico de las Dietas

Con la finalidad de obtener los valores compuestos de la digestibilidad de la materia seca (MS), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y contenido de lignina detergente ácido (LDA), se analizó la composición química de las fracciones de las dietas antes mencionadas. Se colectaron muestras de las dietas cada 15 d para formar muestras compuestas mensualmente. Las muestras fueron secadas a 60 °C por 48 h en una estufa de aire forzado y molidas a 1 milímetro

(mm) en un molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA), estas muestras fueron secadas a 105 °C durante 8 h en una estufa de aire forzado para determinar MS absoluta y secuencialmente fueron incineradas a 600 °C por 4 h en una mufla para determinar cenizas (AOAC, 2000). En las muestras compuestas de forraje y concentrado se determinó la concentración de FDN, FDA (Van Soest *et al.*, 1991) y LDA (Goering y Van Soest, 1970). En el análisis de FDN se utilizó sulfito de sodio (Na_2SO_3) y α -amilasa termo estable (Ankom Technology) para remover la materia nitrogenada y el almidón.

Digestibilidad *in vitro* de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta

Previo a la incubación, las bolsas fueron sumergidas en acetona para eliminar el surfactante de las mismas que inhiben la digestión microbiana, y posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente. En seguida, se pesaron las muestras compuestas de las dietas ($0.45 \text{ g} \pm 0.05$) en bolsas filtro ANKOM® F57 (25 μm de poro y dimensiones de 5 x 4 cm) identificadas y selladas con calor e incubadas *in vitro* de acuerdo a la metodología Daisy^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY-USA), la cual involucra soluciones búfer A y B e inóculo ruminal.

El medio de cultivo se preparó de acuerdo al procedimiento de ANKOM Technology®. La solución búfer A estuvo compuesta de 10 g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L de NaCl , 0.1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 g de urea en un litro de agua destilada. La solución búfer B estuvo conformada por 15 g de Na_2CO_3 y 1.0 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada. Para preparar el inóculo, las dos soluciones fueron precalentadas a una temperatura de 39 °C y mezcladas en una relación de 5:1 (1330 mL solución A y 266 mL solución B) ajustando el pH a 6.8 a 39 °C. A esta mezcla de soluciones se le adicionaron 400 mL de líquido ruminal para obtener una cantidad

de 2000 mL, la cual se repartió en las cuatro jarras del digestor DAISY^{II} (500 mL por jarra), posteriormente, se colocaron las bolsas de cada muestra por triplicado, agregando un estándar y una bolsa blanco (sin muestra) y se procedió al análisis de digestibilidad verdadera *in vitro* durante 48 h a 39 °C (± 0.5).

Después de la incubación, las bolsas se extrajeron de las jarras y se lavaron con agua de la llave hasta que el agua saliera clara. Las bolsas se secaron en una estufa de aire forzado durante tres horas a 105 °C para determinar la digestibilidad de la MS. Posteriormente, se determinó secuencialmente la FDN y FDA en el aparato ANKOM²⁰⁰ (Ankom Technology Corp., Fairport, NY) de acuerdo a la metodología descrita por Van Soest *et al.* (1991) y LDA siguiendo el procedimiento de Goering y Van Soest (1970).

Obtención del Líquido Ruminal

El líquido ruminal se colectó 15 min antes de la alimentación de los animales, para lo cual se utilizaron dos vacas Herford provistas de cánula como donadores de inóculo. Estos animales estuvieron alimentados con una dieta para mantenimiento a base de silo de maíz, teniendo agua fresca a libre acceso. El inóculo ruminal se adquirió directamente del rumen, con ayuda de 3 pliegues de gasas para coleccionar contenido ruminal y depositarlo en un recipiente (2 L) térmico atemperado a 39 °C adicionando un puño de digesta ruminal de cada semoviente. Posteriormente se transportó al laboratorio de Nutrición Animal, donde fue filtrado a través de dos capas de tela filtro, retirando la parte sólida de la tela y depositándola a una licuadora junto con líquido ruminal, licuándolos por 30 s, aplicando bióxido de carbono (CO₂) constantemente para garantizar condiciones de anaerobiosis.

La solución licuada junto con el resto de líquido ruminal fueron filtrados nuevamente y depositados a un recipiente mantenido en baño maría a 39 °C y saturado continuamente con CO₂. Este procedimiento avala que el inóculo esté compuesto por microorganismos en el líquido y en la fibra. Finalmente, un total de 400 mL de inóculo ruminal fue depositado a cada una de las jarras de digestión, donde estaba la mezcla de las soluciones búfer y fueron gaseadas por 30 s con CO₂.

Producción de Gas *in vitro*

La producción de gas (PG) *in vitro* se realizó mediante el protocolo de Menke y Steingass (1988), abordando las modificaciones mencionadas por Muro (2007). Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar la cantidad de gas producido de un alimento en un periodo de incubación, la cual está relacionada con la degradación del alimento.

El arreglo de la muestra implica el molido del sustrato en una malla de 1 mm (Menke *et al.*, 1979). El medio ruminal *in vitro* estuvo conformado por una solución A (micromineral) con 13.2 g CaCl₂·H₂O, 10.0 g MnCl₂·4H₂O, 1.0 g CoCl₂·6H₂O y 8.0 g FeCl₃·6H₂O aforados en 100 mL de agua destilada; solución B (solución búfer) con 39.0 g NaHCO₃ aforado en 1 L de agua destilada; solución C (macromineral) con 5.7 g Na₂HPO₄, 6.2 g KH₂PO₄ y 0.6 g MgSO₄·7H₂O aforados en 1 L de agua destilada; solución de rezasurina (100 mg de rezasurina) aforado en 100 mL de agua destilada, utilizada como indicador de anaerobiosis; y finalmente la solución reductora con 4.0 g 1N NaOH y 0.625 g Na₂S·9H₂O aforados en 100 mL de agua destilada.

Las soluciones A, B, C y rezasurina se agregaron a un frasco con agua destilada, el cual se introdujo al incubador rotatorio Shaker a 39 °C, posteriormente se agregó la solución reductora y se gaseó con CO₂ hasta que el color de la mezcla (saliva artificial)

se tornó de azul a rosa claro. Las incubaciones de las muestras se realizaron por triplicado más un blanco en cada una de las horas, se utilizaron frascos de vidrio de 50 mL, sellados con tapón de goma; a estos se le adicionaron 0.2 g de muestra, 10 mL de líquido ruminal y 20 mL de saliva artificial. Los frascos con muestra, líquido ruminal y saliva artificial se sellaron y se colocaron en la incubadora (Shaker I2400) a 39 °C con agitación constante (67 revoluciones por minuto; rpm), protegiéndolos de la luz durante las 96 h que duró la prueba. La presión interna de los frascos producto de la degradación del alimento, se midieron con un transductor de presión (FESTO®) a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de incubación, mediante la punción de los frascos, registrándose la presión acumulada (Theodorou *et al.*, 1994). Los resultados se expresaron en mL de PG por cada 0.2 g de MS (mL PG/0.2 g MS).

Producción y Perfiles de AGV

Se colectó una muestra de 20 mL de los frascos de PG para determinar ácidos acéticos, propiónico y butírico, a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, las cuales fueron filtradas con dos capas de gasas para separar el contenido sólido y líquido. A este último, se le determinó el pH inmediatamente, usando un potenciómetro (Combo, HANNA instruments® Inc., Woonsocket, RI), así mismo, se tomó una submuestra de 10 mL la cual fue centrifugada al momento a 3,500 xg a 4 °C por 10 min. Posteriormente el sobrenadante se depositó en viales color ámbar previamente marcados, acidificando la muestra con 0.2 mL de H₂SO₄ al 50 % y congelándola a - 20 °C hasta realizar su análisis. Previo a su medición fueron descongeladas en refrigeración a 4 °C, adicionándole ácido metafosfórico al 25 % y centrifugando nuevamente con las características antes mencionadas y preservándolas en refrigeración hasta realizar su análisis mediante cromatografía de gases (Brotz y Schaefer, 1987).

Los ácidos grasos volátiles (AGV) fueron analizados por medio de un cromatógrafo de gases (SRI 8610, SRI Instruments, CA), con una columna Alltech ECONO-CAPTM ECTM de las siguientes dimensiones: 15 m de largo, diámetro externo (0.53 mm) y 0.25 mm de diámetro interno. Se inyectó 0.6 µL a temperatura del inyector de 230 °C y detector de flama 250 °C, la rampa de temperatura del horno fue de 100 °C, 20 °C por min y 190 °C por 1 min, con un tiempo promedio de lectura de 1.51, 1.92 y 2.48 min para ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, y un tiempo de lectura neta de 6.83 min.

Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃)

Se obtuvo una muestra de 20 mL de los frascos de PG para analizar N- NH₃, a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, las cuales fueron filtradas con dos capas de gasas para separar el material sólido y líquido; determinando el pH de la misma manera que la muestra para AGV. Enseguida se colectó una submuestra de 10 mL la cual fue centrifugada de la misma forma que la muestra para AGV. Posteriormente el sobrenadante se decantó en recipientes de plástico de capacidad de 20 mL previamente rotulados, congelándose a - 5 °C para su conservación hasta el momento de su análisis; previo a su medición se descongelaron a 4 °C y su concentración se determinó por colorimetría según la técnica de Broderick y Kang (1980).

La ecuación de predicción para calcular la concentración de N-NH₃, se obtuvo del análisis por triplicado de soluciones estándar con niveles de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 µL de N-NH₃/mL, utilizando agua destilada como blanco en el punto cero (0 µL). El procedimiento para medir la absorbancia de las muestras, la solución estándar y los blancos, se desarrolló de la siguiente manera: en tubos de ensayo se adicionaron 920 µL de agua destilada y 80 µL de la muestra concentrada para completar 1 mL, se

mezclaron en vórtice (Vortex Genie II) posteriormente se tomaron 50 μL de la muestra diluida para cada repetición y se depositaron en tubos de ensayo, añadiéndole 2.5 mL de fenol y se mezcló en vórtice, enseguida se adicionó 2 mL de hipoclorito, mezclándose nuevamente; para el estándar o blanco se agregó 50 μL de agua destilada, 2.5 mL de fenol y 2 mL de hipoclorito, las soluciones obtenidas se mezclaron en vórtice y se incubaron por 5 min en baño maría (90 a 100 °C).

A continuación, las muestras se dejaron enfriar por 5 min a temperatura ambiente para después tomar lectura de la absorbancia de cada muestra, se midió a una longitud de onda de 630 nanómetros (nm), previamente el valor de la absorbancia fue ajustado a 0 utilizando blancos como referencia. Con los resultados obtenidos de la absorbancia, la ecuación de predicción obtenida con la solución estándar y el porcentaje de dilución de las muestras líquidas, se calculó la concentración de N-NH_3 en milimolar por mililitro de muestra (mM/mL).

Ácido Láctico

Se colectó una muestra de 20 mL de los frascos de PG para analizar ácido láctico, a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h; siendo el procedimiento del manejo de la muestra similar a la variable de N-NH_3 hasta el momento de su análisis. La concentración de ácido láctico se determinó por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996). Para el estándar se usaron alícuotas de 5, 10, 15, 20 y 25 μL de ácido láctico/mL y agua destilada como blanco (0 μL de ácido láctico/mL).

El análisis se realizó por triplicado, se añadieron 3 mL de H_2SO_4 concentrado y 0.5 mL de la muestra diluida en tubos de ensayo, del estándar (blanco), las soluciones obtenidas se mezclaron en vórtice (Vortex Genie II) y se incubaron por 10 min en baño maría (95 a 100 °C).

Posteriormente, se adicionaron 100 µL de solución de CuSO₄ al 4 % y 200 µL de solución de 1.5 % de p-fenilfenol en etanol al 95 % en cada tubo, mezclándose nuevamente y se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente (no menos de 20 °C). La absorbancia del contenido de cada tubo se midió a una longitud de onda de 570 nm. Con la concentración de ácido láctico y la ecuación de predicción obtenida con las soluciones estándar y el porcentaje de dilución de las muestras, se calculó la concentración de ácido láctico en milimolar por mililitro de muestra (mM/mL).

Análisis Estadístico

Para el análisis de la digestibilidad de MS, FDN, FDA y LDA se utilizó un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento en un diseño completamente al azar. Por otra parte, para las variables de ácidos acético, propiónico, butírico, N-NH₃, ácido láctico y pH, se utilizó un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento y hora. Así también, la producción de gas se analizó con un modelo similar que incluyó como efectos fijos tratamiento, hora y su interacción. Para analizar los parámetros A, B y C del modelo de regresión no lineal ajustado se utilizó como efecto fijo el tratamiento. Se utilizó la prueba de Tukey para establecer las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos (Steel y Torrie, 1997).

Las cantidades de PG acumulada *in vitro* se ajustaron al modelo no lineal monofásico de Groot *et al.* (1996), calculando los parámetros de fermentación A, B y C con el procedimiento NLIN del SAS 9.0 (SAS, 2004).

$$G = A / (1 + (B / t)^c)$$

Dónde:

G.- Media de la producción de gas (mL 0.2 g de MS) para un tiempo de incubación dado.

A.- Asíntota de producción de gas (mL 0.2 g de MS).

B.- Tiempo (h) después de la incubación en el cual la mitad de la producción de gas ha sido alcanzada.

C.- Constante que determina la forma y las características del perfil de la curva y, por lo tanto, la posición del punto de inflexión.

t.- Variable predictora que representa el tiempo de incubación en horas.

Para analizar los parámetros A, B y C se restó la PG del blanco a cada una de las muestras (triplicado) para obtener la cantidad total acumulada en cada una de las horas de fermentación *in vitro*. Posteriormente, los valores acumulados de cada repetición en su hora de muestreo se analizaron con el modelo de Groot *et al.* (1996) para obtener dichos parámetros, estos mismos fueron analizados con PROC GLM para establecer mediante Tukey las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos, declarando efecto significativo cuando los valores de P fueron < 0.05 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digestibilidad *in vitro* de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta

Digestibilidad de la materia seca. El Cuadro 10 muestra la digestibilidad de la MS, FDN, FDA y el contenido de LDA por tratamiento. La mayor digestibilidad de la MS se observó en el T2 y T3 con valores de 72.02 y 72.49 %, siendo superiores ($P<0.05$) al T1 cuyo valor fué de 64.57 %. Esta respuesta ha sido asociada con la mejora en la digestibilidad de la fibra, específicamente FDN y FDA que mostraron ambos tratamientos, así también, en el menor contenido de LDA.

Sauvant *et al.* (2004) observaron una tendencia a incrementar la digestibilidad de la materia orgánica (MO; 0.5 %) en vacas Holstein en el periodo seco que recibieron un cultivo de levadura en su dieta con respecto al grupo control. Por otra parte, el mismo año publicaron que la suplementación con cultivos de levadura de Sc (0, 2.5 y 5 g/d) en cabritos de la raza Nubia incrementaron la digestibilidad de la MO en su dieta por 12.1 y 10.1 % y la digestibilidad de la FDN por 13.3 y 10.5 % para 2.5 y 5 g/d con respecto a la dieta control (Fadel El-seed *et al.*, 2004). En otro trabajo, reportaron que la digestibilidad de MS, FDN y FDA de heno de bersín fue mayor cuando se adicionó inóculo de levadura de Sc (22.5 g/d), al contrastarse con la adición de 11.25 g/d en la dieta basal de corderos en engorda (El-Waziry y Ibrahim, 2007).

En este estudio se observó mayor digestibilidad de la MS en el T2 y T3, mostrando un incremento de 11.54 y 12.27 % con respecto al T1, esto tal vez debido a que el BMZN e IL mejoraron el ambiente microbial de las bacterias celulolíticas y como consecuencia aumentaron la digestibilidad de la MS.

Cuadro 10. Medias ($\pm$ EE) de la digestibilidad *in vitro* de las fracciones de la fibra de dietas conteniendo bagazo de manzana fermentado y un inóculo de levaduras

Digestibilidad (%)	Tratamiento ¹			EE ($\pm$)
	T1	T2	T3	
MS	64.57 ^b	72.02 ^a	72.49 ^a	0.82
FDN	67.32 ^b	70.77 ^a	70.25 ^a	0.82
FDA	60.53 ^b	64.07 ^a	64.56 ^a	0.82
LDA	5.55 ^a	4.25 ^b	4.14 ^b	0.04

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamiento. ¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

Lo que coincide con otros autores, quienes reportaron que la suplementación con levadura incrementa la digestibilidad de nutrientes debido a que estimulan el crecimiento de la población microbial del rumen (Harrison *et al.*, 1988). También se ha sugerido que las levaduras consumen el oxígeno disponible en la superficie de la ingesta fresca de alimento para mantener la actividad metabólica y así reducir el potencial redox en el rumen (Chaucheyras- Durand *et al.*, 2008). Estos cambios establecen mejores condiciones para el crecimiento de bacterias anaeróbicas estrictas como las celulolíticas, estimulando su unión a las partículas de forraje provocando un incremento en la tasa inicial de degradación de la fibra (Roger *et al.*, 1990), produciendo factores de crecimiento tales como ácidos orgánicos y vitaminas (Chaucheyras *et al.*, 1995).

Por otro lado, Ahmed y Salah (2002) desarrollaron un experimento con dos niveles de cultivo de levaduras (0, 4, 8 g/d) en la dieta de corderos en engorda, y reportaron que el coeficiente de digestión de MS mejoró en ambos niveles de levadura al compararse con la dieta control, mientras que la digestibilidad de la PC fue solamente significativa entre el control y el grupo alimentado con 8 g/d.

Así también, se ha mencionado que el tipo de dieta puede determinar el efecto de las levaduras sobre la digestibilidad. Tang *et al.* (2008) estudiaron el efecto de cultivos de levaduras sobre las características de fermentación *in vitro* de rastrojos de arroz, trigo y de maíz, y reportaron que el cultivo de levadura (0, 2.5 y 7.5 g/kg de MS) incrementó la digestibilidad de MS *in vitro* para cada tipo de rastrojo. Por otra parte, al adicionar un cultivo de levadura de Sc (10 g/d) en tres dietas de novillos que consistieron en 75 % de silo de alfalfa y 25 % de cebada, 96 % de silo de maíz y 4.0 % de pasta de soya, 75 % de grano roado de cebada y 25 % de heno de alfalfa,

reportaron que el coeficiente de digestibilidad de las dietas para MS, PC, FDA y FDN no difirieron en la inclusión de levadura, excepto para la dieta alta en grano, en la cual el cultivo de levadura incremento la digestibilidad de la MS y PC (Mir y Mir, 1994).

Digestibilidad de la FDN y FDA. El mayor porcentaje en la digestibilidad de la FDN lo presentaron el T2 y T3 con valores de 70.77 y 70.25 %, siendo superiores ($P<0.05$) al T1 cuyo valor fué de 67.32 %. Así mismo, ambos tratamientos también mostraron la mayor digestibilidad de FDA alcanzando 64.07 y 64.56 % para el T2 y T3 con respecto al T1 con valor de 60.53 %. Estos resultados coinciden con Kholif y Khorshed (2006) quienes reportaron un efecto positivo en la suplementación con levadura a búfalas lactantes sobre la digestibilidad de la FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y PC. Por otra parte, otros autores mencionaron que la digestibilidad de PC y FDA fué significativamente mayor por la adición de cultivo de levadura de 10 y 20 g/d en vacas frescas alimentadas con una dieta basal de silo de maíz, la digestibilidad de PC con 0, 10 y 20 g/d mostró valores de 78.5, 80.8 y 79.5 % y la digestibilidad de la FDA de 54.4, 60.2 y 56.8 %, respectivamente (Wohlt *et al.*, 1998).

En el presente estudio, el tratamiento con BMZN y al que se le adicionó IL tuvieron mayor digestibilidad de la FDN y FDA. Esto tal vez debido a que estimularon el ambiente microbioal incrementando el número de bacterias celulóliticas mejorando la degradación de la fibra. Lo que coincidió con Koul *et al.* (1998) quienes observaron un incremento en el número total de bacterias, bacterias celulóliticas y proteolíticas cuando se adicionó un cultivo de levadura a vacas Holstein no lactantes. Así mismo, Harrison *et al.* (1988) comentaron que la digestibilidad de nutrientes incrementa al utilizar cultivos de levadura en la dieta de rumiantes, lo que se atribuye a la estimulación del crecimiento en número de la población microbioal en rumen.

Teniendo un efecto directo con los componentes fibrosos de la dieta, siendo aquellos fermentados, pero con lento avance del retículo rumen al tracto digestivo posterior, tienen gran efecto en el tiempo de llenado del rumen (Allen, 1996). Por otra parte, Fadel El-seed *et al.* (2004) publicaron que el incremento en la digestibilidad de la FDN puede disminuir el efecto de llenado del rumen, lo cual puede aumentar el consumo de alimento.

Digestibilidad de la LDA. El mayor contenido ($P<0.05$) de LDA lo reveló el T1 con 5.55 % con respecto al T2 (4.25) y T3 (4.14). Estos últimos fueron similares entre sí. Esta respuesta ha sido asociada a la baja digestibilidad de la MS, FDN y FDA lo que provocó el incremento de LDA. La lignina es el componente principal de la estructura de la pared celular de las plantas, incrementando a través de la madurez (Guo *et al.*, 2001), lo que afecta la digestibilidad del tejido vegetal (Van Soest, 1994), ya que generalmente se encuentra adherida a los carbohidratos estructurales de las paredes celulares proporcionando soporte a la planta (Whetten y Sederoff, 1995), lo cual está negativamente correlacionado con la calidad y digestibilidad del forraje por los rumiantes (Sewalt *et al.*, 1996).

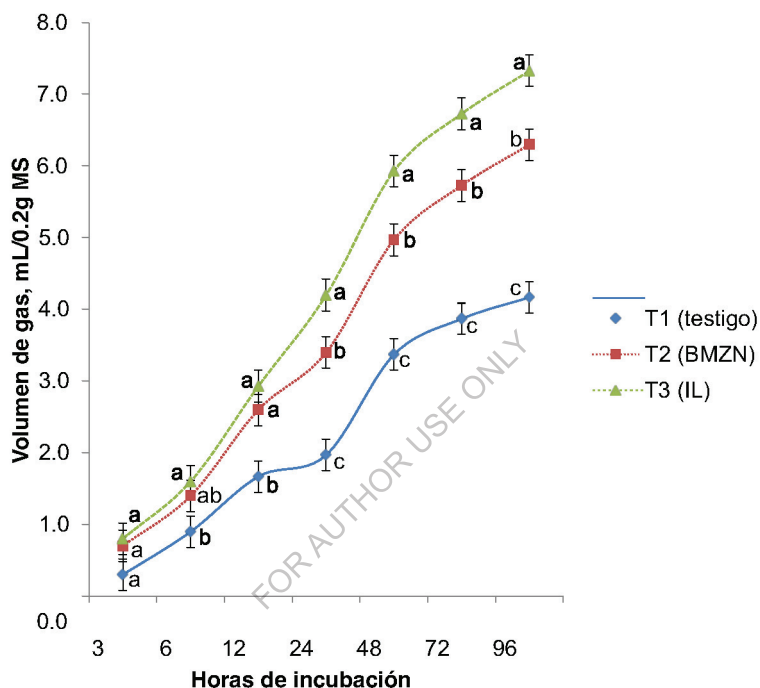
Producción de Gas *in vitro*

La producción de gas *in vitro* acumulado se presenta en la Gráfica 1, donde se observa que el T3 mostró el mayor ($P<0.05$) volumen de gas producido (1.6 mL/0.2 g de MS) a partir de la hora 6 de incubación con respecto al T1. Sin embargo, a la hora 24 el T3 fué superior ($P<0.05$) al T1 y T2 observándose un volumen de gas de 4.20, 3.40 y 1.97 mL/0.2 g de MS, respectivamente. Siguiendo la misma tendencia hasta la hora 96. La importancia de esta variable establece, que los alimentos con una alta producción de gas durante las horas iniciales de fermentación incrementará el

consumo voluntario, resultado de una alta tasa de digestión (Fadel El-seed *et al.*, 2004). La degradación de un sustrato iniciará con las fracciones fácilmente digestibles como es el caso de carbohidratos altamente fermentables como el almidón. Por lo cual, el comportamiento observado en este experimento puede ser explicado por la menor cantidad de FDN, FDA y LDA en los tratamientos que se le adicionó BMZN e IL, por lo que podemos asumir que favorecieron la colonización microbiana en ambos tratamientos y por ende mejoraron la digestibilidad de la dieta.

Parámetros de la Fermentación *in vitro*

El Cuadro 11 presenta los parámetros de la cinética de fermentación. Donde el parámetro **(A)** representa la asíntota de producción de gas (mL), siendo el T2 y T3 quienes obtuvieron la mayor ($P<0.05$) producción de gas (9.11 y 9.45 mL) al compararse con el T1 el cual presentó 6.27 mL. Lo anterior implica que el T2 y T3 tendrán menor tiempo de residencia ruminal obteniendo un mayor volumen de producción de gas.



Gráfica 1. Medias ($\pm$ EE) de la producción de gas del T1 (heno de avena, ensilaje de maíz y concentrado), T2 (heno de avena, ensilaje de maíz, concentrado y bagazo de manzana fermentado) y T3 (heno de avena, ensilaje de maíz, concentrado e inóculo de levaduras) durante la fermentación ruminal *in vitro*.

^{abc} Medias con diferente literal en hora, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 11. Parámetros de la degradabilidad ruminal de MS de tres dietas diferentes

Parámetro	Tratamiento ¹			EE(±)
	T1	T2	T3	
A	6.27 ^b	9.11 ^a	9.45 ^a	0.32
B	45.03 ^a	39.9 ^a	29.13 ^a	4.48
C	0.94 ^a	0.89 ^a	1.02 ^a	0.04

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamiento.

A = Asíntota en producción de gas (mL 0.2 g de MS).

B = Tiempo (h) al cual se alcanza la mitad de la producción asíntótica.

C = Tasa de producción de gas (mL h).

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

Esto tal vez debido a que los ingredientes de los tratamientos en mención estimularon el ambiente microbial provocando un incremento en la tasa de fermentación disminuyendo numéricamente el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la producción asintótica.

El parámetro **(B)**, expresa el tiempo durante la incubación (h) que es requerido para alcanzar la mitad de la asíntota en la producción de gas, el cual no presentó diferencia significancia ($P>0.05$) entre tratamientos. El T2 y T3 presentaron el menor tiempo numéricamente (39.9 y 29.13 h) con respecto al T1 (45.03 h). Este parámetro explica el tiempo de fermentación ruminal debido a la mejora en la composición química de la dieta, esto tal vez debido a que el BMZN e IL mejoraron el ambiente microbial propiciando un incremento en la digestibilidad de la fibra y por ende, un aumento en la concentración de sustratos disponibles para los microorganismos (Cone *et al.*, 1998). La función biológica de este parámetro señala que las dietas que incluyeron BMZN y el IL requerirán 5.13 y 15.90 h menos de fermentación en rumen comparados con el T1 para alcanzar la mitad de la asíntota en producción de gas, lo cual es igual a una mayor velocidad de digestión ruminal, permitiendo que estas dietas favorezcan el consumo de alimento. El parámetro **(C)**, indica la tasa de producción de gas (mL/h), el cual no mostró diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos. Sin embargo, el T3 presentó numéricamente una mayor tasa de producción de gas revelando 1.02 mL h comparado con el T1 y T2 los cuales presentaron 0.94 y 0.89 mL/h. Este comportamiento sugiere que el T3 tiene mayor velocidad de fermentación que el resto de los tratamientos, lo cual se ve marcado en que esta dieta requiere menor tiempo de fermentación (parámetro **B**) para alcanzar la mitad de la asíntota de producción de gas (parámetro **A**).

Producción y Perfiles de AGV

El Cuadro 12 muestra la producción y perfiles de AGV entre tratamientos, donde se observa que el T2 y T3 presentaron mayor ($P<0.05$) concentración de ácidos acético (16.00 y 17.19 mmol/L), propiónico (6.54 y 6.13 mmol/L) y butírico (2.63 y 2.67 mmol/L) al compararse con el T1 el cual tuvo valores de 12.06, 3.52 y 1.21 mmol/L, respectivamente.

Se ha mencionado que el patrón de fermentación en los rumiantes se lleva a cabo en el ambiente ruminal que está influenciado por la interacción entre la dieta, la población microbiana y el propio animal (Allen y Mertens, 1988). Así mismo, Rodríguez y Llamas (1990) reportaron que la producción de AGV se relaciona con la producción de metano y debe mantenerse el balance fermentativo en todo momento, debido a que el metano y el propionato sirven como captos del exceso de equivalentes reductores que se producen a nivel ruminal. La adición de cultivos de levadura en la alimentación de rumiantes, han mostrado efectos contradictorios sobre la concentración de AGV en rumen. Corona *et al.* (1999) reportaron que novillos y corderos suplementados con 7.5 y 3 g/d de un cultivo de levadura de Sc, mostraron baja concentración total de AGV y en la proporción molar de ácido butírico, respectivamente. Por otro lado, publicaron que la concentración total de AGV en rumen y la proporción de ácidos acético, propiónico y butírico no fueron afectados por la adición de cultivos de levadura (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). Sin embargo, Harrison *et al.* (1988) encontraron una disminución en la proporción molar de ácido acético incrementándose la concentración molar de ácido propiónico en el líquido ruminal de vacas Holstein suplementadas con 114 g/d de un cultivo de levadura que contenía Sc.

Cuadro 12. Comportamiento en la producción y perfiles de AGV entre tratamientos durante la fermentación *in vitro*

Variable	Tratamientos ¹			EE(±)
	T1	T2	T3	
Ácido acético (mmol/L)	12.06 ^b	16.00 ^a	17.19 ^a	0.90
Ácido propiónico (mmol/L)	3.52 ^b	6.54 ^a	6.13 ^a	0.75
Ácido butírico (mmol/L)	1.21 ^b	2.63 ^a	2.67 ^a	0.41

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamiento.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

En la presente investigación, se observó un incremento en la concentración de ácidos acético, propiónico y butírico en la dieta que se le adicionó BMZN y un IL, esto tal vez debido a que mejoró el ambiente ruminal y por consiguiente incrementó el número de bacterias celulolíticas provocando una mayor digestibilidad de la MS, FDN y FDA como se muestra en el Cuadro 10.

Koul *et al.* (1998) publicaron que se incrementó el total de AGV en el rumen de terneros búfalos alimentados con 5 g/d de un cultivo de levadura que contenía Sc al compararse con el grupo control (132.2 y 122.4 mmol/L). En otro estudio, Dolezal *et al.* (2005) observaron un incremento en la producción de AGV al incrementar la dosis del cultivo de levadura de Sc (cepa SC-47) en la alimentación de vacas Holstein en producción.

Concentración de N-NH₃, Ácido Láctico y pH

El Cuadro 13 presenta la concentración de N-NH₃, ácido láctico y pH entre tratamientos. La mayor ($P<0.05$) concentración de N-NH₃ lo mostró el T2 y T3 revelando valores de 0.21 y 0.22 mM/mL al cotejarse con el T1. Así mismo, ambos tratamientos fueron diferentes ($P<0.05$) en la concentración de ácido láctico (1.46 y 1.37 mM/mL) con respecto al T1. Por otro lado, se observó un pH (6.74) superior ($P<0.05$) en el T3 al compararse con el T1 y T2. Este último mantuvo el pH (6.56) más alto ($P<0.05$) al compararse con el T1.

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). Varias fuentes de nitrógeno contribuyen a la producción de amoníaco, tales como, el nitrógeno no proteico (NNP) de la dieta, nitrógeno salival y posiblemente pequeñas cantidades de urea que penetran a través del epitelio del rumen (Moloney y Drennan, 1994).

Cuadro 13. Medias ($\pm$ EE) del comportamiento en la concentración de N-NH₃, ácido láctico y pH de tratamientos durante la fermentación *in vitro*

Variable	Tratamientos ¹			EE($\pm$)
	T1	T2	T3	
N-NH ₃ (mM/mL)	0.18 ^b	0.21 ^a	0.22 ^a	0.01
Ácido láctico (mM/mL)	2.30 ^a	1.46 ^b	1.37 ^b	0.20
pH	6.19 ^c	6.56 ^b	6.74 ^a	0.06

^{abc} Medias con diferente literal en fila, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamiento.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado; T2 = HA + EM + concentrado + bagazo de manzana fermentado (BMZN); T3 = HA + EM + concentrado + inóculo de levaduras (IL).

En el presente trabajo, se observó un incremento en la concentración de N-NH_3 (0.21 y 0.22 mM/mL) en las dietas que se adicionó BMZN y un IL, esto tal vez debido a que mejoró el ambiente ruminal y por consiguiente incrementó la digestibilidad de la dieta, lo que coincide con Newbold *et al.* (1995) donde observaron un aumento en la concentración de N-NH_3 en la fermentación ruminal *in vitro*, atribuyendo el resultado a mayor disponibilidad de sustrato para los microorganismos. El pH bajo inhibe la producción de N-NH_3 *in vitro* porque afecta a las bacterias metanogénicas (*Methanobacterium bryantii*, *M. formicicum* y *Metanosarcina barkeri*) y protozoarios en la degradación de la fibra (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

Ácido láctico y pH. Williams *et al.* (1983) observaron que el pH bajo del rumen reduce la viabilidad de las bacterias celulolíticas (*Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes*) y por lo tanto, se reduce la actividad sobre los carbohidratos estructurales. En otro estudio concluyeron que en condiciones ruminales de pH bajo, el ataque bacteriano a las paredes celulares se disminuye y por consiguiente se reduce su digestión (Cheng *et al.*, 1984), por lo que se considera que un pH ruminal superior a 6.2 es el óptimo para obtener una buena digestión de la celulosa (Rodríguez y Llamas, 1990).

En esta investigación se observó, que a los tratamientos que se les adiciono BMZN y un IL disminuyeron la concentración de ácido láctico, mientras que el T3 incremento el pH, esto tal vez se debió a que estimularon a las bacterias que consumen lactato (*Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*) y por ende el IL estimuló el ambiente microbial para mantener un pH óptimo, lo que coincide con lo reportado por Robinson (2010), quien observó que la modulación del pH del rumen es uno de los efectos de la adición de levaduras en la dieta, ejerciendo un incremento

promedio del pH del rumen es uno de los efectos de la adición de levaduras en la dieta, ejerciendo un incremento promedio del pH (1.6 %), un incremento global del total de AGV (5.4 %) y una disminución general en la concentración de lactato (8.1 %).

Sauvant *et al.* (2004) no observaron ningún efecto del cultivo de levaduras sobre la concentración de AGV y pH ruminal, revelando solamente una tendencia a incrementar la digestibilidad de la MS (+0.5 %) en vacas Holstein en periodo seco. El estudio de meta análisis de Desnoyers *et al.* (2009) sugirieron que la suplementación con levaduras incrementó la concentración de AGV (2.1 mmol/L) y el pH ruminal, aunado a una tendencia a disminuir la concentración de lactato de vacas Holstein en transición. Estos mismos autores, reportaron que las levaduras son capaces de limitar la reducción del pH en rumen lo que usualmente se relaciona a un incremento en la concentración de AGV. Por otra parte, las levaduras son capaces de limitar la producción de Ác. Láctico o su acumulación en el rumen (Desnoyers *et al.*, 2009), probablemente porque Sc puede competir con bacterias que fermentan almidón (Lynch y Martin, 2002), previniendo la acumulación de lactato en el rumen (Chaucheyras *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición de BMZN y un IL en la dieta de becerros destetados mejoraron la digestibilidad de la MS, FDN y FDA, aunque no se determinó si estas mejoras pudieran llegar a promover un mejor desempeño productivo de los animales. Igualmente, la adición de estos ingredientes resultó en un incremento de la producción de gas y AGV producto del incremento de la digestibilidad en comparación con la dieta testigo.

Así mismo, la adición de bagazo de manzana fermentado y el inóculo de levaduras en la dieta incrementaron la concentración de N-NH₃ y pH, disminuyendo la concentración de ácido láctico.

En base a los resultados obtenidos en este estudio se recomienda desarrollar más investigación con los suplementos de BMZN y un IL, considerando la prioridad que representa maximizar la digestión de la fibra, es necesario evaluar estos suplementos bajo diferentes niveles de inclusión a fin de alcanzar una mejor respuesta animal.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, B. M. y M. S. Salah. 2002. Effect of yeast culture as an additive to sheep feed on performance, digestibility, nitrogen balance and rumen fermentation. J. King Saud. Univ. Agric. Sci. 14:1-13.
- Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. Agron. J. 81: 17-25.
- Allen, M. S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. J. Anim. Sci. 74:3063-3075.
- Allen, M. S. y M. Mertens. 1988. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. J. Nutr. 118:261-270.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Vol. I. 16th ed. International, Arlington, VA. E. U. A.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi y W. Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81:37-47.
- Blümmel, M., J. W. Cone, A. H. Van Gelder, I. Nshalai, N. N. Umunna, H. P. S. Makkar y K. Becker. 2005. Prediction of forage intake using *in vitro* gas production methods: Comparison of multiphase fermentation kinetics measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system. Anim. Feed Sci. Technol. 123:517-526.
- Broderick, G. A. y J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. J. Dairy. Sci. 63:64-75.
- Brotz, P. G. y D. M. Schaeffer. 1987. Simultaneous determination of lactic acid and volatile fatty acids in microbial fermentation extracts by gas-liquid chromatography. J. Microbiol. Methods. 6:139-144.
- Bruni M. de los A. y P. Chilbroste. 2001. Simulation of ruminal digestion by gas production method. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 9: 43-51.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin y P. Gouet. 1995. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an *Archaea methanogen* is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 61:3466-3467.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker y A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future.

Anim. Feed Sci. Technol. 145:5-26.

- Cheng, K. J., C. S. Stewart, D. Dinsdale y J. W. Costerton. 1984. Electron microscopy of the bacteria involved in the digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Technol. 10:93-101.
- Cone, J. W., A. H. Van Gelder y H. Valk. 1998. Prediction of nylon bag degradation characteristics of grass samples with the gas production technique. J. Sci. Food Agric. 77:421-426.
- Corona, L., G. D. Mendoza, F. A. Castrejon, M. M. Crosby y M. A. Cobos. 1999. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. Small Rumin. Res. 31:209-214.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter y D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92:1620-1632.
- Dolezal, P., J. Dolezal y J. Trinacty. 2005. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation in dairy cows. Czech J. Anim. Sci. 50:503-510.
- El-Waziry, A. M. y H. R. Ibrahim. 2007. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* of yeast on sheep digestion in sheep fed berseem (*Trifolium alexandrinum*) hay and cellulase activity. Aust. J. Basic. Applied Sci. 1:379-385.
- Fadel El-seed, A. N. M. A., J. Sekine. H. E. M. Kamel y M. Hishinuma. 2004. Changes with time after feeding in ruminal pool sizes of cellular contents, crude protein, cellulose, hemicellulose and lignin. Indian J. Anim. Sci. 74:205-210.
- Goering, H. K. y P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). Pág. 379 en Agric. Handbook. USDA-ARS, Washington, DC. E. U. A.
- Groot, J. C. J., J. W. Cone, B. A. Williams, F. M. A. Debersaques y E. A. Lantinga. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 64:77-89.
- Guo, D., F. Chen, K. Inoue, J. W. Blount y R. A. Dixon. 2001. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. Plant Cell. 13:73-88.

- Harrison, G. A., R. W. Hemken, K. A. Dawson, R. J. Harmon y K. B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial population. *J. Dairy Sci.* 71:2967-2975.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Anim. Sci.* 69:2755-2768.
- INAFED, 2008. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/chihuahua/>. Consultado en septiembre 10, 2012.
- Kholif, S. M. y M. M. Khorshed. 2006. Effect of yeast or selenized yeast supplementation to rations on the productive performance of lactating buffaloes. *Egypt. J. Nutr. Feed.* 9:193-205.
- Koul, V., U. Kumar, V. K. Sareen y S. Singh. 1998. Mode of action of yeast culture (Yea-Sacc¹⁰²⁶) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. *J. Sci. Food Agric.* 77:407-413.
- Lesmeister, K. E., A. J. Heinrichs y M. T. Gabler. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832-1839.
- Lynch, H. A. y S. A. Martin. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 85:2603-2608.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz y W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93:217-222.
- Menke, K. H. y H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Research Develop.* 28:7-55.
- Mir, Z. y P. S. Mir. 1994. Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high forage or high grain diets and on feed digestibility and *in situ* degradability. *J. Anim. Sci.* 72:537-545.
- Moloney, A. P. y M. J. Drennan. 1994. The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 50:55-73.

- Muro, R. A. 2007. Cinética de degradación ruminal de tres fuentes de forraje mediante la técnica de digestibilidad *in vitro* por producción de gas. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih. Mex.
- Nagaraja, T. G. y E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17-38.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, X. B. Chen y F. M. McIntosh. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811-1818.
- Olson, K. C., J. S. Caton, D. R. Kirby y P. L. Norton. 1994. Influence of yeast culture supplementation and advancing season on steers grazing mixed-grass prairie in the northern great plains: II. Ruminal fermentation site of digestion, and microbial efficiency. *J. Anim. Sci.* 72:2158-2170.
- Pinos-Rodríguez, J. M., P. H. Robinson, M. E. Ortega, S. L. Berry, G. Mendozad y R. Barcena. 2008. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* 1077 or *Saccharomyces boulardii* 1079. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140:223-232.
- Plata, P. F., M. G. D. Mendoza, J. R. Barcena-Gama y M. S. González. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49:203-210.
- Robinson, P. H. 2010. Yeast products for growing and lactating ruminants: A literature summary of impacts on rumen fermentation and performance. <http://animalscience.ucdavis.edu/faculty/robinson/Articles/FullText/pdf/We b200901.pdf>. Consultado en octubre 16, 2012.
- Rodríguez, G. F. y L. G. Llamas. 1990. Digestibilidad, Balance de Nutrientes y Patrones de Fermentación Ruminal. In: R. A. Castellanos, L. G. Llamas y S. A. Shimada, Ed. Manual de técnicas de investigación en ruminología. Sistemas de educación continua en producción animal en México. A. C. México, D. F. México.
- Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bony Y P. Gouet. 1990. Effects of physicochemical factor on the adhesion to cellulose, avicel of the rumen bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes*. *Applied Environ. Microbiol.* 56:3081-3087.
- SAS. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica

- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin y P. Schmidely. 2004. Rumen Acidosis: Modeling Ruminant. Proceeding of the alltech's 20th annual symposium: Reimagining the feed industry, may 23-26, 2004. Nottingham University Press. Londres. Reino Unido.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1997. Bioestadística. Principios y Procedimientos. 2a ed. McGraw-Hill. México.
- Sewalt, V. J. H., W. G. Glasser, J. P. Fontenot y V. G. Allen. 1996. Lignin impact on fiber degradation. 1 quinone methide intermediates formed from lignin during *in vitro* fermentation of corn stover. J. Sci. Food Agric. 71:195-203.
- Tang, S. X., G. O. Tayo, Z. L. Tan, Z. H. Sun y L. X. Shen. 2008. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low quality cereal straws. J. Anim. Sci. 86:1164-1172.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochemist and Biotechnol. 56:49-58.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan y J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed. Sci. Technol. 48:185-197.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74:3579-3583.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2a ed. Cornell University Press. Ithaca, New York. E. U. A.
- Whetten, R. y R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. The plant cell. 7:1001-1013.
- Williams, P. E. V., A. Macdearmid, G. M. Innes y A. Brewer. 1983. Turnips with chemically treated straw for beef production. Effect of turnips on the degradability of straw in the rumen. Anim. Prod. 37:189-196.
- Williams, P. E. V., C. A. G. Tait, G. M. Innes y C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. J. Anim. Sci. 69:3016-3026.
- Wohlt, J. E., T. T. Corcione y P. K. Zajac. 1998. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. J. Dairy Sci. 81:1345-1352.

EXPERIMENTO III.
FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DIETAS PARA BECERROS EN
CRECIMIENTO ADICIONADAS CON CUATRO CEPAS DE
LEVADURA

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la fermentación *in vitro* de dietas para becerros en crecimiento adicionadas con cuatro cepas de levaduras. Los tratamientos consistieron en: T1 (Sc6): heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado + cepa Sc6; T2 (KI2): HA + EM + concentrado + cepa KI2; T3 (KI11): HA + EM + concentrado + cepa KI11 y T4 (Io3): HA + EM + concentrado + cepa Io3. Las variables medidas fueron digestibilidad de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), y el contenido de lignina detergente ácido (LDA), el volumen de producción de gas, concentración de ácido acético, propiónico, butírico, nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$), ácido láctico y pH. La digestibilidad *in vitro* de las dietas se realizó a las 48 h, en tanto que para el resto de las variables se realizaron muestreos a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Se realizó un diseño completamente al azar, utilizando para la digestibilidad de la fibra un modelo que incluyó como efecto fijo tratamiento. Para ácidos grasos volátiles (AGV), $N-NH_3$, ácido láctico y pH, se incluyó como efectos fijos tratamiento y hora. La producción de gas se analizó con un modelo similar que incluyó como efectos fijos tratamiento, hora y su interacción. Para analizar los parámetros A, B y C del modelo de regresión no lineal ajustado se utilizó como efecto fijo el tratamiento. Se observó efecto de tratamiento ($P<0.05$) en la digestibilidad de MS, siendo superior los T2, T3 y T4 con valores de 63.01, 63.11 y 63.05 %, con respecto al T1 (61.30 %). Así mismo, el T4 fue mayor ($P<0.05$) en digestibilidad de FDN (56.69 %) al compararse con el T1 y T2 (48.22 y 53.98 %), el T2 y T3 tuvieron mejor ($P<0.05$) digestibilidad de FDA (58.78 y 58.94 %) al cotejarse con el T1 (56.39%), por lo tanto, el menor ($P<0.05$) contenido de LDA fue para T2, T3 y T4 (4.54, 4.42 y 4.46). A las 96 h el T3 mostró mayor ($P<0.05$) volumen de producción de gas

(11.50 mL/0.2 g de MS). La mayor concentración ($P<0.05$) de AGV lo presentó el T2 con valores de 37.30 y 19.25 mmol/L para ácido acético y propiónico. Así mismo, el T1, T2 y T4 fueron superiores ($P<0.05$) en la concentración de ácido butírico (7.45, 7.74 y 6.73 mmol/L). El T4 mostró un incremento ($P<0.05$) en la concentración de N-NH₃ y ácido láctico (5.34 y 0.69 mM/mL), siendo el T1 quien presentó un incremento ($P<0.05$) del pH (7.00). Se concluye, que las cepas KI2, KI11 e Io3 favorecieron la digestibilidad de MS, FDN y FDA, respecto a la Sc6, así mismo, KI2 incrementó la concentración de ácidos acético y propiónico durante la fermentación *in vitro* de las dietas para novillos en crecimiento.

FOR AUTHOR USE ONLY

ABSTRACT

IN VITRO FERMENTATION OF DIETS FOR GROWING CALVES ADDED WITH FOUR YEAST STRAINS

The objective was to evaluate the effect on *in vitro* fermentation of diets for growing calves added with four yeast strains. Treatments consisted of: T1 (Sc6): oat hay (OH) + corn silage (CS) + concentrated + strain Sc6; T2 (KI2): OH + CS + concentrated + strain KI2; T3 (KI11): OH + CS + concentrated + strain KI11 and T4 (Io3): OH + CS + concentrated + strain Io3. The variables evaluated were dry matter digestibility (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin content (ADL), volume of gas produced (VGP), concentration of acetic acid, propionic, butyric, ammoniacal nitrogen (N-NH₃), lactic acid and pH. The *in vitro* digestibility of the diet was conducted for 48 h and for the rest of the variables measurements were taken at 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. The statistical analysis for fiber digestibility was performed using a model that included treatment as a fixed effect. For the analysis of volatile fatty acids (VFA), N-NH₃, lactic acid and pH, the model included treatment and time as fixed effects. Gas production was analyzed with a similar model that included treatment, time and their interaction as fixed effects and to examine the parameters A, B and C treatment was used as a fixed effect. Treatment effect ($P < 0.05$) was observed on the digestibility of DM, being better the T2, T3 and T4 with values of 63.01, 63.11 and 63.05 %, with respect to T1 (61.30 %). Likewise, T4 had higher ($P < 0.05$) digestibility of NDF (56.69 %) with respect to T1 and T2 (48.22 and 53.98 %), T2 and T3 favored ($P < 0.05$) the digestibility of ADF (58.78 and 58.94 %) in comparison to T1 (56.39 %), therefore, the lower content ($P < 0.05$) of ADL was for T2, T3 and T4 (4.54, 4.42 and 4.46). At 96 h T3 showed higher ($P < 0.05$) volume of gas

production (11.50 mL/0.2 g MS). The highest concentration ($P<0.05$) of VFA was presented by T2 with values of 37.30 and 19.25 mmol/L for acetic and propionic acids. Likewise, T1, T2 and T4 were higher ($P<0.05$) in the concentration of butyric acid (7.45, 7.74 and 6.73 mmol/L). The T4 showed an increase ($P<0.05$) in the concentration of N-NH₃ and lactic acid (5.34 and 0.69 mM/mL), being the T1 who had an increase ($P<0.05$) of pH (7.00). In conclusion, the strains KI2, KI11 and Io3 improve the digestibility of DM, NDF and ADF compared with Sc6, also the KI2 increase the concentration of acetic and propionic acids during *in vitro* fermentation of diets for growing steers.

FOR AUTHOR USE ONLY

INTRODUCCIÓN

La utilización de cepas de levadura como aditivo en dietas fibrosas para rumiantes produce mejoras en la eficiencia de la utilización y disponibilidad de los nutrientes e incrementos en la digestión ruminal de la materia seca (MS), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y nitrógeno, tanto *in vivo* como *in vitro* (Biricik y Turkman, 2001). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las levaduras ejercen su acción en el rumen, no han quedado debidamente esclarecidos. Los diferentes modos de acción de las cepas de levadura y la interacción con la dieta que se ofrece a los animales, presentan nuevas oportunidades, así como nuevos problemas para definir la modificación que causan al metabolismo ruminal, por efecto de las diferentes cepas de cultivo y la cantidad suministrada (Karma *et al.*, 2002). Brossard *et al.* (2006) reportaron que las levaduras mejoran el ambiente ruminal provocando un incremento en la población de bacterias celulolíticas, y estimulan el crecimiento de las bacterias que consumen lactato (*Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*) lo que se traduce a un aumento en la degradación de la fibra (Callaway y Martin, 1997) y cambios en los ácidos grasos volátiles (Carro *et al.*, 1992). Por otro lado, la técnica de producción de gas *in vitro*, simula los procesos digestivos que se generan a partir de la producción microbiana, permitiendo conocer la fermentación y degradabilidad del alimento en función de la calidad nutritiva y disponibilidad de nutrientes para las bacterias (Theodorou *et al.*, 1994).

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de cuatro cepas de levadura adicionadas en las dietas de becerros destetados sobre la digestibilidad *in vitro* de la fibra, producción de gas y perfil de ácidos grasos volátiles (AGV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

Esta investigación se realizó en las instalaciones de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Chih., México, ubicada en las coordenadas 28° 35' 07" latitud norte y 106° 06' 23" longitud oeste, con una altitud de 1,517 msnm, según el sistema de posicionamiento global (GPS por sus siglas en inglés, MAGELLAN®, MobileMapper-Pro). La temperatura media anual es de 18.2 °C, con una media máxima de 37.7 °C y una media mínima de -7.4 °C. La precipitación promedio anual es de 387.5 mm, con 71 días de lluvia al año y una humedad relativa del 49 %; predominando un clima semiárido extremo (INAFED, 2008).

Descripción de los Tratamientos

Para el desarrollo del presente experimento se utilizó la dieta del tratamiento T1 (testigo): heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado, ofrecido a los becerros destetados como se mencionó en el Experimento I. Los tratamientos experimentales fueron cuatro inóculos preparados con las siguientes cepas: T1: *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6, T2: *Kluyveromyces lactis* cepa 2, T3: *Kluyveromyces lactis* cepa 11 y T4: *Issatchenkya orientalis* cepa 3, para lo cual se utilizaron 4 matraces Erlenmeyer (Kimax)® de 1,000 mL agregando 3.1×10^8 células vivas de levaduras de cada cepa por matraz, así mismo, se adicionaron al cultivo los ingredientes que se muestra en el Cuadro 14. Una vez terminado el tiempo de fermentación se realizó el conteo de levaduras siguiendo el procedimiento de Díaz (2006) como se indicó en el Experimento I, encontrando la cantidad de 3.4×10^9 cel/mL para posteriormente ajustar la cantidad de células de levaduras por tratamiento,

Cuadro 14. Diseño de tratamientos para la preparación de los inóculos con las cuatro cepas de levaduras

Ingredientes	Tratamientos ¹			
	T1	T2	T3	T4
Cepa de levadura	Sc6	Kl2	Kl11	Io3
Melaza de caña (g)	100	100	100	100
Urea (g)	1.2	1.2	1.2	1.2
Minerales (g)	0.5	0.5	0.5	0.5
Sulfato de amonio (g)	0.2	0.2	0.2	0.2
Aforados (mL)	1000	1000	1000	1000

¹T1 = *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6; T2 = *Kluyveromyces lactis* cepa 2; T3 = *Kluyveromyces lactis* cepa 11 y T4 = *Issatchenkya orientalis* cepa 3.

tomando como base 26 mL adicionados en la dieta diaria que recibió cada animal.

Análisis Químico de las Dietas

Con la finalidad de obtener los valores compuestos de la digestibilidad de la materia seca (MS), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y el contenido de lignina detergente ácido (LDA), se analizó la composición química de las fracciones de la dieta con la adición de las cepas antes mencionadas. Se colectaron muestras de la dieta cada 15 d para formar muestras compuestas por mes, utilizando 1 kg de MS (ración completa) por tratamiento. Las muestras fueron secadas a 60 °C por 48 h en una estufa de aire forzado y molidas a 1 milímetro (mm) en un molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA), estas muestras fueron secadas a 105 °C durante 8 h en una estufa de aire forzado para determinar MS absoluta y secuencialmente fueron incineradas a 600 °C por 4 h en una mufla para determinar cenizas (AOAC, 2000). En las muestras compuestas se determinó la concentración de FDN, FDA (Van Soest *et al.*, 1991) y LDA (Goering y Van Soest, 1970). En el análisis de FDN se utilizó sulfito de sodio (Na_2SO_3) y α -amilasa termo estable (Ankom Technology) para remover la materia nitrogenada y el almidón.

Digestibilidad *in vitro* de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta

A la ración completa (1 kg de MS) molida de cada tratamiento, se le adicionó la cantidad ajustada de inóculo de levaduras mezclándose manualmente en una charola de plástico. Previo a la incubación, las bolsas fueron sumergidas en acetona para eliminar el surfactante de las mismas que inhiben la digestión microbiana, y posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente. En seguida, se pesaron las muestras compuestas de las dietas ($0.45 \text{ g} \pm 0.05$) en bolsas filtro ANKOM® F57 (25 μm de poro y dimensiones de 5 x 4 cm) identificadas y selladas con calor e incubadas

in vitro de acuerdo a la metodología Daisy^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY-USA), la cual involucra soluciones búfer A, B e inóculo ruminal como se indicó en el Experimento II.

Obtención del Líquido Ruminal

Para obtener el líquido ruminal se siguió el mismo procedimiento señalado en el Experimento II.

Producción de Gas *in vitro*

La producción de gas (PG) *in vitro* se realizó mediante el protocolo de Menke y Steingass (1988), abordando las modificaciones mencionadas por Muro (2007). La incubación de las muestras se realizó por triplicado y se agregó un blanco en cada una de las horas de muestreo. Se utilizaron 112 frascos de vidrio de 50 mL, sellados con tapón de goma; a estos se le adicionaron 0.2 g de muestra, 10 mL de líquido ruminal y 20 mL de saliva artificial siguiendo el mismo procedimiento indicado en el Experimento II.

La presión interna de los frascos producto de la degradación del alimento, se midió con un transductor de presión (FESTO®) a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de incubación, mediante la punción de los frascos, registrándose la presión acumulada (Theodorou *et al.*, 1994). Los resultados se expresaron en mL de PG por cada 0.2 g de MS (mL PG/0.2 g MS).

Producción y Perfiles de AGV

Se colectaron muestras de 20 mL de los frascos de PG para determinar la producción de ácido acético, propiónico y butírico, a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h, las cuales fueron filtradas con dos capas de gasas para separar el contenido sólido y líquido. A este último, se le determinó el pH inmediatamente, usando un potenciómetro

(Combo, HANNA instruments® Inc., Woonsocket, RI). Así mismo, se tomó una submuestra de 10 mL la cual fue centrifugada al momento a 3,500 $\times g$ a 4 °C por 10 min. Posteriormente el sobrenadante se depositó en viales color ámbar previamente marcados, acidificando la muestra con 0.2 mL de H₂SO₄ al 50 % y congelándola a -20 °C hasta realizar su análisis. Previo a su medición fueron descongeladas en refrigeración a 4 °C, adicionándole ácido metafosfórico al 25 % y centrifugando nuevamente con las características arriba mencionadas y preservándolas en refrigeración hasta realizar su análisis mediante cromatografía de gases (Brotz y Schaefer, 1987), siguiendo el mismo procedimiento indicado en el Experimento II.

Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃)

Se obtuvo una muestra de 20 mL de los frascos de PG para analizar N- NH₃ a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h por medio de colorimetría siguiendo la técnica de Broderick y Kang (1980) como se mencionó en el Experimento II.

Ácido Láctico

Se colectó una muestra de 20 mL de los frascos de PG para analizar el contenido de ácido láctico a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h por colorimetría según el procedimiento de Taylor (1996) siguiendo el mismo procedimiento que se describió en el Experimento II.

Análisis Estadístico

Para el análisis de la digestibilidad de MS, FDN, FDA y LDA se ajustó un modelo estadístico que incluyó como efecto fijo el tratamiento en un diseño completamente al azar. Por otra parte, para las concentraciones de N-NH₃, y ácidos acéticos, propiónico, butírico y láctico, así como para pH se ajustó un modelo similar, considerando como efectos fijos el tratamiento y la hora de muestreo. Para la producción de gas el modelo

estadístico incluyó los efectos fijos de tratamiento y hora, así como su interacción. Para analizar los parámetros A, B y C del modelo de regresión no lineal ajustado se utilizó como efecto fijo el tratamiento. Se utilizó la prueba de Tukey para establecer las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos (Steel y Torrie, 1997).

Las cantidades de PG acumulada *in vitro* se ajustaron al modelo no lineal de Gompertz (Lavrencic *et al.*, 1997), calculando los parámetros de fermentación A, B y C; con el procedimiento NLIN de SAS (SAS, 2004).

$$Y = A * (\exp (- B * (\exp (- C * t))))$$

Dónde:

Y.- Volumen de producción de gas (mL 0.2 g de MS) para un tiempo de incubación dado.

A.- Volumen de gas correspondiente a la completa digestión del sustrato (hora al punto de inflexión).

B.- Tasa constante de producción de gas (mL de gas al punto de inflexión). C.- Tasa máxima de producción de gas (mL/h).

t.- Tiempo de incubación (h).

Para analizar los parámetros A, B y C se restó la PG del blanco a cada una de las muestras (triplicado) para obtener la cantidad total acumulada en cada una de las horas de fermentación *in vitro*. Posteriormente, los valores acumulados de cada repetición en su hora de muestreo se analizaron con el modelo de Gompertz *et al.* (1996) para obtener dichos parámetros, estos mismos fueron analizados con PROC GLM para establecer mediante Tukey las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos, declarando efecto significativo cuando los valores de *P* fueron < 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digestibilidad *in vitro* de la MS, FDN, FDA y el Contenido de LDA de la Dieta

Digestibilidad de la materia seca. El Cuadro 15 muestra la digestibilidad de la MS, FDN, FDA y el contenido de LDA por tratamiento. La mayor digestibilidad de la MS se observó en los T2, T3 y T4 (63.01, 63.11 y 63.05 %, respectivamente) siendo superiores ($P<0.05$) al T1 (61.30 %). Esta tendencia ha sido asociada con el incremento en la digestibilidad de la fibra, principalmente FDN y FDA que mostraron los tres tratamientos, así también, al menor contenido de LDA.

Sauvant *et al.* (2004) observaron una tendencia a incrementar la digestibilidad de la materia orgánica (MO; 0.5 %) en vacas Holstein en el periodo seco que recibieron un cultivo de levadura en su dieta con respecto al grupo control. Por otra parte, se ha sugerido que las levaduras vivas son metabólicamente activas en el rumen, por lo que modifican la fermentación y estimulan el crecimiento microbial (Erasmus *et al.*, 2005). Tales cambios son asociados con un incremento en la digestibilidad de la fibra, lo cual puede aumentar la tasa de pasaje y por lo tanto mejorar el consumo de MS y productividad del animal (Guedes *et al.*, 2008). Existe muy poca o nula información sobre la adición de levadura de las cepas *Kluyveromyces lactis* e *Issatchenkya orientalis* en la alimentación de rumiantes. En el presente trabajo, el mejor comportamiento en la digestibilidad de la MS se observó en el T2, T3 y T4, por lo que estos resultados sugieren que las cepas KI2, KI11 e Io3 favorecieron el ambiente microbial de las bacterias celulolíticas y como consecuencia incrementaron la digestibilidad de la fibra, así mismo se plantea que estas cepas incrementaron la digestibilidad de nutrientes debido a que estimulan el crecimiento de la población microbial del rumen como lo indicaron Harrison *et al.* (1988).

Cuadro 15. Digestibilidad *in vitro* de las fracciones de las fibras entre tratamientos

Digestibilidad (%)	Tratamientos ¹				EE(±)
	T1	T2	T3	T4	
MS	61.30 ^b	63.01 ^a	63.11 ^a	63.05 ^a	0.51
FDN	48.22 ^c	53.98 ^b	55.80 ^{ab}	56.69 ^a	0.67
FDA	56.39 ^b	58.78 ^a	58.94 ^a	57.83 ^{ab}	0.57
LDA	5.11 ^a	4.54 ^b	4.42 ^b	4.46 ^b	0.05

^{abc} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamiento.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado + *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6; T2 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 2; T3 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 11 y T4 = Ha + EM + concentrado + *Issatchenkya orientalis* cepa 3.

como lo indicaron Harrison *et al.* (1988). Chaucheyras-Durand *et al.* (2008) mencionaron que las levaduras consumen oxígeno disponible en la superficie de la ingesta fresca de alimento para mantener la actividad metabólica y así reducir el potencial redox en el rumen. Así mismo, publicaron que estos cambios establecen mejores condiciones para el crecimiento de las bacterias anaeróbicas estrictas como las celulolíticas, favoreciendo su unión a las partículas del alimento y por consiguiente aumentar la tasa de degradación de la fibra (Roger *et al.*, 1990)

Digestibilidad de la FDN y FDA. El mayor porcentaje ($P<0.05$) en la digestibilidad de la FDN lo presentó el T4 revelando 56.69 %, siendo superior al T1 y T2 los cuales mostraron 48.22 y 53.98 %, respectivamente. Sin embargo, este último fue superior ($P<0.05$) al T1. Por otro lado, el T2 y T3 manifestaron mayor ($P<0.05$) digestibilidad de la FDA (58.78 y 58.94 %) con respecto al T1 cuyo valor fue 56.39 %, en tanto que el valor de T4 fue de 57.83 %.

Kholif y Khorshed (2006) publicaron un efecto positivo en la suplementación con levadura a búfalas lactantes sobre la digestibilidad de la FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y proteína cruda (PC). En otra investigación, mencionaron que la adición de cultivos de levadura en dietas de borrego en engorda incrementaron el número de bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes* (*F.succinogenes*), *Ruminococcus albus* (*R. albus*) y *Ruminococcus flavefaciens* (*R. flavefaciens*) en el rumen, lo que favorece la degradación de la celulosa (Newbold *et al.*, 1995).

En el presente experimento, el T4 presentó la mayor digestibilidad de FDN (56.69 %), mientras que el T2 y T3 mostraron el porcentaje mayor de digestibilidad de la FDA (58.78 y 58.94 %), siendo el T1 inferior en FDN y FDA (48.22 y 56.39 %) con respecto a los demás tratamientos.

Este comportamiento propone que las cepas Io3, KI2 y KI11 pudieron estimular el ambiente microbial incrementando el número de bacterias celulolíticas mejorando la degradación de la fibra con respecto a Sc. Lo que coincide con Koul *et al.* (1998) quienes observaron un incremento en el número total de bacterias celulolíticas y proteolíticas cuando se adicionó un cultivo de levadura a vacas Holstein no lactantes. Así mismo, Williams *et al.* (1991) reportaron que la estimulación en la degradación de celulosa por cultivo de levadura está asociada con la disminución en el tiempo de retraso, lo cual resulta en un incremento en la tasa inicial de digestión, pero no un aumento en la digestión total por los microorganismos del rumen.

Chaucheyras-Duran y Fonty (2001) encontraron que los microorganismos que se adhieren a la digesta representan más del 75 % de la microflora total en el rumen, siendo *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens* las bacterias más activas en la degradación de la fibra por la presencia de numerosas celulasas (glucanasas, glucosidasas) y hemicelulasas (xylanasa, xylosidasas y fucosidasas).

Digestibilidad de la LDA. El mayor contenido ($P<0.05$) de LDA lo presentó el T1 obteniendo 5.11 % al compararse con el T2, T3 y T4 los cuales mostraron 4.54, 4.42 y 4.46 %, siendo estos últimos similares entre sí. El incremento en el contenido de LDA ha sido asociado a la baja digestibilidad de la MS, FDN y FDA. Noguera *et al.* (2004) mencionaron que en las primeras horas de fermentación una parte del sustrato, principalmente los azúcares solubles son rápidamente fermentados, sin embargo ellos solo constituyen una pequeña parte del material potencialmente digestible, y a medida que el proceso fermentativo continua una menor cantidad de material es hidratado y colonizado por los microorganismos ruminales, lo que origina diferentes tasas de degradación dependiendo de la concentración de carbohidratos estructurales,

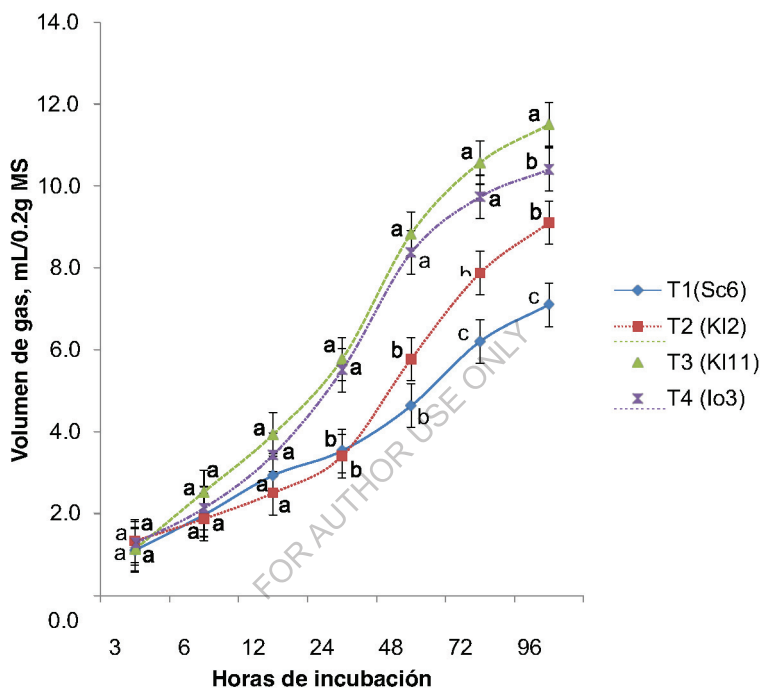
contenido de lignina y estado de madurez de la planta. La lignina es el componente principal que afecta la digestibilidad del tejido vegetal (Van Soest, 1994), ya que generalmente se encuentra adherida a los carbohidratos estructurales de las paredes celulares proporcionando soporte a la planta (Whetten y Sederoff, 1995), lo cual está correlacionado negativamente con la calidad y digestibilidad del forraje por los rumiantes (Sewalt *et al.*, 1996).

Producción de Gas *in vitro*

La producción de gas *in vitro* acumulado se presenta en la Gráfica 2, donde se observa que los T3 y T4 mostraron el mayor ($P<0.05$) volumen de gas producido (5.77 y 5.50 mL/0.2 g de MS) a partir de las 24 h de incubación con respecto al T1 y T2 (3.53 y 3.40 mL/0.2 g de MS), siguiendo la misma tendencia hasta las 72 h. A las 96 h el T3 fue superior ($P<0.05$) con valores de 11.50 mL/0.2 g de MS al compararse con el T1, T2 y T4 los cuales tuvieron 7.10, 9.10 y 10.40 mL/0.2 g de MS, respectivamente; siendo el T1 el que tuvo menor volumen de gas al cotejarse con el resto de los tratamientos.

La importancia de esta variable radica en que la tasa de producción de gas es proporcional a la actividad microbiana, pero la proporcionalidad disminuye con el tiempo de incubación, por lo que puede ser interpretado como la pérdida de la eficiencia en la tasa de fermentación con el tiempo (Lavrencic *et al.*, 1997).

Una mayor actividad microbiana predispone un incremento en la digestibilidad de la fibra, provocando una alta producción de gas durante las horas iniciales de fermentación y por ende aumenta el consumo voluntario de alimento (Fadel El-seed *et al.*, 2004).



Gráfica 2. Medias ($\pm$ EE) de la producción de gas durante la fermentación ruminal *in vitro* del T1, T2, T3 y T4 conteniendo todos los tratamientos heno de avena, ensilaje de maíz, concentrado y su respectiva cepa de levadura.

^{abc} Medias con diferente literal en hora, son diferentes ($P < 0.05$) entre tratamientos.

La degradación de un sustrato se inicia con las fracciones fácilmente digestibles como es el caso de carbohidratos altamente fermentables como el almidón. Por lo tanto, el comportamiento observado en este experimento, sugiere que los datos obtenidos con mayor digestibilidad de la MS, FDN y FDA, así mismo, el menor contenido de LDA en el T2, T3 y T4 proponen que tal vez favorecieron la colonización microbial mejorando la digestibilidad de la dieta.

Parámetros de la Fermentación *in vitro*

El Cuadro 16 muestra los parámetros de la cinética de fermentación. Donde el parámetro **(A)** representa la hora al punto de inflexión, siendo el T2, T3 y T4 quienes obtuvieron el punto de inflexión mayor ($P<0.05$) revelando 11.53, 11.6 y 10.42 h al compararse con el T1 el cual presentó 8.05 h. Lo anterior indica que las cepas de los tratamientos con mayor punto de inflexión, tal vez favorecieron la colonización microbial de la fibra provocando un incremento en la tasa de fermentación y sustrato, prolongando el punto de inflexión lo que refleja un mayor volumen de producción de gas.

El parámetro **(B)**, representa los mL de gas al punto de inflexión, donde se observó diferencia significativa entre tratamientos ($P<0.05$). El T2, T3 y T4 presentaron la mayor cantidad de gas al punto de inflexión (2.21, 2.10 y 2.17 mL) al compararse con el T1 el cual reveló 1.68 mL. Este parámetro explica un incremento en la producción de gas, producto de la fermentación ruminal debido a la mejora en la composición química de la dieta, esto tal vez debido a que las cepas KI2, KI11 e I03 mejoraron el ambiente microbial en comparación de Sc6, propiciando un incremento en la digestibilidad de la fibra y por lo tanto, un aumento en la concentración de sustrato disponible para los microorganismos (Cone *et al.*, 1998).

Cuadro 16. Parámetros de la digestibilidad ruminal de MS entre tratamientos

Parámetros	Tratamiento ¹				EE(±)
	T1	T2	T3	T4	
A	8.05 ^b	11.53 ^a	11.6 ^a	10.42 ^a	0.68
B	1.68 ^b	2.21 ^a	2.10 ^a	2.17 ^a	0.10
C	0.03 ^b	0.02 ^b	0.05 ^a	0.05 ^a	0.00

^{ab} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamiento.

A = Hora al punto de inflexión.

B = mL de gas al punto de inflexión.

C = Tasa máxima de producción de gas (mL/h).

¹T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado + *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6; T2 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 2; T3 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 11 y T4 = HA + EM + concentrado + *Issatchenkya orientalis* cepa 3.

La función biológica de este parámetro sugiere que las cepas K12, K11 e I03 producirán 0.53, 0.42 y 0.49 mL más de gas que la Sc6 para alcanzar el punto de inflexión, lo cual indica que contienen mayor cantidad de sustrato para los microorganismos.

El parámetro **(C)**, representa la tasa máxima de producción de gas (mL/h), donde se puede observar que el T3 y T4 mostraron la mayor ($P<0.05$) tasa de producción de gas, ambos con 0.05 mL/h mientras que en T1 y T2 las estimaciones fueron 0.03 y 0.02 mL/h, respectivamente. Este comportamiento indica que el T3 y T4 tienen mayor habilidad de colonizar las partículas de la dieta que el resto de los tratamientos, lo que ocasiona una mayor digestibilidad de la fibra y un incremento en el volumen de gas producido.

Producción y Perfiles de AGV

El Cuadro 17 muestra la producción y perfiles de AGV entre tratamiento, donde se observó que el T2 presentó mayor ($P<0.05$) concentración de ácido acético, propiónico y butírico (37.30, 19.25 y 7.74 mmol/L) al compararse con el T1, T4 y T3. Así mismo, el T4 fue superior ($P<0.05$) en ácido propiónico al T1 (16.59 y 12.52 mmol/L respectivamente). Por otro lado, en cuanto al ácido butírico los T1, T2 y T4 fueron superiores ($P<0.05$) al T3 (7.45, 7.74, 6.73 y 4.51 mmol/L, respectivamente).

Allen y Mertens (1988) mencionaron que el patrón de fermentación en los rumiantes está influenciado por la interacción entre la dieta, la población microbiana y el propio animal. La adición de cultivos de levadura en la alimentación de rumiantes ha mostrado efectos contradictorios sobre la concentración de AGV en rumen. Por otra parte, se ha publicado que la tendencia a incrementar la proporción molar de acetato en el rumen de animales suplementados con cultivos de levaduras, puede estar

Cuadro 17. Comportamiento en la producción y perfil de AGV entre tratamientos durante la fermentación *in vitro*

Variables	Tratamientos ¹				EE(±)
	T1	T2	T3	T4	
Ácido acético (mmol/L)	24.87 ^c	37.30 ^a	32.84 ^{ab}	29.91 ^{bc}	2.03
Ácido propiónico (mmol/L)	12.52 ^c	19.25 ^a	17.73 ^{ab}	16.59 ^b	0.89
Ácido butírico (mmol/L)	7.45 ^a	7.74 ^a	4.51 ^b	6.73 ^a	0.52

^{abc} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamientos.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado + *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6; T2 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 2; T3 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 11 y T4 = HA + EM + concentrado + *Issatchenkya orientalis* cepa 3.

relacionado a que se mejora el ambiente ruminal, favoreciendo el crecimiento y actividad de los microorganismos que degradan la fibra (Chaucheyras *et al.*, 1995). En esta investigación, el T2 presentó la mayor concentración de ácido acético, propiónico y butírico, este comportamiento propone que la cepa KI2 favoreció el ambiente microbial incrementando el número de bacterias celulolíticas provocando una mayor digestibilidad de la MS y FDA, disminuyendo el contenido de LDA como se muestra en el Cuadro 15. Dolezal *et al.* (2005) observaron un incremento en la producción de AGV al incrementar la dosis del cultivo de levadura Sc (cepa SC-47) en la alimentación de vacas Holstein en producción. Koul *et al.* (1998) mencionaron que se incrementó el total de AGV en el rumen de terneros búfalos alimentados con 5 g/d de un cultivo de levadura que contenía Sc al compararse con el grupo control (132.2 y 122.4 mmol/L). Sin embargo, Harrison *et al.* (1988) encontraron una disminución en la proporción molar de ácido acético incrementándose la concentración de ácido propiónico en el líquido ruminal de vacas Holstein suplementadas con 114 g/d de un cultivo de levadura que contenía Sc.

Concentración de N-NH₃, Ácido Láctico y pH

El Cuadro 18 muestra las concentraciones de N-NH₃ y ácido láctico, así como el pH entre tratamientos. La mayor ($P<0.05$) concentración de N-NH₃ lo mostró el T4 en comparación con T1, T2 y T3 (5.34, 3.06, 3.28 y 3.63 mM/mL, respectivamente). De igual manera, el mismo tratamiento tuvo mayor ($P<0.05$) concentración de ácido láctico (0.69 mM/mL) en comparación al resto de los tratamientos (0.44, 0.52 y 0.63 mM/mL para el T1, T2 y T3). Por otro lado, el pH en el T1 fue mayor ($P<0.05$) en comparación con T3 y T4 (7.00, 6.83 y 6.59, respectivamente).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). La digestión de las proteínas está relacionada con su solubilidad dentro del rumen, cuando la solubilidad es menor disminuye la liberación de amoníaco. Moloney y Drennan (1994) reportaron que varias fuentes de nitrógeno contribuyen a la producción de amoníaco, tales como, el nitrógeno no proteico (NNP) de la dieta, nitrógeno salival y posiblemente pequeñas cantidades de urea que penetran a través del epitelio del rumen.

En el presente estudio la mayor concentración de N-NH₃ se observó en el T4, esto tal vez se debió a que la cepa I03 mejoró el ambiente microbial provocando una mayor actividad de los microorganismos, incrementando la digestibilidad de la MS y FDN aumentando la concentración de N-NH₃ producto de la fermentación. Fonty y Chaucheyras-Durand (2006) mencionaron que el efecto del cultivo de levaduras en la concentración de N-NH₃ es muy variable, lo cual depende de factores abióticos (la dieta) y bióticos (microorganismos del rumen). En otro estudio, Williams *et al.* (1991) reportaron que la disminución en la concentración de N-NH₃ en rumen de animales suplementados con cultivos de levaduras puede resultar en un incremento en la incorporación de amoníaco a la proteína microbial, lo cual puede provocar mejor actividad de los microorganismos del rumen, otra posible razón, puede ser por la reducción de la actividad de bacterias proteolíticas del rumen, como fue reportado en el estudio *in vitro* por Chaucheyras-Durand *et al.* (2005). Díaz (2011) reportó similar comportamiento de la cepa I03 la cual incremento la concentración de N-NH₃ en inóculos de levaduras durante la producción de gas *in vitro*.

Cuadro 18. Comportamiento en la concentración de N-NH₃, ácido láctico y pH entre tratamientos durante la fermentación *in vitro*

Variable	Tratamientos ¹				EE(±)
	T1	T2	T3	T4	
N-NH ₃ (mM/mL)	3.06 ^b	3.28 ^b	3.63 ^b	5.34 ^a	0.39
Ácido láctico (mM/mL)	0.44 ^c	0.52 ^{bc}	0.63 ^{ab}	0.69 ^a	0.06
pH	7.00 ^a	6.97 ^{ab}	6.83 ^b	6.59 ^c	0.05

^{abc} Medias con diferente literal en fila, son diferentes (P<0.05) entre tratamientos.

¹ T1 = Heno de avena (HA) + ensilaje de maíz (EM) + concentrado + *Saccharomyces cerevisiae* cepa 6; T2 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 2; T3 = HA + EM + concentrado + *Kluyveromyces lactis* cepa 11 y T4 = HA + EM + concentrado + *Issatchenkya orientalis* cepa 3.

Ácido láctico y pH. Martin y Nisbet (1992) mencionaron que la incorporación de cultivos de levadura en la dieta de rumiantes, ayuda a disminuir la concentración de lactato en el rumen por consecuencia de estimular a las bacterias que fermentan lactato como *Selenomonas ruminantium* (*Sel. ruminantium*) y *Megasphaera elsdenii* (*M. elsdenii*), previniendo efectos asociados a una acidosis láctica. Otros estudios, han demostrado que *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) adicionados en la dieta de rumiantes, disminuyen la concentración de lactato por estímulo de las bacterias que lo utilizan, tales como *Sel. ruminantium* y *M. elsdenii* (Waldrip y Martin, 1993). En este experimento, la mayor concentración de ácido láctico lo presentó el T4, esto tal vez debido a que la cepa lo3 no estimula en gran medida a las bacterias ácido lácticas que lo utilizan, tal como es indicado por varios autores. Díaz (2011) encontró similar comportamiento de la cepa lo3 la cual incrementó la concentración de ácido láctico en inóculos de levaduras durante la producción de gas *in vitro*. Por otro lado, el pH ruminal refuerza el balance entre la capacidad amortiguadora y la acidez de la fermentación, aún y cuando no puede definirse un pH óptimo en el medio ruminal, los microorganismos presentan cierto intervalo en el cual se reproducen mejor y su metabolismo es más eficiente (Wales *et al.*, 2004). El pH bajo inhibe la producción de N-NH₃ *in vitro* provocando un efecto negativo a las bacterias metanogénicas (*Methanobacterium bryantii*, *M. formicicum* y *Metanosarcina barkeri*) y protozoarios en la degradación de la fibra (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

En la presente investigación el T1 presentó el pH más alto al cotejarse con el T3 y T4, pero fué similar al T2, esto tal vez debido a que la cepa Sc6 optimizó el ambiente microbial manteniendo la neutralidad del pH provocando una disminución en la

concentración de ácido láctico. La reducción de la cantidad de ácido láctico resulta en un incremento del pH ruminal que favorece el crecimiento de las bacterias celulolíticas, favoreciendo un incremento en la digestibilidad de la fibra y en la producción de AGV (Chaucheyras-Durand y Fonty, 2001). Sin embargo, bajo las condiciones en las que se desarrolló esta investigación, la cepa Sc6 no favoreció la concentración de AGV ni mejoró la digestibilidad de la fibra al compararse con las cepas KI2, KI11 e Io3. La adición de Sc en la dieta de rumiantes, resulta frecuentemente en un incremento en el número de bacterias celulolíticas (*F. succinogenes*, *R. albus*), tanto *in vitro* como *in vivo* (Lila *et al.*, 2004). Chaucheyras *et al.* (1995) reportaron que Sc parece estimular la utilización de lactato por *M. elsdenii* y *Sel. ruminantium*, resultando en una mayor síntesis de propionato. Scharrer y Lutz (1990) mencionaron que la disminución del pH ruminal, está asociada a una mayor producción de AGV y por consiguiente reduce la concentración de N-NH₃.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición de las cepas de levadura en el T2 (KI2), T3 (KI11) y T4 (Io3) en la dieta testigo de becerros destetados, favoreció la digestibilidad de la MS, siendo el último tratamiento quien mostró un incremento en la digestibilidad de la FDN.

La adición de KI (cepa 2 y 11) en la dieta evaluada, aumentaron el porcentaje de digestibilidad de la FDA, y junto con Io3 mostraron una marcada disminución en el contenido de LDA.

La cepa KI11 presentó el mayor volumen de gas a las 96 h de incubación *in vitro*. Así mismo, aunada a Io3 aumentaron la tasa máxima de producción de gas durante la fermentación ruminal. Siendo KI2 quien mayor incremento tuvo en la concentración de ácidos acético y propiónico. Por otro lado, KI2, Sc6 e Io3 aumentaron la producción de ácido butírico.

Por otra parte, Io3 presentó un incremento en la cantidad de N-NH₃ y ácido láctico, siendo Sc6 quien mostró un claro aumento de pH durante la fermentación *in vitro*.

En base a los resultados y el comportamiento observado en este estudio de las cepas KI2, KI11 e Io3 se recomienda desarrollar más investigación, bajo diferentes niveles de inclusión a fin de alcanzar una mejor respuesta animal.

LITERATURA CITADA

- Allen, M. S. y M. Mertens. 1988. Evaluating constraints on the fiber digestion by rumen microbes. *J. Nutr.* 118:261-270.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Vol. I. 16th ed. International Arlington. VA. E. U. A.
- Biricik, H. y İ. İ. Türkmen. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fibre of different forage: concentrate ratios in diets. *Veteriner Fakultesi Dergisi, Uludag University.* 20:29-37.
- Broderick, G. A. y J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *J. Dairy Sci.* 63:64-75.
- Brossard, L., F. Chaucheyras-Durand, B. Michalet-Doreau y C. Martin. 2006. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Anim. Sci.* 82:829-836.
- Brotz, P. G. y D. M. Schaeffer. 1987. Simultaneous determination of lactic acid and volatile fatty acids in microbial fermentation extracts by gas-liquid chromatography. *J. Microbiol. Methods.* 6:139-144.
- Callaway, E. S. y S. A. Martin. 1997. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035-2044.
- Carro, M. D., P. Lebzein y K. Rohr. 1992. Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation of diets containing variable portions of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37:209
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin y P. Gouet. 1995. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environ. Microbiol.* 61:3466-3467.
- Chaucheyras-Durand, F. y G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:57-68.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker y A. Bach. 2008. Effects of active dry yeast on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5-26.

- Chaucheyras-Durand, F., S. Masséglia y G. Fonty. 2005. Effect of the microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown in vitro. *Curr. Microbiol.* 50:96-101.
- Cone, J. W., A. H. Van Gelder y H. Valk. 1998. Prediction of nylon bag degradation characteristics of grass samples with the gas production technique. *J. Sci. Food Agric.* 77:421-426.
- Díaz, P. D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih. Mex.
- Díaz, P. D. 2011. Desarrollo de un inóculo a base de levaduras y su efecto en la cinética de fermentación in vitro en raciones para vacas Holstein altas productoras. Tesis de Doctorado. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih. Mex.
- Dolezal, P., J. Dolezal y J. Trinacty. 2005. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation in dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.* 50:503-510.
- Erasmus, L. J., P. H. Robinson, A. Ahmadi, R. Henders y J. E. Garrett. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:219-239.
- Fadel El-seed, A. N. M. A., J. Sekine, H. E. M. Kamel y M. Hishinuma. 2004. Changes with time after feeding in ruminal pool sizes of cellular contents, crude protein, cellulose, hemicellulose and lignin. *Indian J. Anim. Sci.* 74:205-210.
- Fonty, G. y F. Chaucheyras-Durand. 2006. Effects and modes of action of live yeast in the rumen. *Biology.* 61:741-750.
- Goering, H. K. y P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). Pag. 379. En *Agric. Handbook*. USDA-ARS, Washington, DC. E. U. A.
- Guedes, C. M., D. Gonçalves, M. A. M. Rodrigues y A. Dias-da-Silva. 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fiber degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:27-40.
- Harrison, G. A., R. W. Hemken, K. A. Dawson, R. J. Harmon y K. B. Barker.

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.
- INAFED, 2008. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/chihuahua/>. Consultado en septiembre 10, 2012.
- Karma, D. N., L. C. Chaudhary, S. R. Neeta Agarwal y N. N. Pathak. 2002. Growth performance, nutrient utilization, rumen fermentation and enzyme activities in calves fed on *Saccharomyces cerevisiae* supplemented diet. *Indian J. Anim. Sci.* 72:472
- Kholif, S. M. y M. M. Khorshed. 2006. Effect of yeast or selenized yeast supplementation to rations on the productive performance of lactating buffaloes. *Egypt. J. Nutr. Feed.* 9:193-205.
- Koul, V., U. Kumar, V. K. Sareen y S. Singh. 1998. Mode of action of yeast culture (Yea-Sacc¹⁰²⁶) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. *J. Sci. Food Agric.* 77:407-413.
- Lavrencic, A., B. Stefanon y P. Susmel. 1997. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science.* 64:423-431.
- Lila, Z. A., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda y H. Itabashi. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Martin, S. A. y D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736.
- Menke, K. H. y H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:7-55.
- Moloney, A. P. y M. J. Drennan. 1994. The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 50:55-73.
- Muro, R. A. 2007. Cinética de degradación ruminal de tres fuentes de forraje mediante la técnica de digestibilidad *in vitro* por producción de gas. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. Chih., Mex.

- Nagaraja, T. G. y E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17-38.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, X. B. Chen y F. M. McIntosh. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811-1818.
- Noguera, R. R., E. O. Saliba y R. M. Mauricio. 2004. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 16, Art. No. 86. <http://www.lrrd.org/lrrd16/11/nogu16086.htm>. Consultado en octubre 10, 2012.
- Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bony y P. Gouet. 1990. Effects of physicochemical factor on the adhesión to cellulose avicel of the rumen bacteria. *Ruminococcus flavafaciens* and *Fibrobacter succinogenes*. *Applied Environ. Microbiol.* 56:3081-3087.
- SAS. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS. Institute Inc. Estados Unidos de Norteamérica.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin y P. Schmidely. 2004. Rumen Acidosis. Modeling Ruminant. Proceeding of the alltech's 20th annual symposium. Reimagining the feed industry, may 23-26,2004. Nottingham University Press. Londres. Reino Unido.
- Scharrer, E. y T. Lutz. 1990. Effects of short chain fatty acids and K on absorption of Mg and other cations by the colon and caecum. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft.* 29:162-168.
- Sewalt, V. J. H., W. G. Glasser, J. P. Fontenot y V. G. Allen. 1996. Lignin impact on fiber degradation. 1 quinone methide intermediates formed from lignin during *in vitro* fermentation of corn stover. *J. Sci. Food Agric.* 71:195-203.
- Steel, D. R. G. y J. H. Torrie. 1997. Bioestadística. Principios y procedimientos. 2ª Ed. McGraw-Hill. México.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:49-58.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan y J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.

- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2a ed. Cornell University Press. Ithaca, New York. E. U. A.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy. Sci. 74:3579-3583.
- Waldrip, H. M. y S. A. Martin. 1993. Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 71:2770-2776.
- Wales, W. J., E. S. Kolver, P. L. Thorne y A. R. Egan. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility on highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. J. Dairy Sci. 87:1864-1871.
- Whetten, R. y R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. The plant cell. 7:1001- 1013.
- Williams, P. E. V., C. A. G. Tait, G. M. Innes y C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of sheep and steers. J. Anim. Sci. 69:3016-3026.

FOR AUTHOR USE ONLY

**More
Books!**



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.morebooks.shop

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en
www.morebooks.shop

KS OmniScriptum Publishing
Brivibas gatve 197
LV-1039 Riga, Latvia
Telefax: +371 686 20455

info@omniscryptum.com
www.omniscryptum.com

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY