



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**IMPACTO DE EXTRACTO DE SAUCE LLORÓN  
(*Salix babylonica*) Y ENZIMAS EXÓGENAS  
EN DIETAS PARA CORDEROS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA**

**M.V. Z. KARLA IVONNE VALDÉS MEDINA**

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2014.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**IMPACTO DE EXTRACTO DE SAUCE LLORÓN  
(*Salix babylonica*) Y ENZIMAS EXÓGENAS  
EN DIETAS PARA CORDEROS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA**

**M.V. Z. KARLA IVONNE VALDÉS MEDINA**

**COMITÉ TUTORIAL**

**DR. Abdel Fattah Zeidan Mohamed Salem**      Tutor Académico

**Dr. Manuel González Ronquillo**                      Tutor Adjunto

**Dr. Rolando Rojo Rubio**                                  Tutor Adjunto



EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2014.



## **DEDICATORIA**

*A Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida y por todo lo que me ha brindado.*

*A mis padres Heladio Valdés Arzate y Elodia Medina López por la educación e inmenso apoyo que me han regalado en cada etapa de mi vida, siempre les estaré agradecida por el gran esfuerzo que hacen por ayudarme, por el ánimo, consistencia y confianza.*

*A mi hermana Sandra Rosa Valdés Medina por su tiempo, motivación para seguir adelante y por estar siempre conmigo.*

*Al ser que llena mi vida de paz, alegría, amor, admiración y desafíos.*

*A mis compañeros a los cuales he aprendido a querer y admirarlos, Chinito, Don Toñito, Rodo, Arthur, Yu, Lasho, Pau, Anita, Yoa, Nalle, Lau... a los que deseo que siempre les vaya bien en todo lo que hagan.*

*A mis profesores que ponen mucho de su parte en cada alumno.*

*A todos que de alguna u otra manera participaron para la culminación de esta etapa.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada.

A la **Universidad Autónoma del Estado de México**, por permitirme ser parte del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

A mis tutores:

**Dr. Abdel Fattah Zeidan Mohamed Salem** por permitirme ser parte del proyecto....por su voto de confianza por aceptarme como alumna y por sus conocimientos brindados.

Al **Dr. Manuel González Ronquillo** que es una persona admirable y llena de conocimientos, por darme por segunda vez la oportunidad de trabajar con él, por sus consejos y apoyo incondicional en el proceso de mi trabajo...un placer trabajar con usted.

Al **Dr. Rolando Rojo Rubio** por aceptarme como alumna por sus consejos en los tutoriales y por enriquecer mi trabajo.

A la **Universidad de León, España** por permitirme realizar una estancia, a la **Dra. María José Ranilla García** por su amistad y sugerencias aportadas para la realización del trabajo.

A todos los que me ayudaron de forma directa o indirecta en la realización de este trabajo.

*A todos...*

*Gracias.*

## CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Anatomía y Fisiología del Rumen	3
2.2. Ecosistema microbiano ruminal	4
2.2.1. Microorganismos Ruminales	4
2.2.2. Bacterias Ruminales	5
2.2.3. Protozoarios Ruminales	11
2.2.4. Hongos Ruminales	12
2.2.5. Factores que afectan la población de microorganismo del rumen	13
2.2.6. Importancia de los microorganismos ruminales	14
2.2.7 Modulación de la Fermentación Ruminal	15
2.2.8. Alternativas para disminuir la emisión de gases en fermentación ruminal	15

<b>2.3. La Alimentación de los Rumiantes</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1. Aditivo</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2. Antibióticos como Promotores del Crecimiento</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3. Resistencia Bacteriana a los Antibióticos</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4. Probióticos</b>	<b>20</b>
<b>2.3.5. Enzimas exógenas</b>	<b>23</b>
<b>2.3.6. Extractos vegetales</b>	<b>24</b>
<b>2.3.6.1. Sauce Llorón</b>	<b>26</b>
<b>2.4. Proteína Microbiana Ruminal</b>	<b>27</b>
<b>2.4.1. Digestión de la proteína en los rumiantes</b>	<b>27</b>
<b>2.4.2. Síntesis de Proteína Microbiana</b>	<b>27</b>
<b>2.4.3. Factores que Influyen en la Síntesis de Proteína Microbiana</b>	<b>30</b>
<b>2.4.4. Derivados Puricos</b>	<b>31</b>
<b>2.4.5. Estimación de la Síntesis de Proteína Microbiana a Partir de la Excreción Urinaria diaria de Derivados Puricos</b>	<b>33</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>IV. HIPOTESIS</b>	<b>37</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>5.1. General</b>	<b>38</b>

<b>5.1.1. Específicos</b>	<b>38</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>6.1. Animales y dietas</b>	<b>40</b>
<b>6.2. Elaboración del extracto</b>	<b>41</b>
<b>6.3. Manejo de animales</b>	<b>42</b>
<b>6.4. Colección de Datos y Muestras</b>	<b>42</b>
<b>6.5. Análisis de Laboratorio</b>	<b>43</b>
<b>6.6. Cálculos y análisis estadístico</b>	<b>44</b>
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	<b>72</b>
<b>X. BIBLIOGRAFIA CITADA</b>	<b>73</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>PÁG.</b>
<i>Cuadro 1. Capacidades relativas de las divisiones del estómago del ternero en función de la edad, expresadas como porcentaje de la capacidad gástrica total.</i>	<b>4</b>
<i>Cuadro 2. Características generales de las bacterias que habitan en el rumen.</i>	<b>8</b>
<i>Cuadro 3. Clasificación por especies de los protozoarios ruminales con los sustratos preferentemente fermentados. (Van Soest, 1994)</i>	<b>12</b>
<i>Cuadro 4. Microorganismos usados en alimentación animal como probióticos.</i>	<b>22</b>
<i>Cuadro 5. Efectos de la suplementación con enzimas en ganado vacuno de engorde a base de forraje (Beauchemin et al., 1995)</i>	<b>24</b>

## INDICE DE FIGURAS

	<b>PAG.</b>
<i>Figura 1. L. acidophilus (Kunkel, 2001)</i>	<b>23</b>
<i>Figura 2. Árbol de Sauce llorón (Salix babylonica)</i>	<b>26</b>
<i>Figura 3. Sistema de proteína metabolizable (AFRC, 1993)</i>	<b>30</b>
<i>Figura 4. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen.</i>	<b>35</b>

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto que tiene sobre la respuesta productiva la adición de extracto de *Salix babylonica*, enzimas exógenas ZADO ® en dietas para corderos y estimar la síntesis de proteína microbiana mediante la excreción urinaria de derivados puricos (DP). Se utilizaron 16 corderos de raza Suffolk ( $28.5 \pm 2$  kg PV) alojados en jaulas individuales donde recibieron su comida y agua de forma individual durante 60 días, con 10 días de adaptación a la dieta, posteriormente se colocaron en jaulas metabólicas individuales durante 7 días, los corderos fueron asignados a cuatro tratamientos, se alimentaron dos veces al día (0800-1600 h) con 30% de concentrado (16% de PC, 3,2 Mcal EM / kg MS) y 70% de ensilaje de maíz (8% de PC, 2,8 Mcal EM / kg MS) como dieta basal (CONTROL), y se les adicióno extracto de *Salix babylonica* (30 ml / d) (SB), enzimas exógenas ZADO ® (10 g / d) (EZ) y *Salix babylonica* extracto (30 ml / d) + enzimas exógenas ZADO ® (10 g / d) (EZSB). Los tratamientos se analizaron en un diseño completamente al azar. LA GDP y CA fueron mejores ( $P < 0.05$ ) en EZSB con respecto al resto de los tratamientos, el consumo de agua fue mayor ( $P < 0.05$ ) para SB en comparación con los tratamientos, el CMS fue mayor ( $P < 0.05$ ) para los corderos de EZ y la digestibilidad de MS y MO fue superior ( $P < 0.05$ ) en EZ y EZSB; en cuanto a la ingestión de N fue superior ( $P < 0.05$ ) en EZSB y EZ y la menor excreción de N con un 11.7 % fue para EZSB; para la excreción de DP, EZSB fue superior ( $P < 0.05$ ) en la excreción de alantoina, ácido úrico fue superior ( $P < 0.05$ ) en los corderos del tratamiento EZ y SB mientras que la excreción de DPT fue mayor ( $P < 0.05$ ) en EZSB para creatinina no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos. Como conclusión la adición de 10 g de enzimas fibrolíticas exógenas o en combinación con extracto de *Salix babylonica* en la dieta de las ovejas, aumenta los parámetros productivos y la síntesis de proteína microbiana.

## **ABSTRACT**

We used 16 Suffolk lambs ( $28 \pm 0.8$  kg BW) housed in individual cages for 60 days allotted to four treatments, feed with 30 % concentrate (16% CP, 3.2 Mcal ME / kg DM) and 70 % corn silage (8 %CP, 2.8 Mcal ME/kg DM ) as a basal diet (CONTROL) , and were added Salix babylonica extract (30 ml / d) (SB), exogenous enzymes ZADO ® (10 g / d) (EZ) and exogenous enzymes ZADO ® + S. babylonica extract (10 g + 30 ml / d respectively) (EZSB) then placed in individual metabolic cages and determined digestibility balance. The treatments were analyzed in a completely randomized design. The ADG and FC were higher (  $P < 0.05$ ) in EZSB compared to other treatments, water consumption was higher (  $P < 0.05$ ) for SB relative to other treatments, DMD was higher (  $P < 0.05$  ) for EZ, and digestibility of DM and OM was higher (  $P < 0.05$ ) for EZSB and EZ, N intake was higher (  $P < 0.05$ ) for EZ and EZSB; excretion of allantoin and uric acid was higher (  $P < 0.05$ ) EZSB than EZ and SB; TPD excretion was higher (  $P < 0.05$ ) in EZSB. No significant differences (  $P > 0.05$  ) were observed for creatinine between treatments. The A / C ratio was higher for EZSB(  $P < 0.05$ ) compared to CONTROL followed for EZ and SB. The Microbial nitrogen was (  $P < 0.05$  ) higher for EZSB vs. CONTROL and Metabolizable protein was (  $P < 0.05$  ) lower for SB compared to EZSB . In conclusion the addition of 10 g of exogenous fibrolytic enzymes or in combination with Salix babylonica extract in the diet of sheep, increases production parameters having a positive impact on the use of N and microbial protein synthesis.

**Keywords :** purine derivatives , additive lambs , allantoin, plant extract.

## **I. INTRODUCCION**

La búsqueda de alternativas de alimentación de bajo costo y de mínimo uso de insumos externos para apoyar la producción animal en las zonas de escasez de México ha propiciado la exploración de fuentes alimentarias no convencionales. El elevado costo de la alimentación suplementaria a base de concentrados proteicos ha motivado al estudio y utilización de arbóreas forrajeras, que tengan un mayor valor nutricional. En México existen árboles nativos, que pueden ser una alternativa para las condiciones en la época seca, cuando los forrajes son escasos y de mala calidad (Palma *et al.*, 1995; Jiménez Peralta *et al.*, 2011).

Para el año 2025 se espera que la actual población humana se incremente en un 60% y la superficie urbanizada aumente alrededor del 70-80%, los que en forma conjunta, producirán un aumento considerable de la demanda de alimentos (Delgado *et al.* 1999). La actual producción de alimentos de origen animal, enfrentara en el corto plazo un importante desafío para aumentar de manera considerable las actuales producciones pecuarias, conjuntamente para ese mismo año, la demanda de las fuentes energéticas para la alimentación animal será mayor, ya que alcanzara el doble de lo que se produce actualmente. Esta mayor demanda en la producción de alimentos de origen animal debe realizarse dentro del concepto de sustentabilidad, es decir, incrementando la productividad por animal y no el rendimiento por unidad de superficie (Ramos *et al.*, 1998). Esta situación ha hecho que los científicos de diversas disciplinas evalúen distintas alternativas para hacer un uso más eficiente de los alimentos empleados en la alimentación animal, particularmente los granos y los forrajes. En la alimentación de rumiantes se han estado investigando diversas alternativas, tales como la selección de granos y forrajes de mayor valor nutricional (Bañuelos *et al.*, 1995), la manipulación de los microorganismos ruminales (Mendoza *et al.*, 1995), el uso de aditivos que modifiquen el patrón de la fermentación ruminal (Miranda *et al.*, 1996),

el desarrollo de prácticas de alimentación más eficientes, el reciclaje de excretas (Martínez- Avalos *et al.*, 1998, Bórquez *et al.*, 2011) el empleo de alimentos no convencionales (Ortega *et al.* 1998), el uso de tratamientos químicos o biológicos en los alimentos (Martínez *et al.*, 1995; Montañez *et al.*, 2004), el uso de enzimas exógenas para incrementar la digestibilidad de las paredes celulares (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2002) y del almidón (Mora *et al.* 2002; Buendía *et al.* 2003; Gutiérrez *et al.* 2005; Rojo *et al.* 2005; Zinn *et al.*, 2011). Recientes reducciones en los costos de la fermentación junto con más activos y bien definidos productos enzimáticos, han llevado a los investigadores a volver a examinar el papel de las enzimas exógenas en la producción de rumiantes (McAllister *et al.*, 1999).

Las enzimas exógenas representan una alternativa para incrementar la productividad y reducir los costos en la alimentación de los rumiantes (Mendoza, 1995; Bart y Oliver, 2001). Mejoran la digestibilidad del almidón o favorecen la degradación de los carbohidratos estructurales de la pared celular, ya que su uso ha reportado incrementos en la digestibilidad de la fibra (ensilados y alfalfa) (Yang *et al.*, 1999). Pero existen pocas investigaciones empleando esquilmos agrícolas, para eficientar la digestión y utilización de los nutrimentos de estos alimentos (Tirado *et al.*, 2001; Carreón, 2003). Mientras los metabolitos secundarios de los extractos de plantas resultan ser una alternativa en la alimentación animal ya que cuentan con la capacidad de cambiar la actividad de la fermentación ruminal microbiana. Dicha actividad es consecuencia de la acción de los metabolitos secundarios como lo son los taninos, saponinas y aceites esenciales

El presente estudio tiene como finalidad analizar el impacto de extracto de *Salix babylonica* y enzimas exógenas fibrolíticas (ZADO) sobre la respuesta productiva, digestibilidad y síntesis de proteína microbiana en corderos en crecimiento.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Anatomía del rumen**

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje. Esta característica se basa en la posibilidad de poder degradar los hidratos de carbono estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digeribles para las especies de estómago simple o no-rumiantes. Basada en esta diferencia fundamental, la fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares. La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas digestivas, y los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales (DE). Por esta razón tenemos que tener presente que al alimentar a los rumiantes primero estamos alimentando a los microorganismos rúmiales, y que para su buen desarrollo tiene que haber un medio ruminal favorable para ello. De esta forma hay una simbiosis entre las bacterias y el animal. Esta digestión fermentativa, si bien favorece al rumiante al permitirle degradar hidratos de carbono estructurales, también afecta la digestión de todos los demás componentes de la dieta, expuestos a los mismos procesos fermentativos, sin que esto represente siempre una ventaja desde el punto de vista del mejor aprovechamiento del alimento. (Relling y Mattioli. 2003).

El ternero nace con su aparato digestivo adaptado a una dieta láctea, y por lo tanto, propia de un no-rumiante. Por esta razón los DE, no funcionales, son pequeños al nacimiento y el cierre de la gotera esofágica desvía la leche directamente al abomaso. La gotera esofágica es una estructura anatómica que conecta el esófago con el abomaso. Bajo condiciones normales de alimentación los DE se van desarrollando mientras se hacen funcionales (Cuadro 1).

Cuadro 1 - Capacidades relativas de las divisiones del estómago del ternero en función de la edad, expresadas como porcentaje de la capacidad gástrica total.

EDAD	RETICULO- RUMEN %	OMASO %	ABOMASO %
NEONATO	40	4	56
3 SEMANAS	48	4	36
7 SEMANAS	66	4	23
ADULTO	85-90	3-5	8-9

(Relling y Mattioli, 2003).

## **2.2. Ecosistema microbiano ruminal**

### **2.2.1. Microorganismos ruminales**

Los microorganismos ruminales han habitado en él durante poco más de 70 millones de años y se ha formado una relación de ecología (Oekologie, del griego oikos que significa “casa” y logos “ciencia”) ruminal, donde el rumen es un ecosistema microbiano con complejas interrelaciones. El sistema microbiano ruminal es un activo proceso regulado mediante complejos mecanismos bioquímicos. En el rumen existe una fase gaseosa donde podemos encontrar metano (CH<sub>4</sub>) y CO<sub>2</sub>, y otra acuosa que tiene dos estratos: estrato ventral (90 % agua y 10 % MS), donde están las partículas de alimento de mayor densidad y de forraje con más de 12 h de digestión; estrato superior (80 % agua y 20 % MS) conformado por un manto de forraje de baja densidad. Por tanto, los estratos



difieren en composición y actividad microbiana; en la fase acuosa los microorganismos son anaerobios estrictos, con una menor cantidad de anaerobios facultativos. Las bacterias forman la mayor parte de esos microorganismos, hay un máximo de 40 % de protozoarios y menos de 8 % de hongos. Cheng y Costerton (1980) postularon que los microorganismos del rumen pueden ser clasificados en tres grupos: (I) los microorganismos que se adhieren a la pared del rumen, (II) los que viven libremente y (III) los que están adheridos a las partículas del alimento. Este último grupo representa 75 % del total de microorganismos ruminales y desde el punto de vista ecológico son los que presentan las mayores ventajas, ya que los otros pueden ser removidos del rumen más rápidamente por el flujo de la digesta. Un factor importante para alcanzar una actividad microbiana óptima es que los microorganismos dispongan de los sustratos necesarios para su mantenimiento y crecimiento. En ausencia de energía fermentable y algunos otros nutrientes exógenos, el 60 % de las bacterias ruminales podrían morir en un 14 lapso de tiempo de 2 horas y alrededor del 30 % o más podrían lisiarse debido a la inanición (Hespell, 1979). Por tanto, es necesario garantizar energía y nitrógeno suficiente y además minerales, vitaminas, péptidos y aminoácidos, si se quiere obtener una velocidad de digestión de la fibra y una síntesis de proteína óptima. Como se puede observar el ecosistema ruminal es enormemente complejo, responde a cambios dietarios y la optimización de la fermentación ruminal dependerá en gran medida del entendimiento que se logre tener de los mecanismos reguladores de los procesos que tienen lugar en el rumen.

### **2.2.2. Bacterias ruminales**

La mayor parte de las bacterias del rumen son anaerobias estrictas, pero existe un porcentaje considerable de ellas que son anaerobias facultativas, capaces de vivir en presencia de oxígeno y además, de utilizarlo (Van Soest, 1994). Las bacterias suponen el 50-60% de la masa microbiana del rumen (Stewart y Bryant, 1988) y de los grupos microbianos que viven en él son las que tienen el ritmo de

generación más elevada y la menor tasa de retención, constituyendo, por consiguiente, la mayor fuente de nitrógeno para el rumiante. Las bacterias que habitan el rumen se pueden clasificar de diferentes formas. Una de las más extendidas es la basada en el sustrato que utilizan (Yokohama y Johnson, 1988). Los forrajes fibrosos se degradan por las denominadas bacterias celulolíticas. Su actividad se debe a un complejo enzimático extracelular con funciones específicas para la degradación de la celulosa, hidrolizando los enlaces  $\beta$  1-4 hasta glucosa (Yokohama y Johnson, 1988). Son anaerobias estrictas, y su rango óptimo de pH oscila entre 6,3 y 6,8; si el mismo desciende por debajo de 6,3 su actividad se ve afectada. Existe la idea de que las bacterias que hidrolizan carbohidratos complejos utilizan nitrógeno amoniacal, mientras que las que fermentan azúcares simples utilizan proteína preformada (Russell et al., 1992). Su ritmo de crecimiento depende además de la disponibilidad de ácidos grasos de cadena ramificada, siendo un grupo de crecimiento lento cuya tasa de renovación ronda las 18 horas. Predominan en el rumen cuando el animal recibe dietas con elevada proporción de forraje, disminuyendo su número si aumentan los carbohidratos solubles (Grant y Mertens, 1992). Como ácido graso principal producto de su metabolismo se obtiene ácido acético, y en menor medida ácido propiónico y ácido butírico. La hemicelulosa y las pectinas también son degradadas gracias a enzimas extracelulares producidas por algunas bacterias celulolíticas, y también hay grupos que utilizan específicamente estos sustratos (Van Soest, 1994).

El almidón se degrada por las bacterias amilolíticas por medio de enzimas extracelulares que rompen aleatoriamente los enlaces  $\alpha$  1-4 de las cadenas del mismo (Yokohama y Johnson, 1988). Sintetizan la proteína a partir de aminoácidos y también de amoníaco. Además son menos sensibles a las variaciones del pH ruminal, con un valor óptimo de crecimiento que oscila entre 5,5 y 6,6 (Hoover, 1986). Predominan en el rumen de animales alimentados con dietas con elevada proporción de carbohidratos solubles. Muchas bacterias

amilolíticas también pueden fermentar azúcares sencillos y carbohidratos de bajo peso molecular liberados durante la hidrólisis de otros más complejos, pero sin adherirse a las partículas. Producen mayor cantidad de ácido propiónico que las celulolíticas. Existen especies con una actividad degradante específica para un determinado sustrato. Algunas bacterias utilizan los ácidos orgánicos (láctico, succínico, fórmico) resultantes de la fermentación llevada a cabo por otros microorganismos (Wolin et al., 1997). De esta forma se eliminan del medio ruminal productos que, de acumularse en exceso, podrían inhibir la fermentación (Ørskov y Ryle, 1990). La proteína contenida en el alimento se degrada mediante enzimas producidas por las bacterias proteolíticas. En el proceso de degradación de la cadena polipeptídica intervienen diferentes especies en cada uno de los pasos. En primer lugar se produce la proteólisis rompiéndose las proteínas y los péptidos entran al interior de las bacterias donde son degradados a aminoácidos que posteriormente formarán parte de la proteína microbiana o desaminados para dar lugar a ácidos grasos volátiles, amoníaco y ácidos carboxílicos (Stewart y Bryant, 1988). Los ácidos grasos volátiles producidos durante la fermentación de las proteínas son el isobutírico, el isovalérico y el 2-metilbutírico. Las bacterias pueden formar directamente aminoácidos a partir de nitrógeno no proteico (como amoníaco, nitratos y urea) y ácidos grasos volátiles. La urea es degradada por las bacterias ureolíticas que forman parte importante de la flora epimural.

Cada mililitro de contenido ruminal alberga alrededor de 10 000 a 50 000 millones de bacterias, siendo estos los microorganismos más abundantes. Las bacterias se encuentran en una gran variedad de géneros y especies por lo menos 28 especies funcionalmente importantes, las cuales se agrupan de acuerdo a su actividad. La mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas, que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno, sin embargo también se encuentran presentes organismos facultativos. Según González (2002) la mayoría de las bacterias que podemos encontrar en el rumen son anaerobias estrictas, Gram negativas donde se

observan bacilos, cocos, cocobacilos, espiroquetas y esporoformes, siendo las principales responsables de fermentación ruminal. Algunos de los principales grupos de bacterias, de acuerdo con el sustrato utilizado, son los siguientes:

**Celulolíticas:** Bacteroides ruminicola, Butyrivibrio fibrisolvens, Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens, R. albus.

**Hemicelulolíticas:** Butyrivibrio fibrisolvens, Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens, R. albus.

**Amilolíticas:** Bacteroides amylophilus, B. ruminicola, Streptococcus bovis, Succinomonas amilolítica.

**Proteolíticas:** Bacteroides amylophilus, B. ruminicola, Butyrivibrio fibrisolvens, Streptococcus bovis .

**Pectinolíticas:** B. fibrisolvens y Lachnospira multiparus y varios protozoarios.

Cuadro 2. Características generales de las bacterias que habitan en el rumen.

ORGANISMO	MORFOLOGIA	MOVILIDAD	PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN	DNA (mol% C+G)	SUSTRATO
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	BACILO	-	Succinato, acetato, formiato	45-51	Celulosa
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	BACILO CURVADO	+	Acetato, formiato, lactato, butirato, H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	41	Celulosa
<i>Ruminococcus albus</i>	COCO	-	Acetato, formiato, H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>		
<i>Clostridium lochheadii</i>	BACILO (ESPORA)	+	Acetato, formiato, butirato H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	43-46	Celulosa
<i>Ruminococcus Flavefaciens</i>	COCO		Acetato, succinato y H <sub>2</sub>	39-44	Celulosa
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	BACILO (ESPORA)		Acetato, formiato, butirato y H <sub>2</sub>	-	Celulosa
<i>Bacteroides ruminicola</i>	BACILO	-	Formiato, acetato y succinato	40-42	Celulosa y almidon
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	BACILO	-	Formiato, acetato y succinato	49	Almidon
<i>Selenomonas ruminantium</i>	BACILO CURVADO	+	Acetato, propionato y lactato	49	Almidon
<i>Succinomas amylolytica</i>	OVALADO	+	Acetato, propionato y succinato	-	Almidon

Continuación...						
<b>Streptococcus Boris</b>	COCO	-	Lactato		50	Almidon
<b>Selenomonas lactilytica</b>	BACILO CURVADO	+	Acetato y Succinato		54	almidon
<b>Megasphaera elsdenii</b>	COCO	-	Acetato, propionato, butirato, valerato, coproato, H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>		38-41	Lactato
<b>Viellonella párvula</b>	COCO		Acetato, propionato y H <sub>2</sub>		-	Lactato
<b>Lachnospira multiparus</b>	BACILO CURVADO	+	Acetato, formiato, lactato, H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>		-	Lactato
<b>Anaerovibrio lipolytica</b>	BACILO		Acetato, propionato y succinato		-	Pectina
<b>Eubacterium ruminantium</b>	BACILO		Formiato, butirato, lactosa y CO <sub>2</sub>		44-47	Lipolítico
<b>Lactobacilos ruminis</b>	bacilo		lactosa		44-47	azucares
<b>Lactobacillus vitulinus</b>	BACILO		Lactosa		34-37	azucares
<b>Methanobrevibacter ruminantium</b>	BACILO	-	Lactosa		31	Xilano
<b>Methanomicrobium mobile</b>	BACILO	+	CH <sub>4</sub> (de H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> o formiato)		49	metanogenos
<b>Eubacterium oxidoreducens</b>	BACILO		Lactosa y H <sub>2</sub>		36	metanogenos

(González, 2002)

Como bien se conoce la mayor parte de los nutrientes energéticos que consumen los rumiantes se encuentran en la celulosa, hemicelulosa, y pectina de la pared celular así como en el almidón del contenido celular, de aquí la importancia de estos microorganismos en la alimentación de estos animales. Además, *B. amilophylus*, *Selenomonas ruminantium*, y *Streptococcus bovis*, al igual que algunas cepas de *B. succinogenes*, sintetizan amilasas (para fermentar almidón), mientras que *Megasphaera elsdenii* utiliza azúcares solubles. También algunas bacterias degradan componentes tóxicos de la dieta como los aminoácidos mimosina y sus derivados, componentes del forraje de *Leucaena*, fenoles vegetales como la cumarina (1,2 benzopirona), la canavanina, análoga a la arginina, componente de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, que inhibe algunas bacterias del rumen, pero es hidrolizada por otras. A pesar del papel de las

poblaciones protozoaria y fúngica del rumen en la digestión de la pared celular vegetal, parece claro que son las bacterias los microorganismos más activamente implicados en este proceso, tanto cualitativamente, por su alta actividad enzimática, como a nivel cuantitativo, por la magnitud de su repercusión debida a su elevada concentración en el rumen.

### ***Bacterias metanogénicas***

Las bacterias metanogénicas forman parte del dominio de las Arqueobacterias, que incluye tres tipos de bacterias: metanogénicas, las que producen metano; halófilas extremas, las que viven en medios salinos extremos, y termoacidófilas, las que subsisten en ambientes calientes y ácidos. De los tres tipos, las que predominan son las metanogénicas y han sido estudiadas por un gran número de autores (Galindo, 2006). Los metanógenos son quizás los organismos anaeróbicos más estrictos, requiriendo no solo condiciones libres de oxígeno, necesitan también un potencial redox menor que  $-330\text{mM}$ . La mayoría tiene tiempos de duplicación que va desde varias horas a varios días. Estos factores imposibilitaron el estudio de metanógenos en cultivos puros hasta mediados de la década de los 70, cuando el desarrollo de técnicas anaeróbicas perfeccionadas y cámaras de anaerobiosis seguras, simplificaron el crecimiento, aislamiento y manipulación de las bacterias metanogénicas. Otro impedimento para su estudio fue su débil crecimiento. El estudio de su nutrición, especialmente sus altos requerimiento de níquel, permitió el crecimiento suficiente para realizar estudios bioquímicos que demostraron vías metabólicas completamente nuevas (Galindo et al, 2006).

Las bacterias metanogénicas encontradas en el rumen son las siguientes: *Methanobacterium formicicum bryantii*; *Methanobrevibacter ruminantium smithii*; *Methanomicrobium mobile*; *Methanosarcina barkeriy*; *Methanoculleus olentangyi*

Han sido encontrado grupos de bacterias metanogénicas sobre la superficie del protozario entodiniomorfo, estando controlada su actividad probablemente por la concentración de hidrógeno en el líquido ruminal.

### **2.2.3. Protozoarios ruminales**

El número de protozoarios en el rumen es mucho menor que el de bacterias ( $10^5$  a  $10^6$  por ml) aunque, por su tamaño, los protozoarios pueden representar hasta el 40% de N total a nivel ruminal y proporcionar el 60% de los productos de la fermentación microbiana (Orpin, 1984).

Los protozoos del rumen son anaerobios estrictos y pertenecen a dos grupos taxónomicos, holotricos y entodiniomorfos, estos últimos presentan una mayor variedad de especies (Cuadro 3) estos últimos presentan una mayor variedad de especies. Los holotricos, se presentan en su totalidad cubiertos por finos cilios, son móviles y utilizan carbohidratos no estructurales, fundamentalmente solubles. Los entodiniomorfos son más específicos en sus requerimientos nutricionales y morfológicamente presentan mayor complejidad (Orpin, 1984)

Cuadro 3. Clasificación por especies de los protozoarios ruminales con los sustratos preferentemente fermentados (Van Soest, 1994).

<b>GENERO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>SUSTRATO FERMENTADO</b>
<b>HOLOTRICOS</b>	<i>Isotricha</i>	Almidón y azúcares
	<i>Dasytricha</i>	Almidón y azúcares
<b>ENTODINIOMORFOS</b>	<i>Entodinia</i>	Almidón
	<i>Epidinium</i>	Almidón y hemicelulosa
	<i>Ophryoscolex</i>	Almidón
	<i>Diplodinium</i>	Celulosa
	<i>Eudiplodinium</i>	Celulosa
	<i>Polyplastron</i>	Celulosa

#### **2.2.4. Hongos ruminales**

Junto con la población de bacterias y protozoos existe en el rumen una población importante de hongos. Estos hongos son anaeróbicos y colonizan los tejidos lignocelulolíticos de las plantas participando en la degradación de la fibra



(Orpin y Joblin, 1988). Los hongos se hallan firmemente asociadas a las partículas de digesta y ello hace posible su permanencia en el rumen a pesar de su largo tiempo de generación, la cantidad de masa fúngica que alcanza finalmente el duodeno es pequeña.

Los hongos son capaces de digerir y utilizar celulosa y hemicelulosa y presentan la ventaja, sobre las bacterias celulolíticas, de ser capaces de penetrar las paredes celulares lignificadas permitiendo el posterior acceso de las enzimas bacterianas a dichas estructuras mejorando la digestibilidad de la fibra (Van Soest, 1994).

### **2.2.5. Factores que afectan la población de microorganismos del rumen**

Existen muchos estudios acerca del desarrollo de la mejor población microbiana ruminal y los factores que controlan su balance. Algunos de estos factores están ligados a la fisiología de diferentes especies (máxima velocidad de crecimiento, afinidad por el sustrato, energía metabólica, resistencia a pH ácidos y compuestos tóxicos, habilidad para adherirse a las partículas de la planta, etc). Esto depende del hospedero y su alimento (composición de la dieta, frecuencia de comidas, cantidades ingeridas, aditivos del alimento, forma en la cual el alimento es presentado, etc.) y de la naturaleza de las relaciones establecidas entre las diferentes poblaciones durante la evolución, como la competencia, el sinergismo, la predación, el mutualismo, etc.

Generalmente se acepta que los principales factores que modifican la población de microorganismos del rumen son:

- La dieta y su manipulación
- Cantidad y frecuencia en el suministro de alimentos
- Cambios diurnos y estacionales

- Procesamiento de la dieta
- Competencia entre protozoos y bacterias
- Especie animal
- Edad

Existen otras variables, que pudieran ser factores, las que también influyen en el número y representación de especies microbianas, entre estas tenemos: El consumo y su velocidad, la selectividad al pastar, la fertilidad del suelo, la situación geográfica, el clima. Estos influyen en la cantidad y calidad de nutrimento que se ofrecerán a los microorganismos del rumen.

#### **2.2.6. Importancia de los microorganismos ruminales**

Los microorganismos ruminales constituyen un elemento de vital importancia para el mantenimiento de los animales poligástricos, esto se refleja si se tiene en cuenta que del 55 al 85 % de la energía metabolizable (EM) total derivada del alimento consumido, es absorbida desde la pared ruminal como ácidos grasos volátiles (AGV) obtenidos a partir de la acción microbiana sobre este. La mayoría de las bacterias y de los hongos, pero pocos protozoarios, pueden utilizar amoníaco. En vacas lecheras, la proteína microbiana sintetizada por las bacterias proteolíticas (en especial los géneros *Prevotella*, *Selenomonas* y *Butyrivibrio*) y las bacterias que sintetizan aminoácidos, proporciona casi 60 % de los aminoácidos que llegan al duodeno, lo cual aumenta a 90 % en rumiantes alimentados con dietas bajas en proteína.

La proteína que puede aportar la masa microbiana ruminal representa lo siguiente, respecto al total disponible: 44 % en borregos, 48 % en vacas, 51 % en terneros, 45 % en novillos (alimentados con paja y grano de cebada), 39 % en novillos (alimentados con paja de cebada); además, proporciona todos los

aminoácidos indispensables y 60 a 90 % del requerimiento energético y nitrogenado para los rumiantes. En áreas donde existe escasez de este nutriente, la optimización de proteína microbiana, a través de un uso eficiente de los recursos disponibles localmente, es un alcance sostenido y efectivo hacia la mejora en la producción de los rumiantes, aún en áreas que dispongan de fuentes proteicas, el aumento de la eficiencia biológica de la síntesis de la proteína microbiana es la clave para la mejora del costo de producción y reduce la contaminación con N del ambiente (Orskov, 1997). Autores como Ángeles (2002) plantean que en los rumiantes, la presencia de bacterias, protozoarios y hongos le permite cubrir hasta el 100% de sus requerimientos energéticos a partir de carbohidratos estructurales como celulosa, y hemicelulosa, le permite utilizar fuentes de nitrógeno no proteínico (urea, amoníaco) para cubrir una parte de sus necesidades de proteína y además, lo hace independiente de una suplementación de vitaminas hidrosolubles para cubrir sus requerimientos. Gracias a los microorganismos ruminales cada 15 kg de materia seca consumidos por el animal, 10 kg son degradados y fermentados por lo que pueden ser aprovechados.

### **2.2.7. Modulación de la fermentación ruminal.**

Existen varias alternativas para modular la fermentación ruminal, como la adición de aditivos que estimulen la proliferación de bacterias específicas (aditivos microbianos y los ácidos orgánicos); por otro lado están los que inhiben la proliferación de microorganismos (extractos de plantas y los anticuerpos policlonales)(Calsamiglia, 2005).

### **2.2.8. Alternativas para disminuir la emisión de gases en fermentación ruminal**

Diversos autores señalan que existen diversos factores alternativos la disminución de la metanogénesis, Johnson y Johnson (1995), mencionan que la adición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga disminuye la

metalogénesis porque se convierte en una alternativa metabólica para el hidrogeno, dando como resultado una reducción del número de protozoarios que aparentemente contribuye a una declinación en la población de metanogenas además se supone que la toxicidad de algunos ácidos grasos de cadena larga sobre las bacterias metanogénicas también tienen un gran efecto.

### **2.3. La alimentación de los rumiantes**

La alimentación representa el componente más importante en los costos de producción y es determinante en el comportamiento productivo de los animales. Es esencial considerar los tipos de dietas, calidad y precisión de estas, así como de los ingredientes que las conforman (Sánchez, 2002).

Garré y León (2002), establecen que los animales mal alimentados, retardan el crecimiento y tienen desarrollo incompleto, lo que repercute en los pesos vivos de los mismos sin el aseguramiento de una ración balanceada sería sumamente difícil obtener resultados aceptables en los pesos de los corderos, tanto al nacimiento como al predestete, destete y postdestete.

Los aditivos son usados rutinariamente en la alimentación animal con tres fines fundamentales: mejorar el sabor u otras características de las materias primas, piensos o productos animales, prevenir ciertas enfermedades, y aumentar la eficiencia de producción de los animales.

El rango de aditivos utilizados con estos fines es muy amplio ya que bajo este término se incluyen sustancias tan diversas como algunos suplementos (vitaminas, provitaminas, minerales, etc.), sustancias auxiliares (antioxidantes, emulsionantes, saborizantes, etc.), agentes para prevenir enfermedades (coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas) y agentes promotores del

crecimiento (antibióticos, probióticos, enzimas, etc.). Dentro del grupo de los aditivos antibióticos están aquellos que se utilizan como promotores del crecimiento de los animales, y que también son denominados "modificadores digestivos"

### **2.3.1. Aditivo**

Son todos aquellos ingredientes y compuestos que se adicionan a los alimentos y cuyo uso mejora en alguna forma la apariencia, la vida en bodega, la aceptación, la ingestión, digestión, absorción o metabolismo de los alimentos aunque, en rigor, no sean estrictamente esenciales para la nutrición animal

#### **Tipos de aditivos**

- ◆ Antibióticos
- ◆ Probióticos
- ◆ Sustancias antioxidantes
- ◆ Sustancias aromáticas y saborizantes
- ◆ Coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas
- ◆ Emulsionantes, estabilizantes, espesantes y gelificantes
- ◆ Colorantes incluidos los pigmentos
- ◆ Conservantes
- ◆ Vitaminas, provitaminas y otras sustancias de efecto análogo químicamente bien definidas
- ◆ Oligoelementos
- ◆ Agentes ligantes, antiaglomerantes y coagulantes

- ◆Reguladores de la acidez
- ◆Enzimas
- ◆Microorganismos
- ◆Ligantes de radionucleidos

### **2.3.2. Antibióticos como promotores del crecimiento**

La descripción de las propiedades de los agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento data de finales de los años 40. Este efecto se manifiesta al adicionar a los piensos cantidades subterapéuticas de antibióticos. Sin embargo ante el empleo masivo de antibióticos, es probable que esto genere resistencia a los antibióticos entre bacterias en especial aquellas que pueden ser agentes etiológicos para enfermedades en el hombre, en algunos países se ha prohibido adicionar antibióticos en la alimentación animal como promotores del crecimiento, decisión que ha tenido un fuerte impacto en producción animal y ha determinado la necesidad de iniciar líneas de investigación encaminadas a la búsqueda de alternativas del uso de no antibióticos como promotores del crecimiento.

Los efectos asociados a la inclusión de un aditivo antimicrobiano en un pienso es prevenir problemas digestivos, incrementar el consumo del alimento y por ende mejorar el estado general del animal, factor que repercute económicamente ya que determina una reducción de los costos de producción. El mayor beneficio de utilizar promotores de crecimiento podemos basarlo en que son capaces de controlar a la población microbiana del tracto gastrointestinal, fenómeno que se traduce en una mejora en la absorción de nutrientes y en consecuencia en la disminución de proliferación de microorganismos patógenos.

### **2.3.3. Resistencia bacteriana a los antibióticos**

Frecuentemente, el posible desarrollo de resistencia a las bacterias ha motivado a la prohibición de muchos de los antibióticos promotores de crecimiento en la nutrición animal. En la Unión Europea el uso de avilamicina, flavofosfolipol, monensina, y salinomycin fue permitido hasta enero de 2006; en México aún se usan varios de ellos sin restricción. Por lo tanto, científicos en la producción animal y productores de ganado están investigando nuevos aditivos alimenticios que puedan beneficiar la salud animal y la producción de alimentos (Chen et al., 2008). Una de las alternativas más estudiadas en los últimos años es el uso de extractos de plantas o aceites esenciales (Mellor, 2000).

Los extractos de plantas pueden potencialmente ser usados como aditivos alimenticios, especialmente considerando la enorme biodiversidad que puede ser explotada. Estos extractos son ampliamente usados en la alimentación humana, y en aplicaciones bioquímicas y farmacéuticas. De hecho, existen evidencias de que éstos ofrecen un potencial como promotores de crecimiento en cerdos. Asimismo, la preocupación en relación a la resistencia a los antibióticos en la industria del ganado, ha llevado a minimizar o eliminar el uso de tales compuestos en EUA y Europa (Chen, 2008).

Esto representa considerables oportunidades para el desarrollo de varios tipos de aditivos. Así, el uso de aceites esenciales de plantas como aditivos funcionales para el ganado se percibe con mucho interés. Los componentes de los aceites esenciales con efectividad antibacteriana son, e.g. carvacrol, timol, eugenol, perillaldehído, ácido cinamaldehído y cinámico. Se ha demostrado que estos compuestos presentan propiedades antimicrobiales, antioxidantes y antifúngicas. Se reporta también que mejoran al comportamiento animal debido a su efecto en

la estimulación de la salivación y secreciones de enzimas pancreáticas o por tener un efecto bactericida directo sobre la flora microflora intestinal (Hardy, 2002).

#### **2.3.4. Probióticos**

Su empleo está muy extendido y es favorablemente acogido por su significado positivo en alimentación animal. El concepto de probióticos tiene ya más de un siglo de antigüedad y la introducción del término se atribuye a Fuller (1989), aunque se ha visto sometido a múltiples definiciones, más o menos completas.

Tal vez la definición más adecuada sea la propuesta por Havenaar y Huisin 't Veld (1992), según la cual los probióticos son: 'cultivos simples o mezclados de microorganismos vivos que, aplicados a los animales o al hombre, benefician al hospedador mejorando las propiedades de la microflora intestinal original'. Van Eys y den Hartog (2003) añaden que deben estar en una dosis suficiente para modificar (por implantación o colonización) la microflora de algún compartimiento del digestivo del hospedador.

En la práctica suelen presentarse bajo formas destinadas a ser administradas en el agua o en el pienso. Los microorganismos que constituyen los probióticos son principalmente bacterias capaces de producir ácido láctico, que son las más conocidas, pero también se incluyen bacterias no lácticas, levaduras y hongos. Es importante destacar que ésta es una primera e importante diferencia entre monogástricos y rumiantes, en lo que se refiere a las posibilidades de utilización de los probióticos.



Esto es debido a que los rumiantes son capaces de producir importantes cantidades de lactato y lactobacilos en el retículo-rumen en condiciones naturales de acidez (i.e. raciones con elevado concentrado). Resulta así que uno de los puntos de mayor interés del empleo de probióticos en rumiantes es controlar la acumulación de lactato en el rumen, lo que se intenta conseguir por medio de la estimulación de los microorganismos utilizadores de lactato y estimuladores de la síntesis de propionato. En este papel, pocos probióticos han sido todavía estudiados en el caso específico de los rumiantes. A efectos prácticos los pre-rumiantes deberían considerarse como monogástricos, aunque este concepto debe entenderse como temporal o funcional ocasional.

El objetivo de administrar probióticos es establecer una microbiota intestinal favorable antes de que los microorganismos productores de enfermedades puedan colonizar los intestinos, aunque, en el caso de las bacterias productoras de ácido láctico, éste también inhibe la proliferación de muchas bacterias potencialmente patógenas o no deseables en el intestino. Aunque existe controversia sobre los mecanismos de actuación de muchos de los probióticos, éstos trabajan fundamentalmente por 'competencia de exclusión' e incluyen la:

Competición por los receptores que permiten la adhesión y colonización de la mucosa intestinal.

- ❖ Competición por determinados nutrientes.
- ❖ Producción de sustancias antimicrobianas.
- ❖ Estimulación de la inmunidad de la mucosa y sistémica del hospedador.

## Las levaduras como probiótico en rumiantes

Las levaduras (*Saccharomyces spp.*) son sin duda uno de los probióticos más utilizados en alimentación animal, tanto en monogástricos como en rumiantes. Existe un relativo consenso de que las mejores respuestas en rumiantes se han observado en el caso de vacas lecheras, y los efectos reconocidos en rumiantes se atribuyen al aumento de la celulólisis ruminal y del flujo de proteína microbiana al intestino (Newbold, 2003; Van Vuuren, 2003).

Cuadro 4. Microorganismos usados en alimentación animal como probióticos

MICROORGANISMO	GENERO	ESPECIES	
<b>Bacterias lácticas (Gram+) no esporuladas</b>	lactobacillus	<i>L. acidophilus (Figura 1)</i> <i>L. casei</i> <i>L. GG</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. plantarum</i>	
	Bifido-bacteruim	<i>B. bifidum</i> <i>B. brevi</i> <i>B. longum</i> <i>B. termophilus</i> <i>B. animalis</i>	
	Streptococcus	<i>S. termophilus</i> <i>S. lactis</i> <i>S. leuconostoc</i>	
	Enterococcus	<i>E. faecali</i> <i>E. faecium</i>	
	Lactococcus	<i>L. lactis</i>	
	Pedicoccus	<i>P. acidilactici</i>	
	Leuconostoc	<i>L. mesenteroides</i>	
	<b>Bacterias lácticas (Gram +) esporuladas</b>	sporolactobacillus	<i>S. inilinus</i>
		Streptococcus	<i>S. termophilus</i> <i>S. lactis</i> <i>S. leuconostoc</i>

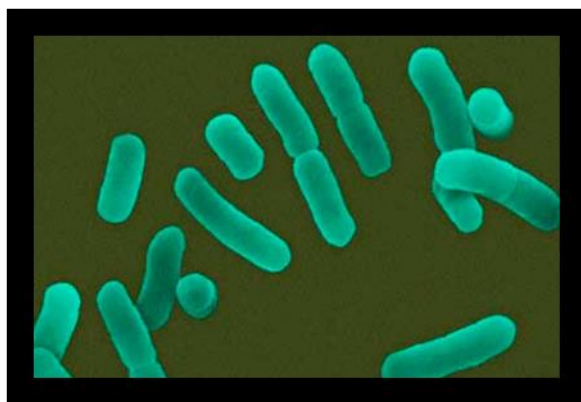


Figura 1. *L. acidophilus* (Kunkel, 2001)

### **2.3.5. Enzimas exógenas**

Las enzimas exógenas representan una alternativa para incrementar la productividad y reducir los costos en la alimentación de los rumiantes (Mendoza, 1995; Bart y Oliver, 2001). Las enzimas exógenas, mejoran la digestibilidad del almidón o favorecen la degradación de los carbohidratos estructurales de la pared celular, ya que su uso ha reportado incrementos en la digestibilidad de la fibra (ensilados y alfalfa) (Lewis et al., 1999; Yang et al., 1999). Pero existen pocas investigaciones empleando esquilmos agrícolas, para eficientar la digestión y utilización de los nutrimentos de estos alimentos (Tirado et al., 2001; Carreón, 2003). Por lo tanto el objetivo de esta investigación fue evaluar la adición de dos complejos enzimáticos exógenos fibrolíticos en el comportamiento productivo de ovinos pelibuey en un sistema de alimentación intensiva y determinar la rentabilidad económica del sistema.

Cuadro 5. Efectos de la suplementación con enzimas en ganado vacuno de engorde a base de forraje (Beauchemin et al., 1995)

	Dosis de enzima					
	Control	1×	2×	4×	8×	16×
<b>Heno de alfalfa:</b>						
ADP, kg/d	1.03 <sup>a</sup>	1.27 <sup>bc</sup>	1.28 <sup>bc</sup>	1.34 <sup>c</sup>	1.19 <sup>abc</sup>	1.12 <sup>ab</sup>
MSI, kg/d	10.2 <sup>a</sup>	10.8 <sup>a</sup>	10.5 <sup>a</sup>	11.7 <sup>b</sup>	10.9 <sup>a</sup>	10.3 <sup>a</sup>
IC, kg MS/kg	9.9	9.0	8.7	8.5	9.6	9.5
<b>Heno de fleo:</b>						
ADP, kg/d	1.21 <sup>a</sup>	1.32 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a</sup>	1.24 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.64 <sup>b</sup>
MSI, kg/d	8.8 <sup>bc</sup>	8.3 <sup>ab</sup>	7.5 <sup>a</sup>	9.2 <sup>bc</sup>	8.6 <sup>bc</sup>	9.3 <sup>c</sup>
IC, kg MS/kg	7.3 <sup>b</sup>	6.5 <sup>ab</sup>	7.5 <sup>b</sup>	6.3 <sup>ab</sup>	6.8 <sup>ab</sup>	5.9 <sup>a</sup>
<b>Ensilado de cebada:</b>						
ADP, kg/d	1.12	1.15	0.99	1.02	1.12	1.11
MSI, kg/d	7.5 <sup>ab</sup>	8.1 <sup>b</sup>	6.8 <sup>a</sup>	7.8 <sup>b</sup>	7.3 <sup>ab</sup>	7.3 <sup>ab</sup>
IC, kg MS/kg	7.1	7.0	7.2	7.6	6.9	7.0

### 2.3.6. Extractos de vegetales

La utilización de plantas y de hierbas medicinales, o de alguno de sus componentes, se plantea actualmente como una de las alternativas más naturales a los APC. Algunas plantas (anís, tomillo, apio, pimienta, etc.) contienen aceites esenciales que les confieren propiedades aromáticas. Tal y como se ha observado en diferentes experimentos, la utilización de estos aceites puede producir aumentos de la ganancia diaria de peso similares a los registrados con APC en cerdos y pollos (Piva and Rossi, 1999). Otras plantas, como los cítricos (naranja, pomelo, mandarina, etc.) contienen bioflavonoides que también pueden producir efectos positivos sobre los rendimientos productivos de los animales. Los mecanismos de acción de estas sustancias, y de otras extraídas de diferentes plantas, no se conocen totalmente, y varían según la sustancia de que se trate, pero algunos de los mecanismos propuestos son: disminuyen la oxidación de los

aminoácidos, ejercen una acción antimicrobiana sobre algunos microorganismos intestinales y favorecen la absorción intestinal, estimulan la secreción de enzimas digestivos, aumentan la palatabilidad de los alimentos y estimulan su ingestión, y mejoran el estado inmunológico del animal. En el caso de los animales rumiantes se han realizado menos experiencias, pero existen ya productos comerciales a base de extractos de *Yucca shidigera*.

La utilización de estos extractos (ricos en saponinas) provoca en el rumen un descenso de las bacterias Gram+ y de los protozoos, lo que se traduce en una reducción de los niveles de amoníaco en el rumen, aumenta la producción de ácidos grasos volátiles y puede incluso incrementar la síntesis microbiana. En los animales no rumiantes estos extractos han demostrado también su actividad, ejerciendo su efecto antiprotozoario y mejorando el estado inmunológico de los animales.

Los extractos de plantas forman parte de lo que se denomina "zona gris" en los aditivos, un grupo de sustancias "toleradas" pero no admitidos como aditivos de manera estrictamente legal. Los extractos vegetales entrarían dentro del grupo de aditivos clasificado como "sustancias aromáticas y saborizantes", en el que se incluyen "todos los productos naturales y los productos sintéticos correspondientes", y que pueden utilizarse en todas las especies animales, sin restricción alguna en su edad o en la dosis de producto. Dada que estos productos son muy bien aceptados por el consumidor, son una de las alternativas a los APC con más futuro, y la búsqueda de nuevas sustancias representa una importante área de investigación en el campo de los aditivos alimentarios. Sin embargo, también presentan algunos inconvenientes, ya que la obtención de extractos vegetales es en muchos casos complicada y costosa, las dosis efectivas de los mismos pueden ser elevadas, y en muchos casos se trata de compuestos volátiles. Además, es necesario conocer la procedencia de estos productos para

que su utilización sea realmente segura, lo que actualmente no resulta fácil. De esta manera se pueden utilizar las hojas del sauce lloron para elaborar extracto para utilizarlo como aditivo en la alimentación de los animales.

### **2.3.6.1 Sauce llorón**

Nombre Común: Sauce Lloron,. Nombre Científico: *Salix babylonica* L., Familia: Salicaceae, Clase: Magnoliopsida

#### **Descripción**

Es un árbol caducifolio de 8 a 12 m de altura (excepcionalmente 26 m), con ramas delgadas, flexibles, largas, colgantes casi hasta el suelo (Figura 2). Su tronco tiene la corteza fisurada. Hojas linearlanceoladas, de 8 a 15 cm de longitud., acuminadas, borde finamente aserrado, Pecíolo corto, pubescente. Las inflorescencias brotan junto con las hojas, tiene amentos cilíndricos de 2 a 5 cm de longitud., con flores de color amarillo pálido. Florece en primavera.



Figura 2. Árbol de Sauce llorón  
(*Salix babylonica*)

## **2.4. Proteína microbiana ruminal**

Con respecto a la nutrición proteica de los rumiantes, uno de los principales objetivos es proporcionar cantidades y tipos adecuados de proteína, para así obtener el máximo rendimiento. Los rumiantes tienen la ventaja de no requerir proteína de calidad específica, ya que los microorganismos del rumen digieren las proteínas del alimento y sustancias simples como urea y otras fuentes de nitrógeno no proteico (NNP), convirtiéndolos en proteína bacteriana de excelente calidad (AFRC, 1996).

De esta manera, la proteína que escapa de la degradación ruminal es más costosa (económicamente hablando) que la proteína microbiana, por lo que la eficiencia en la producción de esta tiene un fuerte impacto en la producción animal. A esto se le ha dado un enfoque nutricional y económico, explotando fuentes de NNP de bajo costo, permitiendo que los microorganismos sinteticen proteína de alta calidad, las cuales satisfacen los requerimientos de aminoácidos del animal (Herdt, 2003).

### **2.4.1. Digestión de la proteína en los rumiantes**

Las bacterias ruminales son las responsables de la degradación de la proteína aunque también pueden intervenir los protozoarios (Orskov, 1982) y los hongos anaerobios del rumen (Wallace y Cotta, 1988) cuya ausencia causa una disminución significativa de la proteólisis (Broderick et al., 1991)

### **2.4.2. Síntesis de proteína microbiana.**

La replicación y actividad metabólica de los microorganismos ruminales dan origen a la proteína microbiana; que tiene un importante papel en la nutrición de los rumiantes, debido a que su composición aminoacídica es similar a la proteína de los principales productos animales (Orskov, 1988). La proteína total digestible (aminoácidos) se define como proteína metabolizable y está compuesta por

proteína microbiana digestible y proteína dietaria no degradable a nivel (AFRC, 1996).

Durante su paso por el rumen, gran parte de las proteínas son degradadas hasta aminoácidos, los cuales darán origen finalmente a los ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono y amoníaco (Herdt, 2003). El amoníaco es utilizado por los microorganismos ruminales, si existe suficiente energía, para la síntesis de proteína microbiana (Orskov, 1988). En circunstancias normales al menos el 70% de las proteínas de origen microbiano son sintetizadas a partir de amoníaco (AFRC, 1996).

Parte del amoníaco no puede ser fijado por los microorganismos del rumen, por lo que se absorbe y es llevado por la sangre hasta el hígado, donde se transforma a urea. La mayor parte de la urea es excretada a través de la orina, con un consiguiente gasto energético para el animal, otra parte vuelve al rumen y el restante es excretado en la leche (Orskov, 1988)

Se ha señalado que el 66 a 75% de los aminoácidos absorbidos por el rumiante derivan de la proteína microbiana, por lo que ésta es considerada la fuente proteica primaria para los rumiantes (Dewhurst et al., 2000; NRC, 2001). Balcells et al., (1992) indican que el 59% de la proteína que llega al intestino delgado correspondería a origen microbiano. De esta proteína microbiana, el 25% corresponde a ácidos nucleicos (adenina y guanina), los cuales no pueden ser utilizados por el rumiante para la síntesis de tejidos, leche, etc. (Smith y Mc Allan, 1970), por lo que son transformados por el hígado en derivados puricos (alantoina, ácido úrico, xantina, hipoxantina), para posteriormente ser eliminados a través de la orina (Tamminga y Chen 2000), saliva y en leche (González Ronquillo et al. 2003). Por lo tanto, el 75% de la proteína microbiana corresponde a proteína microbiana verdadera, como proteínas, péptidos y aminoácidos libres, de los cuales el 85% es digestible a nivel intestinal. De esta

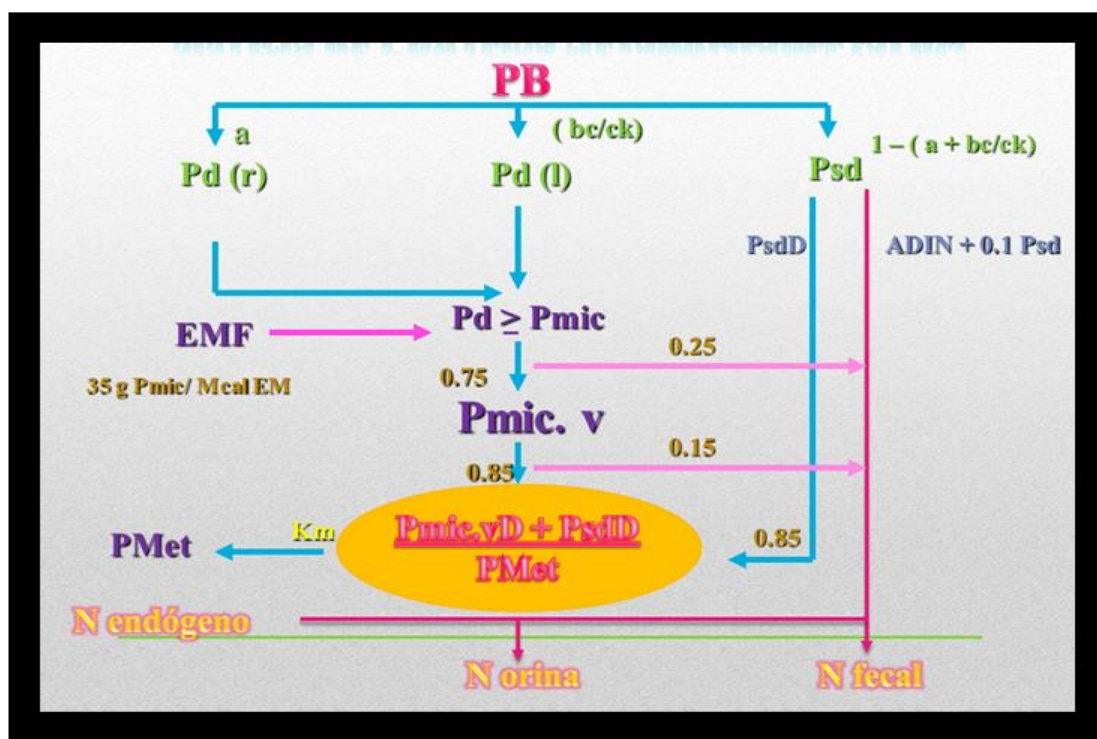


forma, el 64% de la proteína microbiana corresponde a proteína microbiana digestible (AFRC. 1996)

Las bacterias ruminales son las responsables de la degradación de la proteína, aunque también pueden intervenir los protozoarios (Orskov, 1982) y los hongos anaerobios del rumen (Wallace y Cotta, 1991), cuya ausencia provoca una disminución significativa de la proteólisis (Broderick et al., 1991)

Los rumiantes se caracterizan por tener el rumen- retículo, el cual contiene una gran cantidad de población microbiana, capaz de fermentar los carbohidratos y las proteínas de origen alimenticio, la energía liberada de estas reacciones de fermentación es utilizada por las bacterias del rumen para su crecimiento y reproducción, estimándose que en promedio se producen 35g de proteína microbiana por Mcal de EM (ARC, 1984) (Figura 3.). Estas bacterias una vez digeridas al pasar por el abomaso pueden llegar a constituir entre el 60 y 80% de la proteína que llegue al duodeno.

Figura 3. Sistema de proteína metabolizable (AFRC, 1993)



$Pd(r)$  proteína rápidamente degradable en rumen,  $Pd(l)$  proteína parcialmente degradable en el rumen.  $Pmic$  proteína microbiana,  $Pmic.v$  proteína microbiana verdadera,  $Pmic.vD$ , proteína microbiana verdadera digestible en intestino delgado,  $Psd$  proteína sin degradable en el rumen,  $PsdD$  proteína sin degradar digestible en intestino delgado,  $ADIN$  nitrógeno insoluble en detergente ácido,  $EMF$  energía metabolizable fermentable,  $Pmet$  proteína metabolizable.

### 2.4.3. Factores que influyen en la síntesis de proteína microbiana.

El importante papel que juegan los microorganismos ruminales en la producción de proteína microbiana, hace que las raciones de los rumiantes deban ser formuladas para permitir el máximo crecimiento microbiano (Carro, 2001), con lo cual se lograría aumentar la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana (AFRC, 1996), para que este crecimiento y producción sean adecuados, se necesita de energía y de nitrógeno (Herdt, 2003). Ambos factores son los que mayormente influyen en la síntesis proteica a nivel ruminal y su grado de

sincronización influye en la utilización de la proteína degradable en el rumen y en el aumento de la producción animal (Kolver y Muller, 1998).

El suministro de nitrógeno y energía a los microorganismos ruminales a través de la suplementación con concentrado, ha sido sugerido como un medio para mejorar la sincronía ruminal (Kolver y Muller, 1998), traduciendo en un mejoramiento en la síntesis de proteína microbiana del rumen. Como señala Berndt (2005), un concentrado rico en fibra digestible fermenta más lento en el rumen, sincronizando mejor las necesidades de los microorganismos ruminales de vacas en pastoreo. Por otro lado, el uso de concentrados amiláceos por su rápida fermentación en el rumen, promueven un incremento en la acidez con disminución del pH ruminal, alterando la ecología microbiana y el consumo de materia seca (Sniffen y Robinson, 1987). Este proceso llevaría a altas tasas de sustitución de forraje por concentrado, esperándose un efecto negativo en el funcionamiento ruminal (Berndt, 2005). Sin embargo, Rearte (1997), señala que el suplemento cualquiera que fuese, sólo modificaría el ambiente ruminal, cuando tenga un efecto mayoritario y significativo en el consumo de materia seca, siendo de al menos un 40 % del total de ración.

#### **2.4.4. Derivados púricos (DP)**

En la década de los sesenta diversos autores observaron que la síntesis de proteína microbiana en el rumen estaba relacionada con el flujo total de polinucleótidos en el duodeno (Ellis y Pfander, 1965) y con la excreción urinaria de DP (Topps y Elliot, 1965). Tanto las purinas como los ácidos nucleicos por ser constituyentes de los microorganismos, se clasifican como marcadores microbianos internos (Santos et al., 2001).

Las bases púricas provenientes de los ácidos nucleicos de origen microbiano, al ser metabolizadas constituyen la principal fuente de DP urinarios (origen exógeno) y sólo una pequeña fracción proviene de los ácidos nucleicos de

los tejidos (origen endógeno) (Tamminga y Chen, 2000; Gonzalez Ronquillo et al., 2003). Su excreción diaria está relacionada directamente con la cantidad de purinas absorbidas al día (Chen et al., 1990; Verbic et al., 1990). Es por esto que la excreción de DP provee una medida de la cantidad de ácidos nucleicos microbianos absorbidos por el duodeno y por lo tanto de la síntesis de proteína microbiana en los rumiantes (Chen et al., 1991).

### **Origen y destino.**

Los DP se originan de tres fuentes posibles: bases púricas de microorganismos ruminales, purinas dietéticas y purinas de origen endógeno, esta última como resultante del recambio tisular de los animales, por lo que sólo representan una pequeña fracción de los DP (Tamminga y Chen, 2000) siendo su excreción diaria, de 530  $\mu\text{mol/kg PV}^{0.75}$  en bovinos (Chen y Gomes, 1992). El valor de excreción no es constante entre especies, así como dentro de las mismas existe una variación correspondiente a la etapa fisiológica del animal (Chen et al., 1990; Orellana et al., 2001), aunque según Chen et al. (1992), la excreción endógena de derivados puricos está relacionada proporcionalmente con el peso metabólico del animal.

En rumiantes el producto final del catabolismo de las purinas son la alantoína (A), ácido úrico (AU), hipoxantina (HX) y xantina (X) como se mencionó anteriormente, y se les conoce como derivados puricos (DP) (Fujihara et al., 1987). Sin embargo en la orina de los bovinos, solamente se ha encontrado alantoína y ácido úrico, debido a que poseen una alta actividad de la enzima xantina oxidasa en la sangre y tejidos, convirtiendo la xantina y la hipoxantina en ácido úrico previa a la excreción por la orina (Valadares et al., 1999). Consecuentemente, la alantoína es la más importante en los bovinos (Bargo et al., 2002), encontrándose entre un rango de 89 a 97% en vacas (Giesecke et al., 1994; Gonda et al., 1996; Vagnoni et al., 1997).

#### **2.4.5. Estimación de la síntesis de proteína microbiana a partir de la excreción urinaria diaria de Derivados puricos.**

Para maximizar la eficiencia de utilización de las proteínas, es necesario cuantificar la síntesis de este nutriente por parte de los microorganismos ruminales. La falta de métodos simples y precisos es uno de los problemas más importantes para obtener información fiable (Chen y Gomes 1992; Carro 2001). Existen métodos que utilizan cánulas intraruminales y animales fistulados, que normalmente son costosos, tediosos y poco concordantes con la preocupación actual por el bienestar animal (Tamminga y Chen, 2000).

Actualmente se ha desarrollado el método de la cuantificación diaria de la excreción urinaria de los DP como una alternativa de gran precisión y utilidad, éticamente adecuada y concordante con los derechos de los animales, esta cuantificación permite calcular por fórmulas la cantidad de ácidos nucleicos microbianos metabolizados por el animal (Tamminga y Chen 2000). Esta metodología ha sido estudiada y recomendada por Verbic et al. (1990) y Faichney et al. (1995), los cuales han utilizado un alto nivel de confiabilidad, realizando la metodología ya sea en la colección total de orina o a través de la toma de muestras puntuales.

Para lograr obtener la totalidad de los DP excretados diariamente, se requiere la recolección total diaria de orina, pero para hacerlo aplicable a condiciones de animales en producción y pastoreo es necesario simplificarlo hasta obtener muestras puntuales de orina. Esto es posible ya que la producción de DP es constante durante el día (Chen et al., 1992) y la dilución de la orina se puede corregir mediante la concentración de la muestra urinaria con un marcador interno o externo (Orellana et al., 1998).

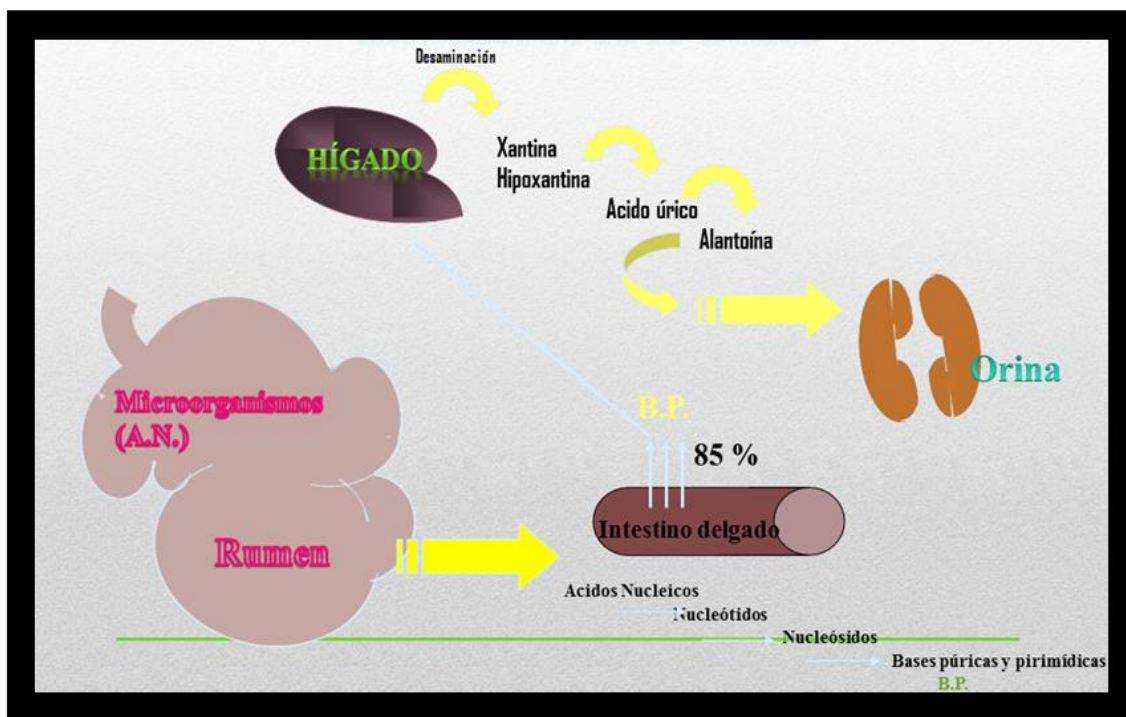
Según Chen y Orskov (2004), el uso de la relación entre los derivados de purina y la creatinina, es una alternativa a la colecta total de orina. La propuesta se

basa en el supuesto teórico de que la creatinina puede ser utilizada como marcador interno para la estimación del volumen total de orina por día (Gonda et al., 1995), ya que es excretada por la orina en forma constante, presenta una variación mínima y es independiente, tanto del consumo de alimento como de la producción (Orellana et al., 1998). Sin embargo, la creatinina es dependiente del peso del animal por lo que su valor debe ser corregido por el peso metabólico ( $\text{Creatinina} \cdot \text{PV}^{0,75}$ ) (Chen y Orskov, 2004).

Al utilizar muestras puntuales de orina se disminuye la sensibilidad de los resultados, no obstante, permite destacar diferencias entre distintos manejos de alimentación, por lo cual los resultados no se deben tomar como valores absolutos, sino como valores comparativos (Tamminga y Chen 2000).

La utilización de la excreción de DP para estimar la síntesis microbiana de proteína presenta varias ventajas, entre ellas, su rapidez, facilidad y el hecho de reflejar cambios en la eficiencia de digestión y absorción de los microorganismos (Carro 2001), pero la ventaja principal es que se trata de una técnica no invasiva, de esta manera se descartan los posibles trastornos en el comportamiento alimentario de los animales o en su motilidad digestiva, producidos por la implantación de cánulas (Calsamiglia et al., 1996).

Figura 4. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen.



### **III. JUSTIFICACION**

El uso de enzimas como aditivos en dietas para rumiantes ha tenido interés en los últimos años. Las enzimas exógenas se han utilizado ampliamente para eliminar los factores anti-nutricionales de los alimentos, para aumentar la digestibilidad de los nutrientes existentes, y para complementar la actividad de las enzimas endógenas.

Los extractos de plantas pueden potencialmente ser usados como aditivos alimenticios, especialmente considerando la enorme biodiversidad que puede ser explotada. Estos extractos son ampliamente usados en la alimentación humana, y en aplicaciones bioquímicas y farmacéuticas. De hecho, existen evidencias de que ofrecen un potencial como promotores de crecimiento en cerdos. Asimismo, la preocupación en relación a la resistencia a los antibióticos en la industria del ganado, ha llevado a minimizar o eliminar el uso de tales compuestos en Europa. Por lo tanto, los científicos en ciencia animal y productores están investigando nuevos aditivos alimenticios que puedan beneficiar la salud animal y la producción animal (Chen, 2008).



#### **IV. HIPOTESIS**

El consumo de alimento, la ganancia de peso, conversión y la síntesis de proteína microbiana en el rumen presentan un comportamiento diferente entre los tratamientos de los extractos forrajeros de *Salix babylonica*, enzimas exógenas y su combinación.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. General**

Analizar el impacto de extracto de *Salix babylonica* y enzimas exógenas sobre la respuesta productiva, digestibilidad y la síntesis de proteína microbiana en corderos.

#### **5.1.1. Específicos**

- Determinar la composición química de la dieta
- Determinar el consumo voluntario (Kg MS/día) en ovinos
- Determinar la digestibilidad de las dietas (Kg MS/día) en ovinos
- Estimar la síntesis de proteína microbiana a partir de la excreción de derivados puricos en orina en ovinos

## VI. MATERIALES Y METODOS

### Generalidades del área de estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en el Cerrillo Piedras Blancas en Toluca, localizada a 19° 24" latitud norte y 99° 41" latitud oeste en relación con el meridiano de Greenwich, a una altura de 2640.5 m, de clima templado con lluvias en verano, temperaturas media anual de 12 a 14 °C y una precipitación media anual de 1000 a 1200 mm<sup>3</sup> (INEGI, 2010)

El procesamiento y respectivo análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Bromatología del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM.



## 6.1. Animales y dietas

Se utilizaron 16 borregos raza Suffolk, cuyo peso promedio es de  $28 \pm 0.8$  kg PV. la dieta estuvo compuesta a base de concentrado (purina), ensilado de maíz, extracto de *Salix babylonica* y enzimas exógenas. En el estudio se evaluaron cuatro tratamientos en un periodo de 80 días de los cuales los 10 días se utilizaron para la adaptación de los animales, 60 días para evaluar el comportamiento productivo y 7 días posteriores para el estudio metabólico de los animales.

TRATAMIENTO	CONTENIDO
<b>C: TESTIGO</b>	Concentrado 30% + ensilado 70%
<b>S: EXTRACTO</b>	Concentrado 30% + Ensilado 70% + Extracto de <i>Salix babylonica</i> (30ml/animal/día)
<b>E: ENZIMAS</b>	Concentrado 30% + Ensilado 70% + Enzimas Exógenas (10g/animal/día)
<b>SE: EXTRACTO</b>  +  <b>ENZIMAS</b>	Concentrado 30% + Ensilado 70% + Extracto de <i>Salix babylonica</i> (30ml/animal/día) + Enzimas Exógenas (10g/animal/día)

Una vez al día se les administro extracto vía oral antes del alimento y las enzimas se ofrecieron en 100 g de concentrado antes del alimento. Los animales fueron alimentados dos veces al día a las 8:00 y 15:00 h.

## 6.2. Elaboración del Extracto



(Salem et al., 2006)

### **6.3. Manejo de los animales**

16 ovinos con un peso promedio 25-30 kg PV, se agruparon en 4 tratamientos quedando 4 corderos en cada tratamiento. El experimento consto de 80 días de los cuales 10 días fueron para adaptar a los animales a la dieta, 60 días permanecieron en corrales individuales de 1.5 x1.5 m, provistos de agua y alimento *ad libitum*, en esta etapa se pesó el alimento y el agua diariamente y el peso de los animales al inicio y cada 15 días para evaluar el comportamiento productivo; posteriormente se colocaron en jaulas metabólicas individuales, durante este periodo se colectaron muestras de heces, orina, alimento diariamente.

#### **6.3.3. Colección de datos y muestras**

Al inicio del periodo experimental se tomó una muestra representativa del concentrado y ensilado de la dieta que se les ofrecio a los animales, para su posterior análisis. Se pesaron los animales al inicio del experimento y cada 15 días durante 60 días. Durante la fase experimental se pesó el alimento ofrecido y el rechazado al igual que el agua consumida y rechazada de manera individual.

Una muestra de alimento y forraje fue colectada y depositada en bolsas de papel para determinar su composición química, se registró la cantidad del alimento ofrecido y rechazado y se colecto una muestra de heces, 10% de la cantidad de heces que excreto cada borrego, esta muestra fue conservada en congelación hasta su posterior análisis.

Se colectó una muestra de orina diariamente (10%) adicionando 50ml de ácido sulfúrico al 10%, con el objetivo de mantener un valor de pH < 3 y evitar la degradación microbiana de sus derivados puricos. Se registró el volumen de la

orina producida. Posteriormente se congelaron para su análisis de derivados puricos.

Se tomó una muestra de líquido ruminal por sonda esofágica a cada uno de los animales al final del experimento, a las 0,4, 8 y 12 h post ingestión, se midió pH.

### **6.5. Análisis de laboratorio**

Las muestras de alimento, forraje y heces fueron pesadas, se secaron en una estufa de aire forzado (60 ° C, 48 h), luego fueron molidas (molino Wiley, 3 mm) para determinar la materia seca (MS), materia orgánica (MO), extracto etéreo (EE) y nitrógeno (N) multiplicado por 6,25 para obtener el contenido de proteína cruda (PC) (AOAC, 1990) y el fraccionamiento de Fibra Neutro Detergente (FDN), Fibra Ácido Detergente (FDA) y lignina según Van Soest et al (1992).

Se realizó el análisis convencional de heces y alimento según AOAC (1990) para MS (#934.01) ceniza, (#942.05), N (#954.01) y Extrato etereo (#920.39). La fibra detergente neutra (FDN, Van Soest et al., 1991), fibra ácido detergente (FDA) y lignina se analizaron utilizando un ANKOM200 (ANKOM Technology Corporation, Macedonia, NY, USA). FDN se utilizó con alfa amilasa. Las muestras de orina fueron sometidas a la determinación de N (nitrógeno) (AOAC, 1990) y otra parte para determinar los derivados puricos (PD) y creatinina según el método descrito por Balcells et al. (1992).

En el líquido ruminal se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal. Los AGV's se determinaron mediante la técnica de Jouany (1882) para lo cual se colectaron 4 ml de líquido ruminal previamente filtrado y se mezclan con 1 ml de solución desproteinizante compuesta por cloruro de mercurio (2ml/ml), ácido fosfórico (2% v/v) y 4 metil valerico como estándar interno (2mg/ml), las muestras se agitaron y centrifugaron

a 3000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se almacena en un tubo con tapón a 20°C para su posterior análisis. Para Nitrógeno Amoniacal se usó el método propuesto por Charney Marbach (1962). El líquido ruminal se filtró a través de 4 capas de gasa y se mezcló en partes iguales con una solución de ácido clorhídrico al 10% se añadieron 3ml posteriormente se colocaron 3ml de líquido ruminal y posteriormente en un tubo con tapa se centrifugaron a 25 000 rpm durante 10 min

### **6.6. Cálculos y análisis estadístico**

El nitrógeno microbiano (MN) y proteína metabolizable (MP) se determinaron usando las siguientes ecuaciones:

Nitrógeno microbiano =  $(PD/0.52)/(0.92 \times 1.97) = X$  donde mmol/día (Belenguer et al. 2002), donde

PD: derivados puricos (mmol/d)

Proteína Metabolizable (g N/día) =  $MN \times 0.75 \times 0.85$  (AFRC, 1993), donde

MN: Nitrógeno Microbiano (g/d)

Los datos se analizaron con el procedimiento SAS (2002) en el cual se utilizó un diseño completamente al azar con el modelo estadístico  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$

Donde

Ti: Son los tratamientos

Eij: Es el error experimental

Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) (Steel et al., 1980).



## VII. RESULTADOS

### CARTA DE ENVIO DE ARTICULO

On Wednesday, 8 January 2014, 7:37, ANIFEE <[anifee@elsevier.com](mailto:anifee@elsevier.com)> wrote: Ms.  
No. ANIFEE-14-5388

Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance for lambs fed corn silage

Dear Dr. Salem,

Your manuscript has been assigned the following reference number: ANIFEE-14-5388. You will be able to check the progress of your paper by logging in as Author at <http://ees.elsevier.com/anifee/>. Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Thank you for submitting your manuscript to Animal Feed Science and Technology.

Kind regards,

Editorial Office

Animal Feed Science and Technology

**Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on  
digestibility, microbial protein synthesis and performance for lambs fed corn silage**

K.I. Valdes-Medina<sup>a</sup>, A.Z.M. Salem<sup>a\*</sup>, Z.L. Tan<sup>b</sup>, R. Rojo<sup>c</sup>, M. González-Ronquillo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado  
de México, México*

<sup>b</sup>*Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of  
Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, P. R. China*

<sup>c</sup>*Centro Universitario Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México.  
Instituto Literario 100 Ote. Toluca. Estado de México. 50000. México*

\*Corresponding author: *Tel.* 00521-722-296-55-42 *Fax:* 00521-722-180-61-94

*E-mail address:* asalem70@yahoo.com (A.Z.M. Salem)

## **Abstract**

Sixteen Suffolk lambs with  $28.5 \pm 2$  kg BW were housed in individual cages for 60 days and allotted to four treatments in a completely randomized design to determine the effect of administration of *Salix babylonica* (SB) extract and/or exogenous enzymes of ZADO<sup>®</sup> on lambs performance. Lambs were feed with 30% concentrate (16% CP, 3.2 Mcal ME/kg DM) and 70 % corn silage (8 %CP, 2.8 Mcal ME/kg DM) as a basal diet (control). SB extract was administered at 30 mL/d (SB), exogenous enzymes ZADO<sup>®</sup> direct fed at 10 g/d (EZ), while, the last treatment contained exogenous enzymes ZADO<sup>®</sup> at 10 g/h/d + SB extract at 30 mL/d (EZSB). Lambs of the treatment EZSB had the highest average daily gain (ADG) and feed conversion through the period of the experiment. However, during the first 30 d SB was more effective for ADG ( $P<0.05$ ) than EZ and *vice versa* during the last 30 d of the experiment. Water consumption was higher for SB, followed by EZ and EZSB compared to control. Intake of DM and OM intakes were increased ( $P<0.01$ ) in EZSB followed by EZ treatment which had highest NDF, ADF ( $P<0.001$ ), and N ( $P=0.002$ ) intakes. The treatment of EZSB had the highest ( $P<0.0001$ ) nutrient digestibility compared to the other treatments. Combination of EZ and SB had the best ( $P=0.001$ ) N balance. Allantoin, total purine derivatives (PD), allantoin/creatinine ratio, and PD/creatinine were increased ( $P<0.05$ ) in EZSB compared to the other treatments. However, EZ supplementation increased ( $P=0.001$ ) uric acid concentration, whereas the microbial nitrogen (g N/d;  $P=0.001$ ) and metabolizable protein (g N/d;  $P=0.005$ ) were increased in EZSB versus the other treatments. It could be concluded that addition of 10 g of exogenous enzymes ZADO<sup>®</sup> in combination with *Salix babylonica* extract in the diet of lambs

increased feed intake, nutrient digestibility, and daily gain with a positive impact on the use of N and microbial protein synthesis.

*Keywords:* Exogenous enzymes, Lambs, microbial protein, Digestibility, Plant extract.

*Abbreviations:* ADF, acid detergent fiber; ADG, average daily gain; C, creatinine; CP, crude protein; DM, dry matter; EZ, exogenous enzymes; EZSB, exogenous Enzyme + *Salix babylonica* extract; EE, ether extract; FC, feed conversion; h, hour; LW, live weight; mL, milliliter; mm, millimeters; N, nitrogen; NDF, neutral detergent fiber; OM, organic matter; PD, purine derivatives; pH, potential of hydrogen; SB, *Salix babylonica* extract.

## **1. Introduction**

Recently, nutritionists have to search for natural strategies of low cost and easy application in order to improve animal performance (Durmic and Blache, 2012). Antibiotic and ionophores have very successful results for reducing energy and protein losses in the rumen (McGuffey et al., 2001). However, the use of antibiotics in animal feeds is facing reduced social acceptance due to the potential of appearance of residues in animal products (Russell and Houlihan, 2003). In addition, their use has been banned in the European Union since 2006 (Official Journal of the European Union, 2003). For these reasons, there is an interest in the using of medical plants and plant extracts as alternatives based on their potent properties and complex bioactivity (Durmic and Blache, 2012). In Mexico, there are rich native trees that can be an alternative when forages are scarce and of poor quality in the dry season (Palma et al., 1995). The use of plants or its extracts as a feed additives is restricted by its secondary compounds content as there are inverse relationship between secondary compounds concentration and animal performance (Vasta and Luciano, 2011;

Salem et al., 2011; 2013a). The ideal concentrations can modify and support the utilization of nutrients in the rumen (Salem et al., 2014).

It has been observed that plant extracts containing secondary metabolites have the ability to change the activity of the rumen microbial fermentation, such as stimulating digestion, antimicrobial, antioxidant, appetite stimulant, anti-inflammatory, antiseptic, antiprotozoal, ruminal NH<sub>3</sub>-N sensor (Kamel, 2001; Wallace et al., 2002; Mejía-Hernández et al., 2014). This activity is due to the action of secondary metabolites such as tannins, saponins and essential oils. Moreover, it is known that microbial protein is an important part in the N flow of post-digestive tracts in ruminants, so that the excretion of purine derivatives and flow into the duodenum of purine bases have been used as a parameter to estimate the microbial protein flow in ruminants (Balcells et al., 1992).

The use of exogenous enzymes in the animal feed as a feed additive improves the nutritional value of the foliage of trees due to the occurrence of solubilization in the dietary fiber. Morgavi et al. (2000) showed that the use of exogenous enzymes has the potential to improve the quality of fodder trees used as natural additives for ruminant feeding. Exogenous enzymes can stimulate increasing the total number of viable bacteria, increasing fiber digestion and improving the ability of rumen bacteria to ingest and degrade feed and secondary metabolites. It also could increase the amount of crude protein available for microbial metabolism of the animals which may increase fiber digestibility and the metabolizable energy density of the diet (Salem et al. 2012). The exogenous fibrolytic enzymes can work synergistically with exogenous rumen microbial enzymes and thus could increase the digestion and nutritive value of fibrous diet (Morgavi et al., 2001).

An assumption was developed for the synergetic effects resulted from the combination between SB extract and direct fed enzyme on animal performance. Optimal doses from plant extract (i.e., optimum doses of secondary metabolic compounds) with optimum doses from enzyme may have cumulative effects on animal performance. Rivero et al., (2012, 2013) tested the effect of administrating 30 mL of SB extract in a combination with 10 g of ZADO<sup>®</sup> on performance of Suffolk lambs. Their results indicated that EZ and SB as a single or combined feed additives promoted growth performance without altering animal health or affecting cellular immune response or blood chemistry.

Therefore, the aim of this study was to determine the effects of administering SB extract or/and exogenous enzymes on performance of lambs fed corn silage and concentrate as basal diet.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals and treatments*

Sixteen Suffolk male lambs ( $28.5 \pm 2$  kg BW) were divided into 4 treatments to be fed control (30% concentrate + 70% silage), SB (30 mL extract/animal/d), EZ (10g ZADO<sup>®</sup>/animal/d), and their mixture EZSB (10 g ZADO<sup>®</sup>+30 mL extract/d). Extract was orally administered individually once daily with a 30 mL syringe before feeding; while, the enzymes were provided in 100 g concentrate DM before feed to assure of their intake. Animals were housed in individual cages and offered concentrate and silage (Table 1) twice daily (0800 and 1600 h) for 60 days, with 10 days of adaptation to the diet. Feed and water intake were recorded every day. Animal's weight was recorded every 15 days to estimate the average daily gain (ADG, g/d) and feed conversion (FC, g/d). Animals were housed in

individual metabolic cages for 7 days in which feces, urine and feed samples were collected daily. 5% sulfuric acid was added to the urine to keep the pH < 3.0 in order to prevent proliferation of bacterial pathogens potentially destructive of purine derivatives present in each sample collected, then samples were frozen (-20 °C) for later analysis.

**Table 1**

Chemical composition of corn silage and concentrate mixture as well as the ingredients of the concentrate (g/kg DM)

	Concentrate	Corn silage
Dry matter <sup>1</sup>	880	360
Organic matter	325	342
Crude protein	157	72
Ether extract	120	85
Neutral detergent fiber	160	445
Acid detergent fiber	28	111
Lignin	8	18
Ingredient of concentrate		
Corn grain flaked	200	
Corn grain cracked	260	
Sorghum grain	154	
Molasses sugarcane	100	
Distilled dry grain	100	
Soya bean meal	96	
Wheat bran	70	
Na COOH <sub>3</sub>	10	
Mineral mixture <sup>2</sup>	10	

<sup>1</sup>DM expressed as g/kg fresh silage.

<sup>2</sup>Mineral/vitamin premix (25) (Vitamin A (12 000 000 IU), Vitamin D3 (2 500 000 IU), Vitamin E (15 000 IU), Vitamin K (2.0 g), Vitamin B1 (2.25 g), Vitamin B2 (7.5 g), Vitamin B6 (3.5 g), Vitamin B12 (20 mg), Pantotenic acid (12.5 g), Folic acid (1.5 g), Biotin (125 mg), Niacin (45 g), Fe (50 g), Zn (50 g), Mn (110 g), Cu (12 g), I (0.30 g), Se (200 mg), Co (0.20 g).

## 2.2. Preparation of silage

For the realization of corn silage, whole corn plants were cut at the beginning of bolting at a height of 20 to 25 cm and particle size of 0.5 to 1 cm. Plants were ensiled and compact

with a tractor, covered with black plastic and tires, and then allowed to ferment for a further 1 year for use in the feeding of the sheep of this study.

### *2.3. Preparation of extract*

The preparation of extract was described by Salem (2012). Briefly, SB leaves collected from five different willow trees were blended in a Wiley mill (model TORKEY). One kg of leaves in 8 L of methanol/ethanol/distilled water, 10/10/80 (v/v/v), was allowed for 48 h at room temperature and then it was placed in a water bath for 60 minutes at 30°C. The solution was filtered with gauze, discarding the solid fraction, and liquid fraction was retained at 4°C.

### *2.4. Laboratory tests*

Samples of feed and feces were weighed, dried in a forced air oven (60°C/48 h), then were ground (Wiley mill, or 3 mm). Conventional analysis of feed and fecal samples was carried out according to AOAC (1990) for dry matter (DM, #934.01), ash (#942.05), N (#954.01) and ether extract (EE, #920.39). The neutral detergent fiber (NDF, Van Soest et al., 1991), acid detergent fiber (ADF) and lignin (AOAC, 1990; #973.18) analyses were determined using an ANKOM200 Fibre Analyzer unit (ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, USA). NDF was assayed with alpha amylase in the NDF. Both NDF and ADF are expressed without residual ash. Urine samples were subjected to the determination of N (AOAC, 1990), and another part for determining purine derivative (PD) and creatinine in urine according to the method described by Balcells et al. (1992).

### *2.5. Calculations and statistical analysis*



Microbial nitrogen (MN) and metabolizable protein (MP) were determined using the following equations:

Microbial Nitrogen = (PD/0.52)/(0.92×1.97) = X mmol/d (Belenguer et al. 2002) , where PD, purine derivatives (mmol/d)

Metabolizable protein (g N/d) = MN × 0.75×0.85 (AFRC, 1993)

MN, microbial nitrogen (g/d)

The growth performance data were analyzed with the SAS procedure (2002) in which a completely randomized design was used with the statistical model,  $Y_{ij} = \mu + \delta_i + E_{ij}$ , where  $T_i$  are the treatments, and  $E_{ij}$  is the experimental error. Results comparison were performed using Tukey's test at  $P < 0.05$  (Steel et al., 1980).

### 3. Results

**Table 2**

Average daily gain (g/d), water consumption (L/d), feed intake (g/d) and digestibility (g digested/g ingested) of the diets supplemented with exogenous enzymes and/or *Salix babylonica* extract in lambs (n=5)

	Diets				SEM	P value
	Control	EZ	SB	EZSB		
Initial live weight (g/kg <sup>0.75</sup> )	12.6	12.3	12.6	12.1	2.52	0.988
Average daily gain after						
d 15	96 <sup>b</sup>	105 <sup>b</sup>	116 <sup>ab</sup>	150 <sup>a</sup>	15.4	0.002
d 30	121	119	130	162	16.8	0.011
d 45	101 <sup>b</sup>	121 <sup>b</sup>	102 <sup>b</sup>	157 <sup>a</sup>	12.6	<0.001
d 60	97 <sup>c</sup>	125 <sup>b</sup>	101 <sup>bc</sup>	160 <sup>a</sup>	13.1	<0.001
Feed conversion	5.9 <sup>a</sup>	5.1 <sup>b</sup>	5.7 <sup>a</sup>	4.4 <sup>c</sup>	0.87	<0.001

Water intake after						
d 15	0.90 <sup>c</sup>	0.93 <sup>b</sup>	1.42 <sup>a</sup>	0.91 <sup>c</sup>	0.322	0.001
d 30	0.86 <sup>c</sup>	0.96 <sup>b</sup>	1.25 <sup>a</sup>	0.97 <sup>b</sup>	0.715	0.002
d 45	1.43 <sup>b</sup>	1.39 <sup>c</sup>	1.36 <sup>c</sup>	1.58 <sup>a</sup>	0.912	0.001
d 60	1.55 <sup>c</sup>	1.59 <sup>b</sup>	1.54 <sup>c</sup>	1.65 <sup>a</sup>	0.187	0.032
Intake and digestibility						
Dry matter						
Intake	567 <sup>b</sup>	636 <sup>a</sup>	574 <sup>b</sup>	699 <sup>a</sup>	21.38	<0.001
Digestibility	0.703 <sup>b</sup>	0.857 <sup>a</sup>	0.777 <sup>ab</sup>	0.877 <sup>a</sup>	0.0582	<0.001
Organic matter						
Intake	521 <sup>c</sup>	578 <sup>b</sup>	528 <sup>c</sup>	685 <sup>a</sup>	15.9	0.01
Digestibility	0.746 <sup>b</sup>	0.878 <sup>b</sup>	0.810 <sup>ab</sup>	0.889 <sup>a</sup>	0.0316	0.001
Crude protein						
Intake	412 <sup>b</sup>	465 <sup>a</sup>	437 <sup>ab</sup>	452 <sup>ab</sup>	14.3	0.002
Digestibility	0.821 <sup>b</sup>	0.924 <sup>a</sup>	0.827 <sup>ab</sup>	0.922 <sup>a</sup>	0.0245	0.001
Neutral detergent fiber						
Intake	160 <sup>c</sup>	228 <sup>a</sup>	186 <sup>b</sup>	201 <sup>a</sup>	13.6	0.001
Digestibility	0.301 <sup>c</sup>	0.665 <sup>a</sup>	0.476 <sup>b</sup>	0.694 <sup>a</sup>	0.1625	0.001
Acid detergent fiber						
Intake	108 <sup>c</sup>	154 <sup>a</sup>	125 <sup>b</sup>	135 <sup>b</sup>	10.4	<0.001
Digestibility	0.455 <sup>c</sup>	0.739 <sup>a</sup>	0.592 <sup>b</sup>	0.761 <sup>a</sup>	0.0943	0.001

<sup>1</sup>Diets supplemented with of exogenous enzyme (EZ, 10 g/h/d), *S. babylonica* (SB, 30 ml/h/d) extract and their combination (EZSB).

<sup>abc</sup>Means with different superscripts in the same raw are significant ( $P < 0.05$ ).

Live weight (LW)<sup>0.75</sup> of lambs showed a homogeneity between different treatments ( $P > 0.05$ ). Lambs of the treatment EZSB had the highest ADG (g/d) through the period of the experiment; after 15 d ( $P = 0.002$ ), after 30 d ( $P = 0.0112$ ), after 45 to 60 d ( $P < 0.001$ ). However, during the first 30 d the treatment SB had higher ( $P < 0.05$ ) ADG *versus* EZ and control; while EZ treatment increased ( $P < 0.05$ ) ADG *versus* SB and control during the last 30 d of the experiment. Lambs of EZSB followed by EZ and then SB increased ( $P < 0.001$ ) FC ratio *versus* control lambs (Table 2).

Water consumption ( $P = 0.001$ ) increased in SB, followed by EZ during the first 15 d and in EZSB during the second 15 d (*i.e.*, after 30 d) compared to control. However, during the period from 45 d to 60 d, lambs of EZSB consumed more water (Table 2).

Intake of DM and OM increased ( $P<0.05$ ) in EZSB followed by EZ treatments compared to the other treatments, whereas NDF and ADF intakes increased ( $P<0.001$ ) in EZ treatments. Regarding nutrient digestibility, EZSB increased ( $P<0.001$ ) DM, OM, NDF, ADF digestibility (Table 2).

**Table 3**

Nitrogen utilization, purine derivatives and creatinine excretion in lambs fed corn silage and concentrate supplemented with mixture of exogenous enzymes and/or *Salix babylonica* extract (n = 5)

	Diets <sup>1</sup>				SEM	P value
	Control	EZ	SB	EZSB		
N utilization, g/d						
N intake	33.0 <sup>c</sup>	46.9 <sup>a</sup>	38.2 <sup>b</sup>	41.4 <sup>b</sup>	4.12	0.002
N excreted						
Feeces	5.7 <sup>a</sup>	5.1 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>	4.1 <sup>c</sup>	0.54	0.001
Urine	11.7 <sup>c</sup>	20.6 <sup>a</sup>	17.2 <sup>b</sup>	11.8 <sup>c</sup>	1.23	0.001
N balance	15.5 <sup>b</sup>	21.2 <sup>a</sup>	16.2 <sup>b</sup>	25.5 <sup>a</sup>	2.32	0.001
Purine derivatives (PD), mmol/d						
Allantoin (A)	12.2 <sup>c</sup>	13.3 <sup>b</sup>	12.6 <sup>b</sup>	14.4 <sup>a</sup>	1.01	0.001
Uric acid	4.45 <sup>b</sup>	5.32 <sup>a</sup>	5.02 <sup>a</sup>	4.38 <sup>b</sup>	1.82	0.001
Total PD	21.7 <sup>b</sup>	18.2 <sup>c</sup>	16.2 <sup>d</sup>	23.9 <sup>a</sup>	1.36	0.001
Creatinine (C)	25.9	17.7	18.2	16.7	1.38	0.052
Ratio						
A/C	0.50 <sup>d</sup>	0.75 <sup>b</sup>	0.69 <sup>c</sup>	0.86 <sup>a</sup>	0.053	0.002
PD/DOMI (mmol/kg)	0.027	0.016	0.018	0.024	0.0092	0.057
PD/C (mmol/mmol)	0.83 <sup>b</sup>	1.03 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>	1.43 <sup>a</sup>	0.043	0.001
MN (gN/day) <sup>2</sup>	23.02 <sup>ab</sup>	19.23 <sup>b</sup>	17.21 <sup>c</sup>	25.39 <sup>a</sup>	1.481	0.001
MP (gN/day) <sup>3</sup>	10.07 <sup>a</sup>	8.44 <sup>b</sup>	7.51 <sup>b</sup>	11.08 <sup>a</sup>	0.985	0.005

<sup>1</sup>Diets supplemented with of exogenous enzyme (EZ, 10 g/h/d), *S. babylonica* (SB, 30 ml/h/d) extract and their combination (EZSB).

<sup>2</sup>Microbial nitrogen (MN) = (PD/0.52)/(0.92×1.97) = X mmol/day

<sup>3</sup>Metabolizable protein (gN/day) = MN × 0.75 × 0.85 (AFRC, 1993)

<sup>abcd</sup>Means with different superscripts in the same raw are significant ( $P<0.05$ ).

The highest ( $P=0.002$ ) N intake was observed with EZ treatments with the lowest ( $P=0.001$ ) N extracted in the urine. However, the control group had the lowest N intake but

with the highest ( $P=0.001$ ) N extraction in the faeces. The highest ( $P=0.001$ ) N balance was recorded with the EZSB treatment followed ( $P=0.001$ ) by EZ treatment (Table 3).

Concentrations of allantoin, total PD, allantoin/creatinine ratio ( $P=0.002$ ), and PD/creatinine ( $P=0.001$ ) were increased in EZSB compared to the other treatments, while uric acid concentration increased ( $P=0.001$ ) in EZ. Both of microbial N (g N/d;  $P=0.001$ ) and metabolizable protein (g N/d;  $P=0.005$ ) were increased in EZSB followed by control treatment compared to the other treatments (Table 3).

## **4. Discussion**

### *4.1. Daily weight gain, nutrients intake, and digestibility*

A limited number of exogenous enzymes and phytogetic extracts have been commercially introduced in the market. In our study, the ADG of lambs through the experiment period (*i.e.*, 60 d) was improved by 51.6% with EZSB followed by 13.3% for EZ, and then by 8.2% for SB compared with the control treatments. The different feed additives (*i.e.*, EZ, SB, EZ+SB) improved the intake and digestibility of DM, OM, NDF, and ADF compared to control. These improvements were reflected on the feed conversion ratios which were improved also by 25.7% for EZSB, 13.5% for EZ, and the by 3.2% for SB treatments. The increased feed intake, nutrient digestibility, and daily gain with the administration of SB extract and/or enzymes may be related with the positive effects of metabolites contained in the extract (Jiménez-Peralta et al., 2011; Rivero et al., 2012; Salem et al., 2014), and/or the action exerted by the enzymes (Rivero et al., 2012). Researches have demonstrated that a positive correlation between feeding animal on diets supplemented with fiber-degrading enzymes and their performance and its modes of action

are uncertain. Hydrolysis of dietary fiber before ingestion, provision of readily fermentable substrates for ruminal microorganisms and enhancing synergistic between microbial enzymes activity in the rumen are possible mechanisms (Morgavi et al., 2004; Holtshausen et al., 2011; Salem et al., 2013). Moreover, other positive improvements were observed as results of enzymes administration including enhanced microbial colonization of feed by increasing numbers of ruminal fibrolytic microbes (Morgavi et al., 2000) or non-fibrolytic (Colombatto et al., 2003), increased rate of fiber degradation in the rumen, increased rumen microbial protein synthesis (Salem et al., 2013, 2014), and total tract digestibility (Gado et al., 2011; Khattab et al., 2011). However, increased fiber fractions digestion may also be related with reduced digesta viscosity (Hristov et al., 2000) or altered ruminal fermentation (Nsereko et al., 2002). Previous reports using the same enzyme product have also shown that nutrient digestibility were increased (Gado et al., 2011; Khattab et al., 2011; Salem et al., 2013).

Many studies (Salem et al., 2011, 2014) showed an improved animal growth performance and nutrient digestion when the extract of SB was administered to animals. These effects may be due to positive impacts of plant secondary metabolites on ruminal microorganism activity (Jiménez-Peralta et al., 2011; Salem et al., 2012). Administration of plant extracts may increase muscle deposition with more meat quality (Mapiye et al., 2010) due to increased amino acid flow to the duodenum (Mueller-Harvey, 2006). Improved their daily gain also may be related with the ability of SB extract to reduce portion of methane produced during fermentation making more energy available for growth (Jiménez-Peralta et al., 2011). In fact, about 8 to 12% of the digestible energy ingested by ruminants is lost

in the rumen as methane (Busquet et al., 2006). Within the rumen, some bacteria species are capable of metabolizing the active compounds of the extract including phenolics (Varel et al., 1991), alkaloids (Wachenheim et al., 1992), saponins (Hu et al., 2005; Hart et al., 2008) and utilize them as an energy source. These metabolites also may act as catalysts for fiber degradation through increasing access of fibrolytic bacteria to the cell-wall components (Jiménez-Peralta et al., 2011). Phenylpropanoic acid and phenylacetic acid have been reported to improve cellulose degradation and growth of *Ruminococcus albus* (Stack and Cotta, 1986).

The increased of water consumption in the SB treatment, it is suspected due to the astringency that has the extract. Mera (2004) found that the tannins present in the plants can precipitate the salivary proteins, causing an unpleasant astringent taste in the mouth. Forbes (1995) reported that animals consume more water, to adjust the osmotic balance in the gastrointestinal tract.

#### *4.2. Nitrogen utilization and purine derivatives*

Both of EZ and EZSB treatments increased N intake by about 42.1 and 25.5% followed by SB treatments with 15.8% compared to control. At the same time, EZSB and EZ treatments improved N balance by 64.3 and 36.6% compared to control. However, SB improved it with 4.1% only. SB extract had beneficial effects on diet's CP digestibility with increasing microbial protein production (Jiménez-Peralta et al., 2011). Extract with active metabolites like tannins can improve N utilization through their impacting and binding with plant proteins in the rumen and preventing microbial degradation causing an increased amino acid flow to the duodenum from the rumen (Mueller-Harvey, 2006). Besides having

a protective effect on the protein in the rumen, SB extract has the ability to promote duodenal absorption of amino acids and minimizes the excretion of nitrogen (Athanasidou and Kyriazakis, 2004; Jiménez et al., 2011). Salem et al., (2014) stated that *Salix babylonica* extract supplementation to the diet of growing lambs caused a greater ADG with increased DM intake during the experimental period.

Increased of N intake with both of EZ and EZSB treatments may be related with increased nutrients digestibility caused by addition of enzymes (Gado et al., 2009; Salem et al., 2013) which may be due to creation of a stable enzyme–feed complex (Kung et al., 2000; Colombatto et al., 2003). These results indicate a better utilization of nutrients, reducing environmental pollution in the soil, excess of N excreted in the environment, avoiding being transformed to nitrous oxide (  $N_2O$ ), which contributes to the greenhouse effect (Elizondo, 2006 ). These results are similar to Pinos-Rodríguez et al. (2002) who indicated that fibrolytic enzymes have a favorable impact on N balance in sheep fed alfalfa or ryegrass hay.

Some authors were established a relationship between the amount of digestible OM intake and the urinary excretion of PD (Balcells et al., 1993; Perez et al., 1997). However, others found no differences in the PD excretion in urine with different intakes of OM (Chen et al., 1992). A positive relationship between DMI and urinary excretion of PD (Vercoe, 1976) or OMD and urinary excretion of PD in sheep (Balcells et al., 1993), goat (Lindberg, 1985) and cow (Liang et al., 1994) have been described. The values reported in this study for EZSB are higher than the values reported for sheep (18.9 -22.3) (Antoniewicz and Pisulewski, 1982; Balcells et al., 1993). Salem et al. (2013) found that feeding steers on

ZADO<sup>®</sup> caused an increased total purine derivatives and allantoin compared to those of control (*i.e.*, no enzyme addition). However, Gado et al. (2009) found no differences between Brown Swiss cows fed the same enzyme preparation (*i.e.*, ZADO<sup>®</sup>) or those of no enzymes fed.

The efficiency of microbial protein synthesis increases with the increasing feed intake (ARC, 1984). The ability of feeding the enzyme preparation to increase total viable rumen bacterial numbers and rumen microbial N synthesis may be due, at least in part, to increased fiber digestion and an improved capacity of rumen bacteria to digest feed. Our results indicate that when enzyme with SB extract were supplemented to the lambs, it increased the quantity of microbial protein available to animal metabolism, and that increased fiber digestibility and increased the net energy density of the ZADO<sup>®</sup> enzyme diet. Addition of SB extract was expected to stimulate positive effect on increasing degradabilities of CP and cell-wall constituents, as well as increasing MP. Salem et al. (2014) found that administration of SB extract caused an *in vitro* ruminal MP production from lambs fed high concentrate diet.

From obtained results, it was observed how a cumulative positive effects were obtained as a result of combining both SB extract with enzymes. The most important factor should be the doses of administered additives (Jiménez-Peralta et al., 2011; Salem et al., 2013, 2014). Rivero et al., (2012, 2013) stated positive effects on Suffolk lambs performance with no effects on blood chemistry when both SB extract and enzyme ZADO<sup>®</sup> were administered together in their lambs.



## **5. Conclusion**

The supplementation of *Salix babylonica* extract with exogenous enzymes ZADO<sup>®</sup> as an additive in a basal diet at rate of 30 mL SB/d, 10 g ZADO<sup>®</sup>/d improved the nutrient digestibility and live weight gain of growing lambs. Combination of the two feed additives had a positive impact on the use of N and microbial protein synthesis.

## **Acknowledgment**

The authors acknowledge the financial support from the IAEA, Vienna, Austria, Research Contract number MEX16307 within the D3.10.27 Coordinated Research Project. First author also wishes to thank the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the scholarship for her MSc at the Universidad Autónoma del Estado de México.

## **References**

- AFRC, 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisory Manual Prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, UK: CAB International.
- Antoniewicz, A.M., Pisulewski, P.M., 1982. Measurement of endogenous allantoin excretion in sheep urine. J Agric. Sci. 98, 221–223.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Vol. 1. 15 th. Ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, D.C.
- ARC, 1984. The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock, Suppl. 1., Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.

- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *P. Nutr. Sco.* 63, 631-639
- Balcells, J., Fondevila, M., Guada, J.A., Castrillo, C., Surra, J.C.E. 1993. Urinary excretions of purine derivatives and nitrogen in sheep given straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Anim. Prod.* 57, 287-292.
- Ballcells, J., Guanda, J.A., Peiro, J.M., Parker, D.S. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxipurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Cromat.* 575, 153-157.
- Belenguer, A., Yañez, D., Balcells, J., Ozdemir-Baber, N.H., Gonzalez-Ronquillo M. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livest. Sci.* 77, 127-135.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89, 761-771.
- Chen, X.B., Chen, Y.K., Franklin, M.F., Orskov, E.R., Shand, W.J. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J. Anim. Sci.* 70, 1534-1542.
- Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Owen, E., 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 81, 1040-1050.
- Durmic, Z., Blache, D., 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 176, 150-162.

- Forbes, J.M. 1995. Voluntary Food Intake and Diet Selection in Farm Animals. CAB International. p.532
- Gado H.M., Salem A.Z.M., Odongo N.E., Borhami B.E., 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. Anim. Feed Sci. Tech. 165, 131-136
- Gado, H.M., Salem, A.Z.M., Robinson, P.H., Hassan, M. 2009. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. Anim. Feed Sci. Tech. 154, 36–46.
- Han, Y. K, Shin, H. T., Landis, J., 1992. Effect of level of food intake on the excretion of purine derivatives on purine derivatives to creatinine ratio in the urine sheep. Asian-Aust J Anim. Sci 5, 465–468.
- Hart, K.J., Yañez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 147, 8–35.
- Holtshausen, L., Chung, Y.-H., Gerardo-Cuervo, H., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2011. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. J. Dairy Sci. 94, 899–907.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Cheng, K.-J., 2000. Intraruminal supplementation with increasing ruminal levels of polysaccharidedegrading enzymes: effect on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. J. Anim. Sci. 78, 477–487.
- Hu, W.-L., Liu, J.-X., Ye, J.-A., Wu, Y.-M., Guo, Y.-Q., 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 120, 333–339.

- Jiménez-Peralta, F.S., Salem, A. Z. M., Mejía, H. P., González, R. M, Albarrán, P. B, Rojo, R. R., Tinoco, J. J. L. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 136(23), 2-8.
- Kamel, C., 2001. Tracing modes of action and roles of plant extracts in non ruminants. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), Recent Advances in Animal Nutrition. Nottingham Univ. Press, Nottingham, U.K., p. 135.
- Khattab H.M., Gado, H.M., Kholif, A.E., Mansour, A.M., Kholif, A.M., 2011. The potential of feeding goats sun dried rumen contents with or without bacterial inoculums as replacement for berseem clover and the effects on milk production and animal health. Int. J. Dairy Sci. 6, 267-277.
- Lindberg, J. E., 1985. Urinary allantoin excretion and digestible organic matter intake in dairy goats. Swedish J. Agric. Res. 15, 31–37.
- Mapiye, C., Chimonyo, M., Dzama, K., Strydom, P.E., Muchenje, V., 2010. Meat quality attributes of Nguni steers supplemented with Acacia karroo leaf-meal. Meat Sci. 8 (4), 621–627.
- McGuffey, R. K., Richardson, L.F., Wilkinson, J.I.D., 2001. Ionophore for dairy cattle: Current status and future outlook. J. Dairy Sci. 84(E. Suppl.):E194–E203.
- Mejía-Hernández, P., Salem, A.Z.M., Elghandour, M. M.Y., Cipriano-Salazara, M., Cruz-Lagunas, B., Camacho, L.M., 2014. Anthelmintic effects of *Salix babylonica* L. and *Leucaena leucocephala* Lam. extracts in growing lambs. Trop. Anim. Health Pro. (*in press*).

- Mera, A.M.I., 2004. Efecto de leguminosas forrajeras tropicales ricas en taninos sobre la fermentación ruminal y la producción de metano en un sistema *in vitro* (RUSITEC). Centro internacional de agricultura tropical- CIAT. Laboratorio de forrajes. 78p.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Wang, Y., Yang, W.Z., 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* 79, 1621–1630.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., McAllister, M., Wang, Y., 2000. A *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. 25th Conf. Rumen Function, Chicago, USA, 33.
- Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., McAllister, T.A., Wang, Y., 2004. *Trichoderma* enzymes promote *Fibrobacter succinogenes* S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1083–1090.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2010–2037.
- Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y., 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbiol.* 48, 14–20.

Official Journal of the European Union, 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Pages L268/29-L268/43 in OJEU of 10/18/2003.

Palma, J.M., Delgado, C., Moya, A., Aguirre, M., 1995. Composición química y digestibilidad de tres leguminosas arbóreas. Memorias primer simposio Estatal de ciencia y Tecnología. Universidad de colima. Colima, México. Pp 6

Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., Ortega, M.E., 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. J. Anim. Sci. 80, 3016–3020.

Rivero, N., Salem, A.Z.M., Gado, H.M., González-Ronquillo, M., Pliego, A.B., Peñuelas, C.G., Odongo, N.E., 2012. Effect of exogenous enzymes and *Salix babylonica* extract or their combination on haematological parameters in growing lambs. J. Anim. Feed Sci., 21, 577–586.

Rivero, N., Salem, A.Z.M., Ronquillo, M.G., Cerrillo-Soto, M.A., Camacho, L.M., Gado, H., Peñuelas, C.G. 2013. Effects of exogenous enzymes and *Salix babylonica* L. extract on cellular immune response and its correlation with average daily weight gain in growing lambs. Anim. Nutr. Feed Technol. 13, 411-422.

Russell, J.B., Houlihan, A.J., 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. FEMS Microbiol. Rev. 27, 65–74.

- Salem, A.Z.M. 2012. Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifiers *in vitro* gas production of others tree leaves. Anim. Feed Sci. Technol. 176, 94-101.
- Salem, A.Z.M., Hasson, A.A., Khalil, M.S., Gado, H.M., Alsersy, H., Simbaya, J., 2012. Effects of sun-drying and exogenous enzymes on nutrients intake, digestibility and nitrogen utilization in sheep fed *Antiplex halimus* foliages. Anim. Feed Sci. Technol. 171, 128-135.
- Salem, A.Z.M., Gado, H.M., Colombatto, D., Eghandour, M.M.Y., 2013. Effect of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. Livest. Sci. 154, 69–73.
- Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Olivares, M., Elghandour, M.M.Y., Mellado, M., Arece, J., 2014. Influence of *S. babylonica* extract on feed intake, growth performance and diet *in vitro* gas production profile in young lambs. Trop. Anim. Health Pro. DOI 10.1007/s11250-013-0478-0 (*in press*)
- Salem, A.Z.M., Olivares, M., Lopez, S., Gonzalez-Ronquillo, M., R. Rojo, Camacho, L.M., Cerrillo, S.M.A., Mejia, H.P., 2011. Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. Anim. Feed Sci. Tech. 170, 27- 34.
- SAS Institute, 2002. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary,N.C. USA. 956 pp.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics: abiométrical approach. McGraw-Hill Book Co., New York. 633 pp.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1992. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Varel, V.H., Jung, H.G., Krumholz, L.R., 1991. Degradation of cellulose and forage fiber fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in co culture with phenolic monomer-degrading bacteria. *J. Anim. Sci.* 69, 4993–5000.
- Vasta, V., Luciano, G., 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminant's products quality. *Small Ruminant Res.* 101, 150-159.
- Vercoe, J.E., 1976. Urinary allantoin excretion and digestible dry matter intake in cattle and buffalo. *J. Agric. Sci. (Camb)* 86, 613–615.
- Wachenheim, D.E., Blythe, L.L. and Craig, A.M., 1992. Characterization of rumen bacterial pyrrolizidine alkaloid biotransformation in ruminants of various species. *Veterinary and Human Toxicology*, 34, 506513–517.
- Wallace, R.J., McEwan, N.R., McIntosh, F.M., Teferedegne, B., Newbold, C.J., 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15, 1458–1468.



## VIII. DISCUSIÓN

Un número limitado de estas enzimas se han introducido comercialmente en el mercado. Su uso en la alimentación de corderos en el presente estudio aumentó el consumo y digestibilidad de la MS, MO, FND, FAD, estos resultados son similares a los reportados por Salem et al. (2011) en los cuales mostró que los corderos a los que se les ofrecieron 10 g / animal / día de enzimas ZADO ® aumentan la digestibilidad de los nutrientes y GDP en ovejas y cabras, mejorado la utilización de los nutrientes para promover su degradación y la absorción. Gado et al. (2011) demostró que el ensilaje de pulpa de naranja con la enzima ZADO ®, aumento la digestibilidad, fermentación ruminal y GDP en corderos, agregando el EZ mejoró el GDP por encima de 32% y digestibilidad de la MS en un 18%,

Mientras que los extractos de plantas han sido introducidos en la dieta de animales como un aditivo natural para reducir el uso de aquellos que tienen efectos secundarios adversos. Tabbaa Titi (2004) observó en estudios de ganancia de peso, que el peso final en el ganado ovino fue mayor que en aquellos alimentados sin el aditivo. MC Lure et al. (1991) realizaron dos pruebas en corderos destetados a los 50 días en las dietas que incluyen maíz, soya y heno de alfalfa, con ganancias diarias obtenidas entre 170-220 g/día en corderos de engorde intensivo, mientras Fimbres et al, (2002) encontró una mayor conversión de 4.1 a 10,3 kg cuando aumenta la cantidad de forraje de 0 a 30%. Cruywagen et al, (2007) también observó que la adición de enzimas en la dieta de forraje mejora el crecimiento y conversión alimenticia en corderos. Sugirió que las enzimas pueden introducirse ampliamente en la alimentación animal. Estos resultados son similares a los que se reportan en el presente estudio, puesto que mayor GDP y CA es en aquellos animales que fueron suplementados con la administraron de las enzimas y extracto de SB.

El aumento en el consumo y digestibilidad de la MS, MO y CP, con la administración de extracto de SB y las enzimas puede deberse a los efectos

positivos de los metabolitos que contiene la planta sobre la fermentación ruminal (Jimenez Peralta et al., 2011) y la acción ejercida por las enzimas. Del mismo modo, la digestibilidad de nutrientes fue favorecida en el tratamiento EZSB tal vez por la capacidad que tienen los microorganismos del rumen para degradar metabolitos, según Hu et al (2005) y Hart et al (2008) y por los compuestos fenólicos (Varel y Jung, 1986; Varel et al., 1991) sugiere su uso como una fuente alternativa de energía, estos resultados son compatibles con Pinos - Rodríguez et al (2002), quien demostró que estas enzimas tienen un impacto positivo sobre la ingesta y digestión en ovejas, mientras que Dean et al (2007) no encontró efectos positivos cuando los añade enzimas fibrolíticas en dietas con pastos tropicales.

El aumento del consumo de agua en el tratamiento de SB, se sospecha que debido a la astringencia que tiene el extracto, Mera (2004) observó que los taninos presentes en las plantas pueden precipitar las proteínas salivales, causando un astringente sabor desagradable en la boca. Forbes (1995) pudieron constatar que los animales consumen más agua, para ajustar el balance osmótico en el tracto gastrointestinal.

En el balance de N tuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), tratamiento con EZ y SB tuvo mayor impacto positivo en comparación con el resto de los tratamientos, estos resultados son similares a Pinos Rodríguez et al. (2002) quienes indicaron que las enzimas fibrolíticas tienen un impacto favorable en el balance de N en ovejas alimentadas con heno de alfalfa o rye grass, los resultados indican una mejor utilización de los nutrientes, lo cual puede reducir la contaminación ambiental en el suelo, exceso de N excretado en el medio ambiente, evitando ser transformado a óxido nitroso ( $N_2O$ ), que contribuye al efecto invernadero (Elizondo, 2006).

Parece haber consenso sobre el establecimiento de una relación entre la cantidad de la ingesta de MO digestible en pequeños rumiantes y la excreción urinaria de

PD (Chen et al., 1992; Balcells et al., 1993; Pérez et al., 1997), pero algunos autores no encontraron diferencias en la excreción de PD en la orina con las diferentes ingestas de MO (Chen et al., 1992) una relación positiva entre CMS y la excreción urinaria de DP (Vercoe, 1976) o DMO y la excreción urinaria de DP en ovinos (Laurent et al. 1983; Han et al., 1992; Balcells et al., 1993), cabras (Lindberg, 1985) y bovinos (Liang et al., 1994). Los valores reportados en este estudio para EZSB son superiores que los valores reportados para ovejas (18,9-22.3) (Antoniewicz y Pisulewski, 1982; Balcells et al., 1993). La eficiencia de la síntesis de proteína microbiana aumenta con el consumo de alimento (ARC, 1984). Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con Salem et al., (2011), quienes mencionan que puede ser debido a que los ruminantes son capaces de adaptar el consumo de plantas leñosas con alto contenido de compuestos secundarios tales como en combinación con *Salix babylonica* y la enzima ZADO® mejoran la actividad de los microorganismos ruminales.

## **IX. CONCLUSIÓN**

La suplementación de *Salix babylonica* y enzimas exógenas ZADO® como aditivo en una dieta basal, mejoran el comportamiento productivo lo cual favorece la utilización de los nutrientes administrados en la dieta y el uso de alantoína y derivados puricos totales resulta ser un indicador de la síntesis de proteína microbiana ya que no fue afectada por la adición de SB, EZ o su combinación.

## **X. BIBLIOGRAFIA CITADA**

- AFRC, 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. An Advisory Manual Prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, UK: CAB International.
- AFRC, 1996. Necesidades energéticas y proteicas de los rumiantes. En: Sanz R (ed). *Manual de consulta preparado por el Comité Técnico sobre respuestas a los nutrientes del AFRC*. Acribia, Zaragoza, España, Pp 175.
- Agrarias, Universidad Austral de Chile.
- Ángeles Campos, S. C. 2002. Fermentación ruminal, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgZooG014.pdf> Consultado: Julio 2013.
- Antoniewicz, A. M. & Pisulewski, P. M. 1982. Measurement of endogenous allantoin excretion in sheep urine. *J Agric Sci.* 98, 221–223.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Vol. 1. 15 th. Ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, D. C.pp:69-68.
- ARC, 1984. The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock, Suppl. 1., Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Balcells, J., Fondevila, M., Guada, J.A., Castrillo, C., Surra, J. C. E. 1993. Urinary excretions of purine derivatives and nitrogen in sheep given Straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Animal Production* 57: 287-292.

- Balcells, J., Guanda, J. A., Peiro, J., M., Parker, D. S. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxipurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Cromat.* 575, 153-157.
- Bañuelos OT, Mendoza MGD, Rodríguez OJL, Muñoz OA (1995) Evaluación forrajera de 18 variedades de quinua (*chenopodium quinoa* Willd) en Montecillo, México. *Rev. Frac. Agron. (KUZ)*. 12:71-79.
- Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J Dairy Sci* 85, 1777-1792.
- Bart, C. y MT. Oliver. 2001. Las enzimas en la nutrición animal. In: Memoria del 2º seminario Biotecnología para la alimentación animal. Asociación mexicana de especialistas en nutrición animal A. C. México, D. F. pp: 17-34.
- Beauchemin, K.A, Rode, L.M. y Sewalt, V.J.H. (1995) *Can. J. Anim. Sci.* 75: 641-644
- Belenguer, A., Yañez, D., Balcells, J., Ozdemir-Baber, N. H., Gonzalez-Ronquillo M. 2002. Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livestock Production Science* 77: 127-135.
- Berndt SA. 2005. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras a pastoreo primaveral, con y sin suplementación de concentrado. *Tesis de grado*, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Berndt SA. 2005. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras apastoreo primaveral, con y sin suplementación de concentrado. Memoria de Magíster en Ciencias, mención Producción Animal, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias

- Broderick GA, Wallace RJ, Orskov ER (1991) Control of rate and extent of protein degradation. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (Tsuda T, Sasaki Y, Kawashima R, eds) Academic Press, London, 541-59
- Buendía RG, Mendoza MGD, Barcena GJR, Ortega CME, Hernandez SJ, Lara BA (2003) Efecto de la glucomilasa de *Aspergillus niger* en la digestibilidad “*in vitro*” de maíz y sorgo. *Agrociencia* 37:317-322.
- Calsamiglia, Sergio. 1997. Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de especialización FEDNA. Madrid.
- Carreón, L. L. 2003. Efecto de una dieta a base de pollinaza. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 183 p.
- Carro M. 2001. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: <comparación entre marcadores microbianos. *Invest Agr: Prod Sanid Anim* 16, 5-27.
- Chen X B and Gomes M J 1995 Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, UK. p. 1-21
- Chen X, E Orskov, F Hovell. 1991. The use of purine derivatives as a measure of microbial protein supply in ruminants. *Proceedings of the 6th international symposium on protein metabolism and nutrition*. 2nd ed. Herning, Denmark, Pp 67-70
- Chen X, F Hovell, E Orskov. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br J Nutr* 63, 131-142.

- Chen, X. B., Chen, Y. K., Franklin, M. F., Orskov, E. R., Shand, W.J. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivate excretion and microbial protein supply in sheep. *Journal of Animal Science* 70: 1534-1542.
- Chen, Y.J., Kim, I. H., Cho, J.H. Yoo, J.S., Wang, Q., Wang, Y., y Huang, Y. 2008. Evaluation of dietary l-carnitine or garlic powder on growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, blood profiles and meat quality in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 141:141–152.
- Cheng, K.-J. and Costerton, J. W. 1980. Adherent rumen bacteria their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. pages 221-250
- Clark J, T Klusmeyer, M Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci* 75, 2304-2323.
- Cruywagen, C. W. and W.H.V. Zyl. 2007. Effects of a fungal enzyme cocktail treatment of high and low forage diets on lamb growth, *Anim. Feed Sci. Technol.* 934-936.
- Dean, D.B., Adesogan, A.T., Krueger, N.A., Littell, R.C., 2007. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.*, doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.053.
- Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Ehui S, Courbois C (1999) Livestock to 2020; the next food revolution. Food ariculture end environment discussion. International food policy research institute. Washington DC. 28 pp.



- Dewhurst R, D Davies, R Merry. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim Sci Technol* 85, 1-20.
- Ellis W C and Pfander W H 1965 Rumen microbial polynucleotide synthesis and its possible role in ruminant nitrogen synthesis. *Nature*. 205: 974-75
- Febles, G.; T. E. Ruiz, y L. Simón. 1996. Consideraciones Acerca de la Integración de los Sistemas Silvopastoriles a la Ganadería Tropical y Subtropical. En: Leguminosas Forrajeras Arbóreas en la Agricultura Tropical. Clavero, T. ed. Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. LUZ. Maracaibo. Venezuela. p. 91- 99.
- Fimbres, H., Hernández-Vidal, J.F, Picón-Rubio, J. R., Kawas,G. y Lu, C.D. 2002. Productive performance and carcass characteristics of lambs fed finishing ration containing various forage levels. *Small Rum. Res.*, 43: 283-288
- Forbes, J.M. 1995. Voluntary Food Intake and Diet Selection in Farm Animals. CAB International. p.532
- Fujihara T, Orskov ER, Reeds PJ, Kyle DJ. The effect of protein infusión on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J Agric Sci Cambridge* 1987; 109:7-12.
- Fuller, R. 1989 *J. Appl. Bacteriology* 66: 365-378. *J. Appl. Bacteriology* 73: 79-82.
- Gado H.M., Salem A.Z.M., Odongo N.E., Borhami B.E., 2011. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 165, 131-136
- Galindo, Juana; Marrero, Yoandra; González, Niurca y Areadne Sosa. 2006. Libro en versión electrónica: Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.

- García-Trujillo, R., Pedroso, D. 1989. Alimentos para rumiantes. Tablas de valor nutritivos. EDICA, La Habana, Cuba.
- Garré, A., León, E. 2002. Manual de Agricultura. Editorial Salvat, Barcelona. España.
- Giesecke D, Ehrenreich L, Stangassinger M, Ahrens F. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci* 77, 2376-2381.
- Gonda HL, Emanuelson M, Murphy M. 1996. The effect of roughage to concentrate ratio in the diet on nitrogen and purine metabolism in dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 64, 27-42.
- González Muñoz, S. S. 2002. Nutrición de rumiantes y utilización de forrajes. Disponible en: [http://www.tamaulipas.gob.mx/sedeem/sectores/agrop\\_pesca/cursos\\_ganaderia/documentos%5CNutricionrumiantesForrajesSergio.pdf](http://www.tamaulipas.gob.mx/sedeem/sectores/agrop_pesca/cursos_ganaderia/documentos%5CNutricionrumiantesForrajesSergio.pdf). En Línea: Septiembre 2002. Consultado: Agosto 2013.
- González-Ronquillo M, J Balcells, J Gauda, F Vicente. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *J Dairy Sci* 86, 1282-1291.
- Grant R.J. and Mertens D.R., 1992b. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. In: *J. Dairy Sci.*, 75. p. 2762-2768
- Gutiérrez CLC, Mendoza MGD, Ricalde R, Melgoza LM, Plata F (2005a) Effects of exogenous amylases or glucoamylase dose on in situ ruminal digestion of corn and sorghum. *J. Appl. Anim. Res.* 27: 7-10.

- Han, Y. K, Shin, H. T.& Landis, J. 1992. Effect of level of food intake on the excretion of purine derivatives on purine derivatives to creatinine ratio in the urine sheep. *Asian-Aust J Anim. Sci* 5, 465–468
- Hardy, D., Amsterdam, D., Mandell, L. A. y Rotstein, C. 2000. Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, gemifloxacin, grepafloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin, and other antimicrobial agents against bloodstream isolates of gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*44:802–805
- Hart, K.J., Yañez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J., 2008.Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci.Technol.* 147, 8–35.
- Havenaar, R. y Huis In't Veld, J.H.S. 1992 En: The lactic acid bacteria in health and disease. Vol. 1. B.J.B. Wood (Ed.), Elsevier, New York.
- Herdt T. 2003. Fisiología y metabolismo gastrointestinal. En: Cunninghamm J (ed). *Fisiología veterinaria*. 3ª ed. An Elsevier Imprint, Madrid, España, Pp 222-322.
- Hespell, R. B., y M. P. Bryant. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factor son Y ATP. *J. Anim. Sci.* 49:1640-1659
- Hoover, W. H. (1986). "Chemical Factors Involved in Ruminant Fiber Digestion." *Journal of Dairy Science* **69**(10): 2755-2766.
- Hu,W.-L., Liu, J.-X., Ye, J.-A.,Wu, Y.-M., Guo, Y.-Q., 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120, 333–339.

- Jiménez, F. S., Peralta, Salem, A. Z. M., Mejia, H. P., González, R. M, Albarrán, P. B, Rojo, R. R., Tinoco, J. J. L. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on in vitro gas ´production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 136(23): 2-8.
- Joblin, K. N. y G. E. Naylor. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters* , 65:111-122.
- Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. *J. Anim Sci*, 1995; 73: 2483-2492
- Kamel, C., 2001. Tracing modes of action and roles of plant extracts in non ruminants. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, U.K., p. 135.
- Kolver E, L Müller. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 81, 1403-1411.
- Kunkel Proc. Natl. Acad. SCI. USA vol. 82, 1985, pages 488 - 492
- Laurent,.F, Blanchart, G.& Vignon, B. 1983 Relation entrel'excretion urinaire d'allantoine et l'azote chez le chevre lactiere (Relationship between the urinary excretion of allantoinand nitrogen in lactating goats). In *IV Symposium Internationalde Metabolisme et Nutrition Azote's*, vol. 2, pp. 175–178[M Arnal, R Pion and D Bonin, editors]. Clermont–Ferrand,France: EEAP. in French.
- Lawrence, T. L. J., Fouler, V. R. 1997. Compensatory growth In: *Growth of farm animals (CABINT Ed)* Oxon ,UK. Pp.219-246.

- Lewis GE, Hunt CW, Sanchez WK, Treacher R, Pritchard GT, Feng P (1996) Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diets fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74:3020-3028.
- Lindberg, J. E., 1985. Urinary allantoin excretion and digestible organic matter intake in dairy goats. *Swedish J Agric Res* 15, 31–37
- Makkar, H. P. S. 1993. Antinutritional factors in foods for livestock. Occasional publication Br. Society of Animal Production. 16:69-85
- Martínez SJ, Coronel RU, Ortega CME, Mendoza MG (1995) Efecto del crecimiento del hongo comestible *Pleurotus* en paja de cebada sobre la digestibilidad in situ de la fibra. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, México, D. F. 280.
- Martínez-Avalos AMM, Mendoza GD, Cobos MA, González S, García-Bojalil CM, Bárcena R (1998) Nutritional evaluation of cattle manure silage with molasses for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70: 257-264
- Mc Lure, K.E., C.F. Parker and N.A. Parret. 1991. Feedlot performance and carcass Characteristics of hair, wool, and hair crossbred lambs fed high energy diets. In: S. Wildeus (Ed) hair sheep research Symposium. Univ. Of Virgin Islands, ST. Croix. US. V.I.
- McAllister, T. A. ; Oosting, S. J., 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 79 (3): 353-360
- Mellor, S. 2000. Herbs and spices promote health and growth. *Pig Progress.* 16:27
- Mendoza, M.G.D. 1995. Aplicaciones de la biotecnología en la producción animal. *Agroproductividad.* 3:38-40.

- Mera, A. M. I., 2004. Efecto de leguminosas forrajeras tropicales ricas en taninos sobre la fermentación ruminal y la producción de metano en un sistema in vitro (RUSITEC). Centro internacional de agricultura tropical- CIAT. Laboratorio de forrajes. 78p.
- Miranda RLA, Mendoza MGD, Bárcena-Gama R, González MSS, Ferrara R, Ortega CME, Cobos PMA (1996) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63: 289-296.
- Montañez O, Ortega CM, Cobos PM, A Larque, García MJE (2004) Efecto de la alimentación con paja de trigo tratada con *Pleurotus florida* en la flora ruminal de ovinos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38: 249-257.
- Mora JG, Bárcena GJR, Mendoza MGD, González MSS, Herrera HJF (2002) Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas. *Agrociencia* 36:31-92.
- Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., Nsereko, V. L., Rode, L. M., McAllister, M., Wang, Y., 2000. A *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. 25th Conf. Rumen Function, Chicago, USA, 33.
- Newbold, C.J. (2003) En: International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers. Lelystad.
- Orellana P, Balcells J, Martín-Orúe S M, Liang J B and Guada J A 2001 Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livestock Production Science.* 68: 243-50

- Orpin, C. G. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 10:121-143.
- Orskov, E.R. 1997. International Feed Resources Unit. A Report from 1991- 1997. The Rowett Res. Inst. Aberdeen, UK.
- Orskov, O. R. 1982. Protein Nutrition in Ruminants. Academic Press, New York
- Ortega CME, Carranco ME, Mendoza G, Castro G (1998) Composición química de la guácima (*Guazumaulmifolia* Lam) y su potencial en la alimentación de rumiantes. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 32: 411-415.
- Palma, J.M; Delgado, C; Moya, A y Aguirre, M. 1995. Composición química y digestibilidad de tres leguminosas arbóreas. Memorias primer simposium Estatal de ciencia y Tecnología. Universidad de colima. Colima, México. Pp 6
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A.& Castrillo, C. 1997. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of 15N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacterial isolates. *Anim Sci* 65, 225–236.
- Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Mendoza, G.D., Bárcena, R., Cobos, M.A., Hernández, A., Ortega, M.E.,2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80, 3016–3020.
- Piva G. and Rossi F. 1999. Future prospects for the non-therapeutic use of antibiotics. In: *Recent Progress in Animal Production Science*. 1. Proceedings of the A.S.P.A. XII Congress. G. Piva, G. Bertoni, F. Masoero, P. Bani and L. Calamari (ed.). pp. 279-317. Piacenza, Italy.

- Ramos, J. A. ; Mendoza, G. D. ; Aranda, E. ; Garcia-Bojalil, C. ; Barcena, R. ; Alanis, J., 1998. Escape protein supplementation of growing steers grazing stargrass. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 70 (3): 249-256
- Rearte D. 1997. Sistemas de producción de leche basados en praderas permanentes. Serie desimposios y compendios. Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA) 5, 38-51.
- Relling, A. E. y Mattioli, G. A., 2003 Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes
- Reveron, A. E; Rodriguez, J; Montilla, J. 1986. Potencial of *Gliricidia sepium* in animal
- Rojo RR (2005) Effects of exogenous amylases from *Bacillus lecheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 655-665.
- Russell, R. B., Breed, J. & Barton, G. J. (1992). Conservation analysis and secondary structure prediction of the sh2 family of phosphotyrosine binding domains. *FEBS Lett.* 304, 15-20.
- Salem, A. Z. M. 2012. Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifiers in vitro gas production of others tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 176 (2012): 94-101.
- Salem, A. Z. M., El-Adawy, M. M., Robinson, P. H. 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and in vivo digestibility in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 251–267.



- Salem, A. Z. M., Hasson, A. A., Khalil, M.S., Gado, H. M., Alsersy, H., Simbaya, J., 2012. Effects of sun-drying and exogenous exogenous enzymes on nutrients intake, digestibility and nitrogen utilization in sheep fed Antiplex halimus foliages. *Animal Feed Science and Technology*, 171 (2012): 128-135.
- Sánchez, C. 2002, Estrategias para la engorda de corderos en confinamiento. Disponible en [http://www. Borregos.com.mx/archivo/n9/p09estrategias.php](http://www.Borregos.com.mx/archivo/n9/p09estrategias.php)
- Santos A, Diniz R F, Valadares S, Cecon P R and Navajas L 2001 Producao de proteína microbiana e estimativas das excrecoes de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com racoes isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados ñao-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30 (5): 1621-29
- SAS Institute, 2002. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary,N.C. USA. 956 pp.
- SIAP-SAGARPA (2009). Estadísticas ganaderas.
- Smith R, A Mc Allan. 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminants. *Br J Nutr* 24, 545-556.
- Sniffen CJ, Robinson PH. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *J Dairy Sci* 70, 425-441.
- Steel, R. G., D y Torrie, J. H.1988. *Bioestadística: Principios y procedimientos* Edit. Mc Graw Hill. México. 622p.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. *Principles and procedures of statistics: abiométrical approach*. McGraw-Hill Book Co., New York. 633 pp.

- Stewart CS, Bryant MP (1988) The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem (Hobson PN, ed) Elsevier Applied Science, London, New York, 21-75
- Tamminga S, X Chen. 2000. Animal-based techniques for the estimation of protein value of forages En: Givens, D., Owen E, Oxford R, Omed H. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Tirado-estrada, G., I. Mejía-Haro, C.R. Cruz-Vázquez, G.D. Mendoza Martínez, I. Tovar-luna, and J. Fajardo-Peña. 2001. Effects of exogenous enzymes on fiber degradation of corn stalks. J. Anim. Sci. (Suppl. 1) 79: 283.
- Titi, H. H., and M. J. Tabbaa. 2004. Efficacy of exogenous cellulose on digestibility in lambs and growth of dairy calves. Livest. Prod. Sci. 87:207-214.
- Topps J H and Elliott R C 1965 Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. Nature. 205: 498-9
- Torres, R. J. A. 2009. Respuesta productiva y reproductiva de ovinos alimentados con follaje de arbóreas, México, pp 1-61.
- Torres, R.J.A. 2009. Rentabilidad de los sistemas silvopastoriles en la producción ovina, Centro Regional Universitario Oriente, Universidad Autónoma Chapingo. Huatusco, Veracruz pp.1-32.
- Vagnoni DB, Broderick GA, Clayton MK, Hatfield RD. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amount of purines. J Dairy Sci 8, 1695-1702.

- Valadares R, Broderick G, Valadares S, Clayton K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J Dairy Sci* 82, 2686-2696.
- Van Eys, J. y Den Hartog, L. (2003) En: *International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers*. Lelystad.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1992. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminants*. Second Ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 476 pag.
- Van Vuuren, A.M. (2003) En: *International One-Day Seminar: Role of Probiotics in Animal Nutrition and their Link to the Demands of European Consumers*. Lelystad.
- Varel, V.H., Jung, H.G., 1986. Influence of forage phenolics on ruminal fibrolytic bacteria and in vitro fiber degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 275.
- Varel, V.H., Jung, H.G., Krumholz, L.R., 1991. Degradation of cellulose and forage fiber fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in co culture with phenolic monomer-degrading bacteria. *J. Anim. Sci.* 69, 4993–5000.
- Verbic J, Chen X B, Macleod N A and Orskov E R 1990 Excretion of purine derivatives by ruminants: Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science Cambridge*. 114: 243-8

- Vercoe, J. E., 1976. Urinary allantoin excretion and digestible dry matter intake in cattle and buffalo. *J Agric Sci (Camb)* 86,613–615.
- Vitti, D. M. S. S., Nozella, E. F., Abdalla, A. L., Bueno, I. C. S., Silva F., Costa, JC, Bueno, C., Longo, M. S., Vieira, C., MEQ C Filho, Godoy, S. L. S., Mueller., P. B., 2005. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Anim. Feed Sci-and Technol.* 122: 123–133.
- Wallace RJ, Cotta MA (1988) Metabolism of nitrogen containing compounds. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Hobson PN, ed) Elsevier Applied Science, London, 217-250
- Wallace, R.J., McEwan, N.R., McIntosh, F.M., Teferedegne, B., Newbold, C.J.,2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asia nAust. J. Anim. Sci.* 15, 1458–1468.
- Wolin, M. J. 1979. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. *Adv. Microbial. Ecol.* 3:49-77.
- Yang WZ, Rode LM, Beauchemin KA (1998) Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1): 320.
- Yokohama, M.T. y Johnson, K.A. (1988) En: D.C. Church (Ed.). Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp: 125-144.
- Zinn RA, Salinas J (1999) Influence of Fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78 % concentrate growing diet. En: Lyons TP, Jacques KA (eds) *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium.* Nottingham University Press. Loughborough:313-319