

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**INCLUSIÓN DE FORRAJE DE LUPINO EN ALIMENTO Y SU IMPACTO EN LOS PROTOZOARIOS RUMINALES.**

**TESIS PRESENTADA POR:**

**MVZ. RAFAEL CASILLAS MARTIN**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN ANIMAL**

**Director:** Ph.D. José Rogelio Orozco Hernández  
**Asesor** M. en C. Hortencia Verdín Sánchez  
M. en C. Maria Eugenia Loeza Corichi

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco. Mayo 2006.

## CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
DIGESTIÓN EN EL RUMIANTE: FUNCIÓN DE LOS PROTOZOARIOS.....	3
MICROORGANISMOS EN EL RUMEN.....	5
BACTERIAS.....	5
PROTOZOARIOS.....	6
HONGOS RUMINALES.....	9
PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA DIGESTIÓN.....	10
METABOLISMO DEL NITRÓGENO.....	10
METABOLISMO DE GLÚCIDOS.....	12
LEGUMINOSAS Y LA POBLACIÓN DE PROTOZOARIOS.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
PRUEBA EXPERIMENTAL EN ANIMALES.....	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIÓN.....	35
LITERATURA CONSULTADA .....	36

#### ÍNDICE DE CUADROS.

CUADRO 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SIETE ESPECIES DE <i>LUPINUS SILVESTRE</i> DE MÉXICO (g /100 g MS) DE SEMILLA.....	17
---	----

#### ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. TRACTO GASTROINTESTINAL DEL RUMIANTE .....	4
FIGURA 2. IMAGEN DE UN PROTOZOARIO RUMINAL CILIADO.....	8

#### ÍNDICE DE GRÁFICAS.

GRÁFICA 1. PROTOZOOS ( $\times 10^3$ ) LÍQUIDO RUMINAL. ....	27
GRÁFICA 2. CANTIDADES DE PROTOZOOS ( $\times 10^3$ ) EN RUMEN.....	28
GRÁFICA 3. INTERACCIÓN DEL ANIMAL CON EL NIVEL DE FORRAJE DE LUPINO.....	30
GRÁFICA 4. CAMBIOS DE pH RUMINAL CON FORRAJE DE LUPINOS. ....	32
GRÁFICA 5. VARIACIÓN DE pH RUMIAL POR ESPECIE ANIMAL .....	33
GRÁFICA 6. VARIACIÓN DE pH RUMINAL.....	34

## **DEDICATORIA**

**A mi familia por su apoyo durante mis estudios y sobre todo por su paciencia en el desarrollo del proyecto de tesis.**

## RESUMEN.

Las leguminosas del genero *Lupinos* son una fuente alterna de proteina, aprovechables mediante su incorporacion como forraje en la racion para ovinos y caprinos es integrandolo en diferentes niveles. Sin embargo pueden causar defaunacion del rumen, lo que pudiera tener un efecto positivo en el balance nitrogenado. En el presente estudio se emplearon tres ovinos y tres caprinos canulados a nivel ruminal, que consumieron una racion a base de rastrojo de maiz y concentrado (20:80). Los animales se alojaron individualmente, contando con bebederos y comedero. Posteriormente los animales fueron asignados de manera aleatoria a tres niveles de inclusion de forraje de lupino (0, 10, 20% base seca). Se conto con tres periodos de 15 dias cada uno y los ultimo dia del mismo se tomaron muestras de liquido ruminal via canula cada 2 horas. Al liquido se le determino; pH y numero de protozoarios. Los datos fueron analizados como un cuadrado latino 3 x 3, con medidas repetidas en el tiempo. El pH vario con la inclusion del forraje de lupino ( $P < 0.05$ ), sin cambio sustancial por efecto de la especie animal empleada ( $P > 0.05$ ). Por otro lado, el numero de protozoarios se redujo de manera lineal con el nivel de inclusion del forraje lupino en el alimento ( $P < 0.05$ ), siendo mas marcado en el caprino ( $P < 0.05$ ). Por lo tanto se concluye en base a los resultados de la inclusion de forraje de lupino se elimina la poblacion de protozoarios, independientemente del rumiante que la consume.

## INTRODUCCIÓN.

Los forrajes representan el principal insumo que se emplea en la alimentación de los rumiantes en cualquier sistema de producción, en alguno menos y en otros mas cantidad con grano y/o concentrado para complementar las necesidades nutritivas del animal. Por lo tanto las fuentes de naturaleza vegetal para el rumiante son indispensables y sobre todo en aquellos cuyo principal alimento consiste en el forraje que encuentra en la pradera, como en los pequeños rumiantes explotados extensivamente.

Dichos animales deben obtener los nutrimentos que necesitan para su mantenimiento corporal y productivo de los forrajes que encuentra. Además, algunos productores no tienen parcela y/o pradera donde los animales puedan obtener los nutrimentos, por lo tanto deben recibir éstos a través de complementos alimenticios adquiridos en comercios especializados, lo que encarece la producción o simplemente no son disponibles en el lugar.

Lo anterior es causa de que el ganadero deba acopiar ingredientes alternativos que encuentra en el campo para el sustento de sus animales. Sin embargo, algunas plantas leguminosas forrajeras, poseen compuestos que pudieran ser nocivos para la salud de cierta especie animal, pero son aprovechados en otra, disminuyendo su efecto, lo que favorece su uso como nutrimento una vez transformado.

Dentro de los forrajes alternativos que son fuente de proteína se encuentran las leguminosas de crecimiento no deseado por el agricultor, como las del género *Lupinus* (Bird, 1985). Pero, para emplear eficientemente cualquier forraje alternativo hay que conocer su impacto sobre ecosistema del tracto gastrointestinal y de la salud del rumiante, por ello es necesario evaluar el efecto de la inclusión de forraje del género *Lupinus* con dos especies *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus* sobre la población de protozoarios del rumen.

## REVISIÓN DE LITERATURA.

El crecimiento de la población humana impone una necesidad de incrementar la producción de alimentos para alcanzar dicha demanda se deben incrementar las superficies terrestres destinadas a la producción de carne, mediante el uso de sistemas de alimentación intensivo y extensivo (Chaudhary, 1998) sin embargo, las áreas agrícolas disponibles están siendo limitadas por el crecimiento urbano en algunos casos y otras que antes eran explotadas como pastizales se han convertido en productoras de granos y semillas para consumo humano (Chandramoni, 2002). Por otro lado, la producción animal debe encontrar alternativas sostenibles en los insumos no convencionales que no compitan con aquellos destinados al consumo humano como los granos.

En contraste con los monogástricos, los rumiantes son capaces de convertir los componentes lignocelulósicos y el nitrógeno no proteico en productos de origen animal para consumo humano, a través de la simbiosis con microorganismos que se encuentran a nivel del rumen, convirtiéndose en el grupo de animales donde la mejora en la utilización de los componentes nutrimentales de los residuos debe aumentar (Russell 2001, Reyes Solorio 2004). Pero el bajo valor nutricional de las pajas y residuos de cosechas de grano, son la principal limitante para su utilización en la producción animal.

La mayoría de las explotaciones ganaderas basan la alimentación de sus animales en el uso de forrajes de baja calidad, lo cual implica que el estatus nutricional de estos dependa, fundamentalmente de la eficiencia con la que el ecosistema ruminal los aproveche y afecte la producción del animal hospedero.

## **DIGESTIÓN EN EL RUMIANTE: FUNCIÓN DE LOS PROTOZOARIOS.**

Durante las diferentes fases y etapas de masticación los ingredientes presentes en la ración son reducidos a tamaño de partícula lo suficientemente pequeños para que pasen el orificio retículo-omasal. Dichos procesos de masticación están compuestos de la denominada ingestiva y la relacionada con el mericismo (rumia).

La disminución del tamaño de la partícula contribuye sustancialmente a aumentar la superficie expuesta con la finalidad que pueda sufrir la acción de las enzimas presentes en el rumen (Poppi *et al.*, 1980). Por otro lado, la masticación durante el mericismo estimula la motilidad del rumen, lo que permite el vaciado del rumen y se incrementa la degradación enzimática durante el proceso.

Las diferentes porciones anatómicas que componen el complejo retículo-rumen (RR; Figura 1) disminuyen el paso de las partículas de alimento a través del tracto digestivo y aumentan por lo tanto el tiempo de estancia o retención de las mismas lo que favorece su colonización (Wallace, 2004). Las partículas durante este fenómeno sufren una disgregación mecánica (masticación, contracciones del RR) así como un ataque enzimático (microbiano).

EL rumen es el compartimento más voluminoso pues representa 70 a 75% de capacidad total del tracto digestivo. Es en éste compartimento donde se realiza la mayor parte de la utilización digestiva de los componentes de la ración, con valores de 70 - 85% para proteína y de la celulosa de 80 a 90% (Wallace, 2004).



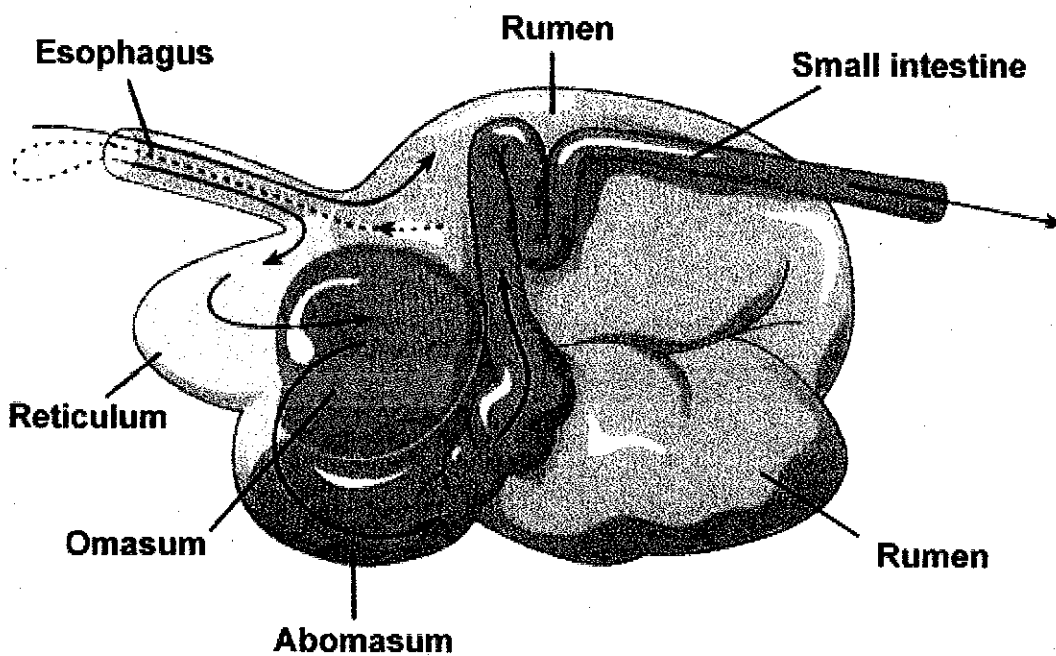


Figura 1. Representación del complejo digestivo del rumiante.

## **MICROORGANISMOS EN EL RUMEN.**

Los animales rumiantes (que realizan la rumia) poseen la capacidad de transformación de la biomasa vegetal, en especial los glúcidos asociados que se encuentran presentes en las paredes celulares, sobre todo mediante una simbiosis que se establece en un estricto ecosistema microbiano anaeróbico que tiene en los compartimentos del tracto gastrointestinal, siendo principalmente en el complejo retículo rumen, lo cual que se favorece gracias a el desarrollo de microflora y de una micro fauna importante y variada.

En el complejo retículo-rumen de los rumiantes de importancia zootécnica coexisten de manera armónica y estricta tres principales tipos de microorganismos; bacterias, protozoarios y hongos que se desarrollan en un ambiente anaeróbico y húmedo, donde actúan a través de diferentes mecanismos y vías sobre los componentes del alimento. Cabe señalar que los elementos nutrimentales que son digeridos en éste compartimento proveen de un sustento básico a la microbiota y a través de su uso se multiplican favoreciendo su desarrollo y reproducción lo cual se reflejará en la digestión de los componentes del alimento.

## **BACTERIAS.**

Este tipo de microorganismos ruminales son procariotas que debido a su cantidad representan más de la mitad de la biomasa microbiana que vive en el compartimento, llegando a constituir un conjunto amplio y diverso (más de 60 especies) con una concentración que varía de  $10^{10}$  hasta  $10^{11}$  células / mL de líquido ruminal (Fonty *et al.*, 1995).

La colonización bacteriana del tracto digestivo del rumiante es suficientemente rápida para favorecer la digestión de los elementos nutricionales que recibe el futuro rumiante (Fonty *et al.*, 1987). Los anteriores autores (Fonty *et al.*, 1987) establecen que a la edad de un día las primeras bacterias se presentan (*Escherichia coli*, estreptococos principalmente) a nivel ruminal, pero aquellas que poseen capacidad celulítica comienzan a aparecer a los 4 días en casi el 75% de los rumiantes jóvenes. Siendo tres principales especies bacteriana con capacidad celulolítica: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*.

Las anteriores especies bacterianas pueden llegar a estar presentes en el líquido ruminal en concentraciones que varían de  $10^8$  hasta  $10^9$  / mL. Sin embargo, las bacterias no se encuentran distribuidas de manera homogénea en el contenido ruminal, existiendo especies que se asocian a la fase sólida (o libres), otras representantes se adhieren solidamente a las partículas alimentarias (50 – 75% de las totales) y tienen poca asociación con la fase líquida (Cheng y Costerton, 1980), así como aquellas que se instalan en el tejido del rumen y sirven de aduana a los elementos que se absorben en el sitio.

## PROTOZOARIOS.

Los protozoarios son organismos eucariotas unicelulares, dentro de los cuales se pueden distinguir dos grandes tipos: los flagelados y los ciliados (Figura 2). Los ciliados representan casi la mitad de la biomasa microbiana con una concentración que varía de  $10^4$  hasta  $10^6$  / mL. Se pueden distinguir dos grandes grupos: los holotricos y los entodinomorfos. Los primeros pertenecen a la clase *Vestibulifera*, orden *Trichostomatida*, y a la familia *Isotrichidae*. De los cuales los géneros más representativos en el rumen son *Isotricha* y *Dasytricha*.

Por otro lado los entodiniomorfos pertenecen a la clase *Vestibulifera*, orden *Entodiniomorphida*, familia *Ophryoscolecidae* y a cuatro subfamilias *Entodinidae*, *Diplodinidae*, *Epidinidae* y *Ophryoscolecinae*. Frecuentemente se encuentran los géneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Diploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* y *Ophryoscolex* a nivel ruminal (Jouany, 1996).

La implantación de los protozoarios a nivel ruminal de los animales jóvenes (o en rumen desprovisto de los microorganismos) no se realiza por contacto directo (saliva) o por proximidad con otro animal. Los ciliados del género *Entodinium* aparecen al cabo de 15 días del nacimiento en ovinos. Posteriormente los holotricos se instalan, seguidos por los entodiniomorfos.

La población de protozoarios que poseen cilios aumenta constantemente hasta los 60 días de edad del animal ( $5.7 \times 10^5$  protozoarios / mL). Sin embargo, aun si los protozoarios en lo general representan una porción importante de la biomasa ruminal, los ciliados en lo particular no son indispensables para la vida del rumiante, contrariamente a las que sucede con las bacterias de los diferentes géneros presentes en el rumen (Fonty *et al.* 1995; Jouany 1991a).

Por otro lado, el tipo y composición del alimento que le es ofrecido al animal condiciona fuertemente la población de protozoarios que será la predominante (Jouany y Ushida, 1998). Por lo tanto la composición de los microorganismos puede cambiar con la cantidad de concentrado (y elementos constitutivos) que se le ofrezca al rumiante.

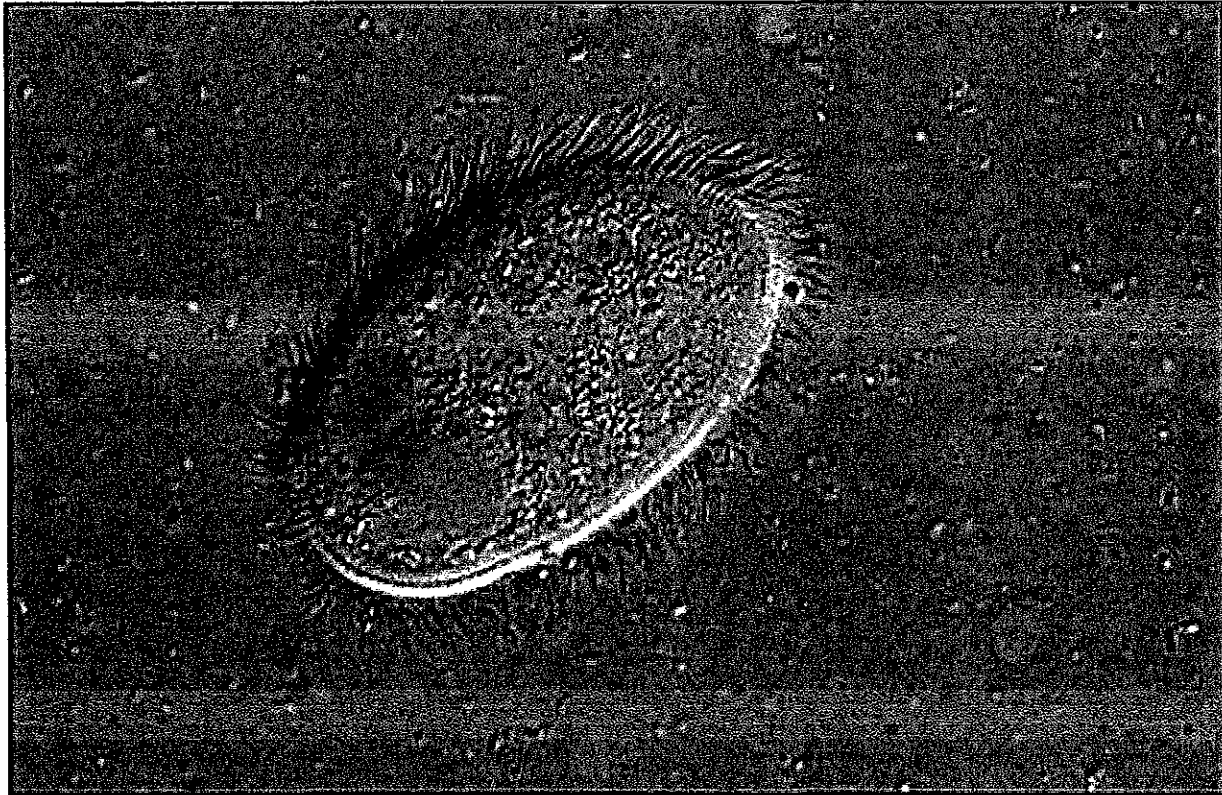


Figura 2. Imagen de un protozoo ruminal ciliado.

La población de los entodiniomorfos (*Entodinium*  $1.2 \times 10^6$  protozoarios / mL) aumenta cuando el porcentaje de hidratos de carbono no estructurales en el alimento ofrecido se incrementa hasta 60%. Los holotricos aumentan ( $7 \times 10^4$  protozoarios / mL) cuando la cantidad de azúcares solubles se incrementa en la ración hasta un 40% (Jouany y Ushida, 1998).

De igual manera se observan variaciones en la población de protozoarios presentes en rumen durante las actividades de rumia. Desplazándose los del genero holotricos (quimiotactismo) del retículo al remen después de haber consumido el alimento. Los trabajos realizados por Yang (1992) indican que una porción importante de los protozoarios es retenida en el rumen. Sin embargo, su aporte al nitrógeno que sale del rumen solo es de aproximadamente un 20%.

### **HONGOS RUMINALES.**

Son entidades que por sus características de aislamiento presentan cierta dificultad para su identificación. El ciclo de vida de esta microflora se componen de fases alternativas, con la presencia de una móvil que esta constituida por zoosporas flageladas, así como de una forma vegetativa que se fija a los tejidos de origen vegetal, constituida por un esporocisto provisto de rizoides (Orpin y Joblin 1988).

La población fúngica esta estimada en unidades de  $10^3$  y  $10^5$  / mL, constituyendo aproximadamente el 10% de la biomasa microbiana presente en el rumen (Fonty y Joblin, 1991), estimación poco precisa por el difícil aislamiento que requiere su conteo. En efecto, la asociación estrecha del rizoide fúngico con el vegetal y la producción irregular de los esporocistos hace su conteo impreciso, siendo el genero *Neocallimastix* el más representativo (Brownlee, 1989; Fujino *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002).

## **PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA DIGESTIÓN.**

Las tres principales poblaciones microbianas poseen un complejo enzimático necesario para la degradación del conjunto de componentes de la ración consumida por el rumiante, principalmente los hidratos de carbono estructurales (paredes vegetales). Sin embargo, a nivel ruminal múltiples interacciones y factores condicionan la degradación (o digestibilidad *in situ*) de las paredes, por ejemplo: accesibilidad de los microorganismos al sustrato donde actuarán, posibilidad de adhesión a las partículas y por último la actividad enzimática (Cheng *et al.*, 1991, Fonty *et al.*, 1995).

## **METABOLISMO DEL NITRÓGENO.**

Las proteínas cuando son ingeridas por el animal serán degradadas inicialmente por la microbiota que habita el complejo RR, constituida por bacterias y protozoarios. Dicha degradación o "digestión" implica principalmente dos etapas: la proteólisis enzimática que tiende a producir como resultado péptidos y aminoácidos, así como mediante un proceso de desaminación transforman estos últimos en nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$ ) y esqueletos o compuestos carbonados que serán subsecuentemente transformados en ácidos grasos volátiles (AGV) o de cadena corta (acético, propionico y butírico), colaborando así al mantenimiento de la homeostasis energética del ecosistema del líquido ruminal.

La actividad proteolítica de las diferentes familias de bacterias presentes en el líquido ruminal esta estrechamente asociada a la presencia de enzimas en su pared celular. En consecuencia, en la primera etapa de la degradación de las proteínas que llegan al rumen-retículo a través del alimento consiste en una interacción establecida entre el microorganismo y el sustrato donde deberá fijarse para poder iniciar el proceso de digestión.

Las proteínas y en lo general el nitrógeno que presente la característica de ser soluble y será principalmente degradado o utilizado por bacteria ruminales, mientras que la acción que realizan los protozoarios para éste fin es escasa. Sin embargo, hay que recordar que los protozoarios ingieren o engullen partículas (incluyendo las proteicas) al igual que a las bacterias que se fijan a ellas, limitando su efecto y colaborando a mejorar el paso de compuestos nitrogenados de origen alimentario al abomaso.

Por otro lado, pocos son los hongos anaeróbicos que habitan en el rumen poseen actividad proteolítica de importancia, y en consecuencia su contribución o efecto en el uso de proteínas de origen alimentario es muy variable y escaso (Sody 2004).

Las bacterias denominadas "proteolíticas" producen proteasas basadas en la cisteína, aunque se ha observado la presencia de serina – proteasas y de metalo - proteasas para el desarrollo de su actividad enzimática. Ninguna de las especies bacterianas presentes en el rumen posee una actividad para la degradación de proteínas con características específicas, sin embargo, las del genero *Streptococcus bovis* tienen una fuerte actividad aminopeptidasa. Por otro lado, los protozoarios presentan proteasas tipo intracelulares a base de cistina y ácido aspartico, siendo el genero *Entodinium* sp. quien posee la mayor actividad enzimática con este tipo de enzimas (Jouany 1996).

Los péptidos que son producidos como resultado de la proteólisis presentan una tasa de utilización a nivel ruminal más rápida que la de aminoácidos libres correspondientes al perfil de los primeros, siendo principalmente las bacterias las responsables de tal fenómeno. Los productos de la degradación de péptidos son encontrados extracelularmente aun cuando la mayoría de las enzimas son asociadas a la célula.



Los oligopeptidos de bajo peso molecular son preferentemente integrados a la proteína bacteriana después de haber sido hidrolizado en sus componentes, aminoácidos, dentro de la célula. Sin embargo, los aminoácidos producidos durante la proteólisis se encuentran en poca concentración a nivel del líquido ruminal, ya que son rápidamente convertidos en  $\text{NH}_3$  y AGV por la población microbiana (Mackie y White, 1990). Los protozoarios tienen un papel primordial durante dicho fenómeno ya que su capacidad de desaminación de los aminoácidos es tres veces mayor que la bacteriana.

El amoniaco y algunos ácidos grasos (valerico) que se observan en el líquido son producto de la actividad proteolítica, urolítica y de desaminación realizada por los microorganismos presentes en el rumen lo que se refleja en una pobre utilización de las proteína, lo que conlleva a pérdidas (Fonty *et al.*, 1995). Además, el reciclado del amoniaco (*in vivo*) vía urea a nivel ruminal tiene una trascendental importancia para conservar la homeostasis del nitrógeno (pool de nitrógeno) en el complejo RR. Por otro lado, *in vitro*, el reciclado del nitrógeno bacteriano es el resultado de la predación que realizan los protozoarios y puede llegar a representar hasta los 90 g de la materia seca / día en el ovino.

## **METABOLISMO DE GLÚCIDOS.**

Las bacterias celulolíticas participan activamente en la degradación de los polímeros que contienen las plantas al fijarse en la pared celular de ésta últimas. Dicha degradación necesita la acción de enzimas especializadas que son distribuidas entre los diferentes microorganismos fibrolíticos presentes en el rumen (Doré y Gouet, 1991). Estas enzimas se encuentran agrupadas en complejos de alto peso molecular (celulosoma) que les permite ser más eficaces (Fonty y Forano, 1999).

La hidrólisis del carbohidrato estructural celulosa se hace mediante la acción de celulasas de tres tipos: endoglucanasas, exoglucanasas y las beta – glucosidasas. De igual manera las hemicelulosas de las paredes celulares de la planta son hidrolizadas por tres géneros de enzimas: endoxylanases, exoxylanases y las beta – xylosidasas (Forano *et al.*, 1996).

Por otro lado, los protozoarios ciliados y algunos hongos presentes en el complejo retículo-rumen poseen un potencial enzimático que colabora en la acción anterior (Fonty y Joblin, 1991; Grenet *et al.*, 1989; Jouany y Ushida, 1990). Los protozoarios del género ciliado (grandes entodinomorfos) pueden ingerir partículas alimentarias, las encierran en vacuolas y posteriormente las digieren en el interior de las éstas (Ushida, 1994).

Los anteriores protozoarios poseen un mayor actividad celulolítica que los ciliados del género *Entodinium*. La actividad celulósica se encuentra asociada a la fracción citoplasmática de los protozoarios, la cual parecería más elevada que la encontrada en las bacterias que pueden realizar dicha acción. Sin embargo, es difícil distinguir la contribución de bacterias fijadas al alimento y de los protozoarios en la degradación de la celulosa de las paredes celulares de la planta (Fonty *et al.*, 1995).

Las hemicelulosas estructurales son activamente digeridas a nivel citoplasmático en los entodinomorfos, mientras que los holotricos hacen un pobre papel en la fibrolisis. Por otro lado, las principales bacterias con actividad celulolítica son; *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* las cuales contribuyen mediante adherencia a las partículas (Fonty *et al.*, 1995).

Los productos de la degradación de los polisacáridos son los oligosacáridos solubles y azúcares varias, las cuales son fermentadas para generar moléculas de adenosin trifosfato (ATP) que serán empleadas por diferentes microorganismos ruminales. La mayoría de los protozoarios holotricos pueden fermentar azúcares solubles, mientras que pocos son los tipos de entodinomorfos que tienen esa capacidad (Jouany y Ushida, 1998).

El almidón alimentario que comió el rumiante, es ingerido en forma de gránulos por los protozoarios ciliados, sobre todo por el genero *Isotricha* quienes poseen la mayor actividad amilolítica. Lo cual contribuye a limitar el descenso del pH del líquido ruminal sobre todo cuando está ligado a la degradación de almidón por las bacterias ruminales. Además, las especies bacterianas amilolíticas que se encuentran adheridas al grano son frecuentemente ingeridas por los protozoarios.

Los productos de la degradación del almidón por parte de los protozoarios son: ácido butírico (C<sub>4</sub>), H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub> así como bajas cantidades de ácido propionico (C<sub>3</sub>) y láctico, además otros protozoos consumen éste último limitando su efecto sobre el tejido del rumen (Jouany y Ushida, 1998).

Diferentes estudios (Jouany y Ushida, 1998; Fonty *et al.*, 1995; Grenet *et al.*, 1989) han demostrado que la ganancia de peso de los animales y su consumo de materia seca pueden explicar en buena parte el aumento en la eficiencia alimentaria de animales defaunados (especialmente de protozoarios ciliados), especialmente en aquellos que reciben un alimento de bajo valor nutritivo ya que permite la existencia de poblaciones con capacidad celulolítica. Algunos han mostrado que niveles elevados de concentrado en la alimentación del rumiante puede llegar a defaunarlos completamente.

Dado que la defaunación no afecta de manera significativa el consumo de alimento y que los protozoarios ciliados tienen menos actividad digestiva sobre las paredes celulares y materia orgánica, la cantidad de energía absorbida debe ser menor que con un animal convencional. Por lo tanto, la conversión alimenticia mejora después de la defaunación atribuida al uso metabólico de nutrientes absorbidos, para labores de mantenimiento y desarrollo corporal.

Lo anterior puede explicarse por el incremento de aminoácidos esenciales absorbidos y aumento en el tránsito de nitrógeno total (18%) a nivel del intestino delgado, el cual puede ser debido al flujo de N microbiano (Ushida *et al.*, 1990). En promedio este último aumenta un 22% vs. 13% del N no microbiano. La mayor eficiencia del uso metabólico de los nutrientes con la defaunación puede deberse además a la utilización energética de estos en el rumen, ya que el proceso disminuye la concentración de los ácidos grasos volátiles e incrementa la relación (acético + butirico)/propionico.

También la concentración de lípidos es mayor en bacterias (especialmente las fijadas al alimento) comparados con protozoarios puede contribuir a un incremento en el uso metabólico de los nutrientes absorbidos, especialmente de los ácidos grasos con la defaunación de ciliados. Sauvart y Bas (2002) reportaron que la concentración de los ácidos grasos era en promedio de 15-20, 6-10 y 2-4% de la materia seca en bacterias adheridas, libres y protozoarios, respectivamente.

## LEGUMINOSAS Y LA POBLACIÓN DE PROTOZOARIOS.

Las actividades enzimáticas de los diferentes actores presentes en el complejo retículo-rumen colaboran de manera armonica en la utilización de los componentes del alimento. Sin embargo, existen algunos componentes fuente de proteína que pueden afectar ésta situación.

Por ejemplo Navas *et al.* (1992, 1993) reportan en dos estudios empleando follaje de leguminosas arbustivas que la población faunica que se encuentra normalmente en el rumen se vió reducida con la inclusión del ingrediente en el alimento que les fue ofertado al rumiante, lo cual mejoró ligeramente la utilización digestiva de las paredes celulares. Lo anterior pone de manifiesto el posible impacto de la inclusión de forrajes alternativos en el alimento de rumiantes y su efecto sobre la digestión en el rumen.

Algunas leguminosas como las *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* y *Lupinus mutabilis* han sido cultivadas a nivel mundial debido a que las semillas representan una fuente importante de proteína con valores de 30 a 40% a base seca según la especie, variedad y las condiciones ambientales (Hill, 1977).

En Jalisco existen aproximadamente de 15 especies de lupino que se encuentran distribuidos en su mayoría en la Sierra Madre Occidental y Sierra Volcánica Transversal; localizados en los municipios de Tapalpa y Chiquilistlán (Sierra del Halo), Mezquitic (San Juan Peyotan y San Andres Cohamiata), Tequila (Volcán de Tequila), Mascota (Cerro del Molcajete y Lago de Juanacatlán), Autlán (Sierra de Manantlán), San Martín de Bolaños (San Miguel de la Sierra), Mazamitla (Sierra del Tigre), Cuquío (cerca del Rio Aguacaliente), Jocotepec ( Sierra del Tecuán), Tonila (Volcán de Fuego y nevado de Colima), Ciudad Guzmán, Ojuelos, Lagos de Moreno y sierra de Quila (McVaugh, 1987).

Cuadro 1. Composición química de siete especies de *Lupinus* silvestre de México (g /100 g MS) de semilla.

	Cenizas	Lípidos	Fibra	Proteína*	CHOs
Especie de lupino					
<i>elegans</i>	4.20	5.79	12.91	45.41	31.69
<i>exaltatus</i>	3.59	8.50	14.61	40.50	32.80
<i>reflexus</i>	3.61	7.90	16.58	37.31	34.60
<i>rotundiflorus</i>	4.01	5.50	15.11	42.82	32.56
<i>simulans</i>	3.59	6.29	14.42	40.70	35.00
<i>splendens</i>	3.30	8.89	12.70	37.20	38.10
<i>madrensis</i>	3.51	6.80	15.40	41.50	32.80

(N x 6.25).

Fuente: Ruíz y Sotelo, 2001.

Pero a pesar de representar una fuente alterna de proteína cruda para la alimentación animal, poca información ha sido generada relacionada en aquellas especies de lupino nativas y sobre todo el impacto que la inclusión de estas especies en el ecosistema ruminal. Lo cual colabora a ampliar el conocimiento que se tiene sobre especies nativas que mejoren su uso en la alimentación de pequeños rumiantes como los ovinos y caprinos, sobre todo cuando se emplea el forraje que es considerado como no deseado por los productores de maíz en regiones con considerable número de explotaciones extensivas de estos dos rumiantes.

Por ello es deseable conocer el impacto de la inclusión y nivel del mismo de los forrajes alternativos sobre la población microbiana para estimar su efecto cuando sea necesario y obligatorio emplear estos recursos forrajeros en la alimentación del rumiante.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La industria ovina se ha interesado en reducir la edad al destete de sus animales con la finalidad de maximizar la productividad anual por hembra. Esto tiende a disminuir los costos e incrementar la productividad de las empresas, sobre todo de aquellas basadas en el sistema extensivo. Sin embargo, cuando el sistema productivo no proporciona los elementos nutricios al animal, este demerita su productividad resultando en menor ganancia de peso.

Por otro lado, durante su estancia en las praderas los animales consumen plantas cuya acción sobre el proceso digestivo se desconocen, aun cuando son fuente potencial de nutrimentos. Con el propósito de subsanar los problemas asociados a la falta de nutrimentos en los sistemas productores de ovinos, cotidianamente se utilizan suplementos en la alimentación de los animales. Dichos suplementos pueden estar o no al alcance del productor, debiendo éste buscar alternativas para llenar las necesidades proteicas de sus animales. Para ello utiliza generalmente leguminosas que crecen en las praderas, las cuales a través de los años se han ido adaptando al ecosistema.

Por lo tanto los productores de ovinos en sistemas extensivos logran llenar las necesidades de sus animales empleando leguminosas arbustivas. Dentro de dichas plantas se encuentran las del genero *Lupinus*, de las cuales solo se consideraba la semilla como ingrediente, sin embargo el efecto que tiene el forraje de estos vegetales en el ecosistema ruminal se desconoce y existe poca información publicada. Por ello, se consideró necesario evaluar el efecto de la inclusión de forraje de lupino sobre la población protozoaria presente en el rumen con la finalidad de aportar conocimiento sobre su impacto en el animal.



## **JUSTIFICACIÓN.**

El empleo de forrajes alternativos en la alimentación de ovinos y caprinos requiere conocer el efecto negativo que su inclusión pudiera tener en la salud de sus animales. Por otro lado la falta de información concerniente al impacto en la microflora ruminal del uso de plantas destinadas a la obtención de forraje alternativo para productores de rumiantes estimula a seguir investigando sobre sus efectos. Por ello, evaluar el efecto de la inclusión de forraje de plantas del género *Lupinus* sobre la población protozoaria del rumen se plantea como una necesidad dentro del proceso de evaluación de fuentes alternativas de proteína, sobre todo para aquellos productores que no tienen acceso, económico o geográfico, a productos tradicionales de alta proteína como la pasta de soya, gluten de maíz, pasta de cartamo, pasta de canola, etc.

## **HIPÓTESIS.**

El consumo de sustancias antinutricionales (con reconocida actividad antinutricional) contenidas en el forraje de las especies *Lupinus rotundiflorus* y *Lupinus exaltatus* puede modificar la población de protozoarios presentes en el retículo rumen de los ovinos y caprinos, y posiblemente se afectara la productividad del animal.

## **OBJETIVOS.**

### **General.**

Evaluar el efecto de niveles crecientes de inclusión en el alimento de forraje lupino sobre el pH del líquido ruminal y la población de protozoarios presente en el complejo retículo rumen de ovinos y caprinos.

### **Particulares.**

Evaluar las variaciones horarias del pH del líquido ruminal de ovinos y caprinos cuando se incluya el forraje de dos especies de *Lupinus*.

Determinar el efecto del incremento en la inclusión del forraje de *Lupinus* en la ración del ovino y caprino sobre los protozoarios del rumen.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de las Áreas Experimentales del Departamento de Producción Animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, ubicado en el kilómetro 15.5 de la carretera a Nogales, en el predio "Las Agujas" en Nextipac, Zapopan, Jalisco.

El municipio se localiza en la región centro del estado de Jalisco, en las coordenadas extremas de 20°25'30" a 20°57'00" de latitud norte y 103°19'30" a 103°39'20" de longitud oeste, a una altura de 1,548 metros sobre el nivel del mar. El clima del municipio es templado, semiseco con invierno y primavera secos, y semicálidos con invierno benigno. Al Norte y Sur, es semiseco con invierno y primavera secos, y semicálido.

Temperatura media anual es de 23.5°C, y tiene una precipitación media anual de 906.1 milímetros con régimen de lluvia en los meses de junio a octubre. Los vientos dominantes son con dirección este, el promedio de días con heladas al año es de 5.12. Los suelos dominantes pertenecen al tipo regosol eútrico y feozem háplico y, como suelo asociado el luvisol crómico.

Se cultivaron dos especies silvestres de *Lupinus*; *exaltatus* y *rotundiflorus* obtenidas de la sierra de Tapalpa y en las faldas del volcán de Colima respectivamente. Las semillas (escarificadas por escaldado a 70°C) se sembraron (primavera-verano) al boleó en una parcela de terreno de 12 x 30 m, el cual fue dividido en dos parcelas de 15 X 12 m. Una para recolección de material en verde y semilla, a los noventa días de *Lupinus exaltatus* y *Lupinus rotundiflorus* previamente identificadas, bajo un diseño de bloques al azar a su cosecha.

El forraje se cortó a una altura de corte de 10 cm del suelo y a edades de 90 y 180 días, atendiendo a los antecedentes de maduración, floración y producción de semilla. Posteriormente el forraje fue henificado y el material así obtenido fue molido a un tamaño de partícula de 25 mm en un molino de cuchillas. A las muestras de forraje, se les determinó su análisis proximal.

### **PRUEBA EXPERIMENTAL EN ANIMALES.**

Se utilizaron tres borregos machos encastados de Pelibuey de aproximadamente 35 kg de peso vivo y tres caprinos machos de la raza Saanen de un peso similar. Los animales fueron alojados en jaulas individuales de metal con una superficie de 1.3 X 0.8 m, las cuales se ubicaron en un galerón completamente techado con lamina de asbesto. Las jaulas contaron con piso cribado de madera, comederos y bebederos individualmente.

Los animales fueron fistulados quirúrgicamente y canulados a nivel del saco dorsal del rumen y posteriormente fueron sometidos a un período de recuperación paulatina de 15 días pos-operatorio. Los animales recibieron una alimentación a base rastrojo de maíz y concentrado con la finalidad de llenar los requerimientos nutricionales de los mismos.

Los animales después del periodo anteriormente descrito fueron distribuidos a tres niveles de inclusión (0 (testigo), 10, y 20% en base de materia seca) de henificado de lupino (50:50 de *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus*) durante 15 días y al final del periodo se procedio a la toma de muestras. Las muestras de líquido ruminal se obtuvieron a través de la cánula cada 2 horas durante 24 horas. Lo anterior siguiendo un diseño en cuadrado latino 3 x 3 y medidas repetidas en el tiempo.

Muestras de líquido fueron empleadas inmediatamente para la determinación de los cambios horarios del pH. El fluido ruminal se filtró utilizando gasa y se diluyó en una relación de 1 fluido: 2 solución fijadora (30% formaldehído). El conteo de protozoarios se realizó utilizando la cámara de Neubauer improved® (Marienfel, Germany). El procedimiento fue realizado contando los recuadros superior izquierdo, superior derecho, central, inferior derecho e inferior izquierdo, de cada cámara (superior e inferior); por medio de un microscopio óptico.

El cálculo del número de protozoarios presentes en cada mililitro del líquido ruminal se realizó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoarios (mL)} = (X \text{ (muestra)}) (\text{inverso del factor de dilución}) (10^3).$$

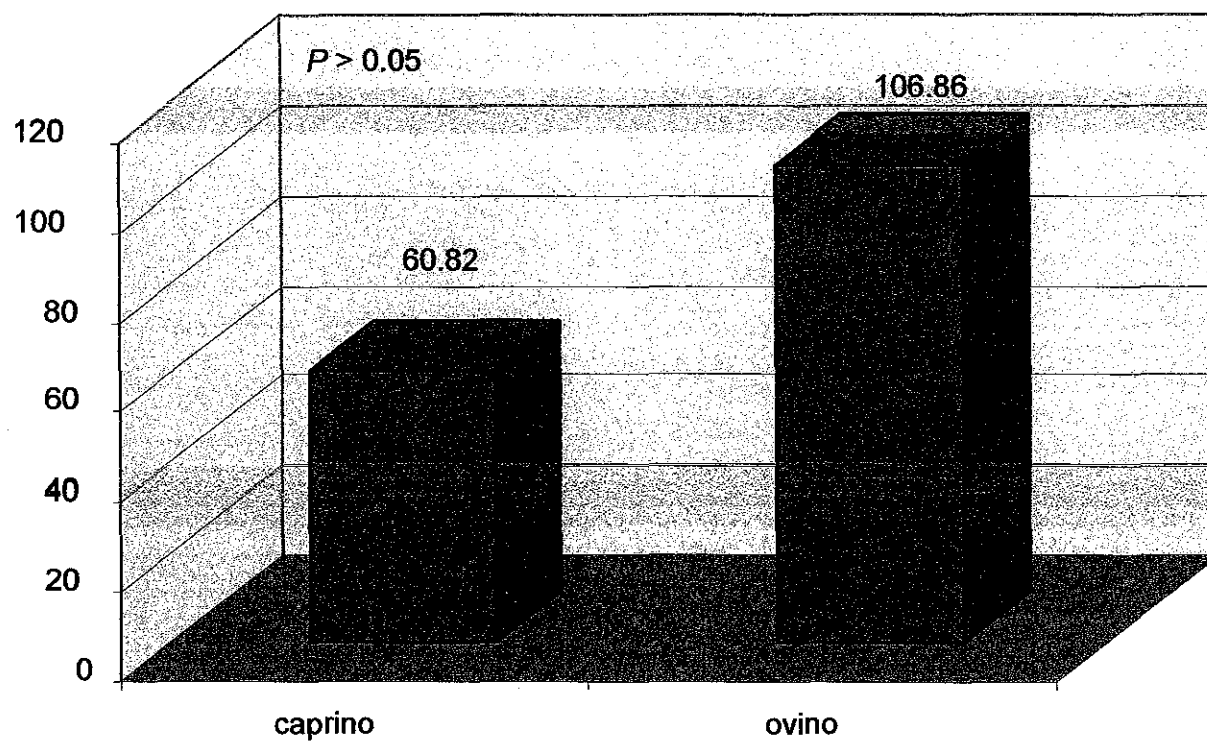
Los datos obtenidos de estas determinaciones fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el programa del paquete estadístico Minitab (1998) para determinar el efecto del nivel de inclusión de *Lupinus* en el alimento sobre la fauna ruminal y el pH. La diferencia entre tratamientos fue declarada con un alfa de 0.05. Cuando existió la anterior se empleó el método de Duncan para comparar los promedios.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados encontrados en el presente estudio muestran que la población de protozoarios (células  $\times 10^3$ / mL) a nivel ruminal aunque numéricamente fueron diferentes, estadísticamente los valores fueron similares entre el ovino y caprino (Gráfica 1;  $P = 0.059$ ). Por otro lado, independientemente con la especie animal empleada para la evaluación, la población de protozoarios presentes en el líquido ruminal no cambió con el tiempo de muestreo ( $P > 0.05$ ; 78.35 vs. 89.33; *prepandrium* y *pospandrium* respectivamente).

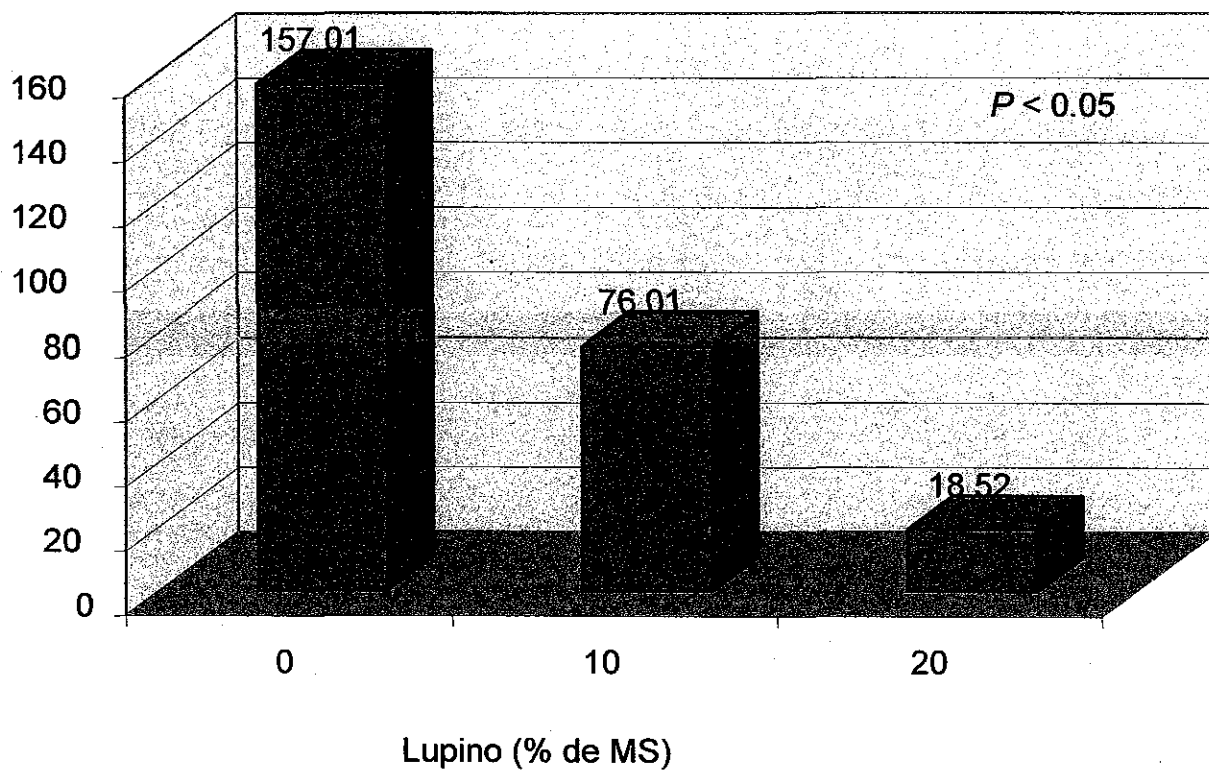
Cuando se adicionó el forraje de lupino (porcentaje de la materia seca) al alimento de los animales, se observó una fuerte disminución en la cantidad de protozoarios totales en el líquido ruminal ( $P < 0.05$ ; Gráfica 2). Siendo con el nivel más alto de la inclusión de forraje de lupino con el que se observó la menor cantidad de protozoarios en el líquido ruminal. Dicho fenómeno muestra la posibilidad de cambios en la población microbiana con el empleo del forraje de *Lupinus* en el alimento, sugiriendo la presencia de factores que eliminan o disminuyen la tasa de renovación de dichos microorganismos del rumen.

Varios autores (Navas, 1992, 1993; Ku Vera 2005) han reportado diferentes niveles de defaunación cuando se emplea forraje de leguminosas arbustivas o arbustos en la alimentación del rumiante, siendo generalmente un fenómeno reversible el efecto encontrado por los investigadores. Los mismos reportan un posible efecto de los factores antinutricionales contenidos como los taninos sobre todo en el follaje de las leguminosas como causante de la defaunación del líquido ruminal.

Gráfica 1. Protozoos ( $\times 10^3$ ) en líquido ruminal.



Gráfica 2. Cantidad de protozoos ( $\times 10^3$ ) en rumen.



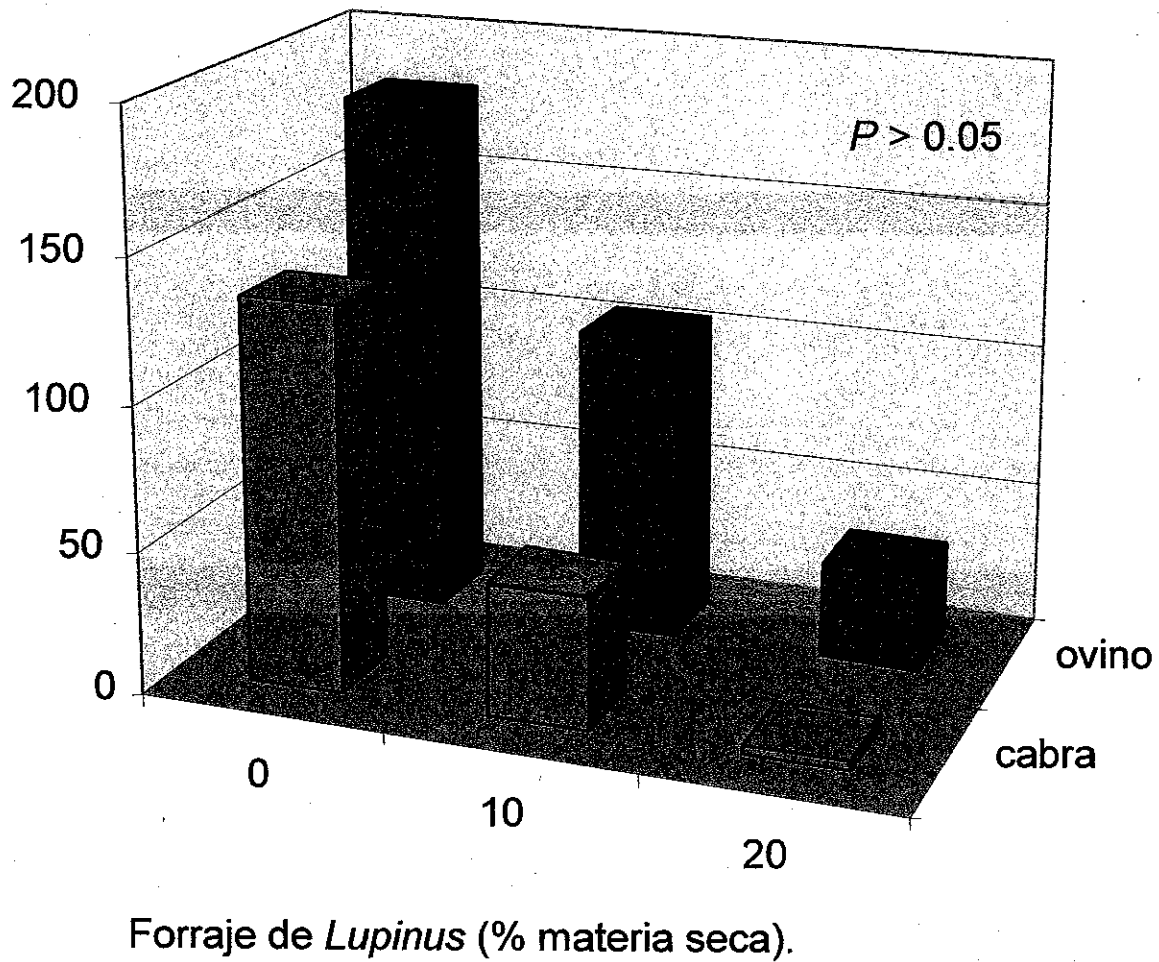
Por otro lado, Ku Vera (2005) reportó una mejora de hasta 10% en la digestibilidad de la materia seca cuando se incluía en la ración del rumiante henificado de leguminosas arbustivas. Lo cual pudiera estar relacionado directamente con la eliminación de protozoarios y la predominancia de bacterias fibrolíticas, mejorando la productividad como los mencionan algunos autores (Perez *et al.*, 1995).

En el presente estudio cuando se considero la interacción que pudiera existir entre el nivel de inclusión de forraje de lupino al alimento y la especie animal que la consume, no se encontró un efecto significativo, aunque la tendencia fue similar, disminución con el nivel de inclusión del mismo ( $P > 0.05$ ; Gráfica 3) en la ración. El fenómeno observado en el presente estudio pone de manifiesto el posible efecto positivo que puede tener el emplear el forraje de lupino en la alimentación de pequeños rumiantes que son explotados en sistemas extensivos.

Dentro de los beneficios de los sistemas productivos donde se emplean la leguminosas arbustivas y arbustos se encuentra probablemente el mejoramiento en el uso de los componentes proteicos de la planta al limitar el desarrollo de protozoarios. Navas (1993) sugiere que el incluir follaje de leguminosas por su contenido de factores anti-protozoarios debe mejorar la utilización a nivel ruminal de las paredes celulares del alimento que recibe el animal.

Sin embargo, resta a evaluar la aseveración antes mencionada dado que en algunos autores el efecto de la defaunación por follaje o de manera química no ha mostrado un efecto claro en la digestibilidad de los componentes estructurales de los ingredientes del alimento en las especies animales que potencialmente consumiran la leguminosa.

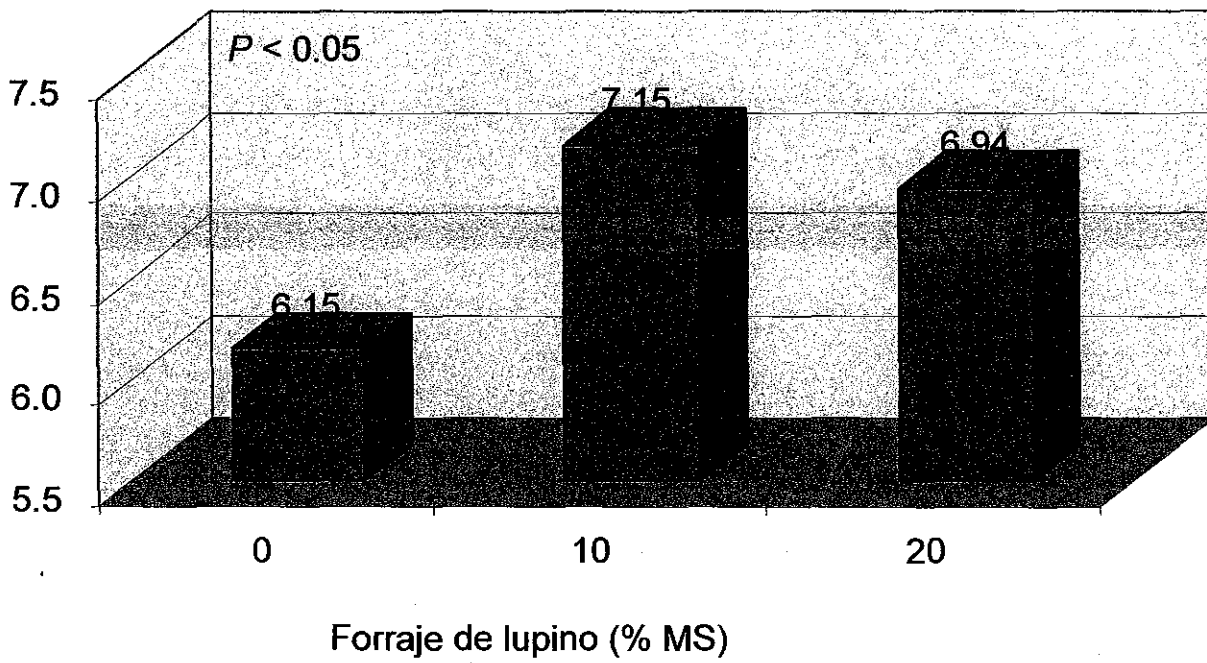
Gráfica 3. Interacción del animal con el nivel de forraje de lupino.



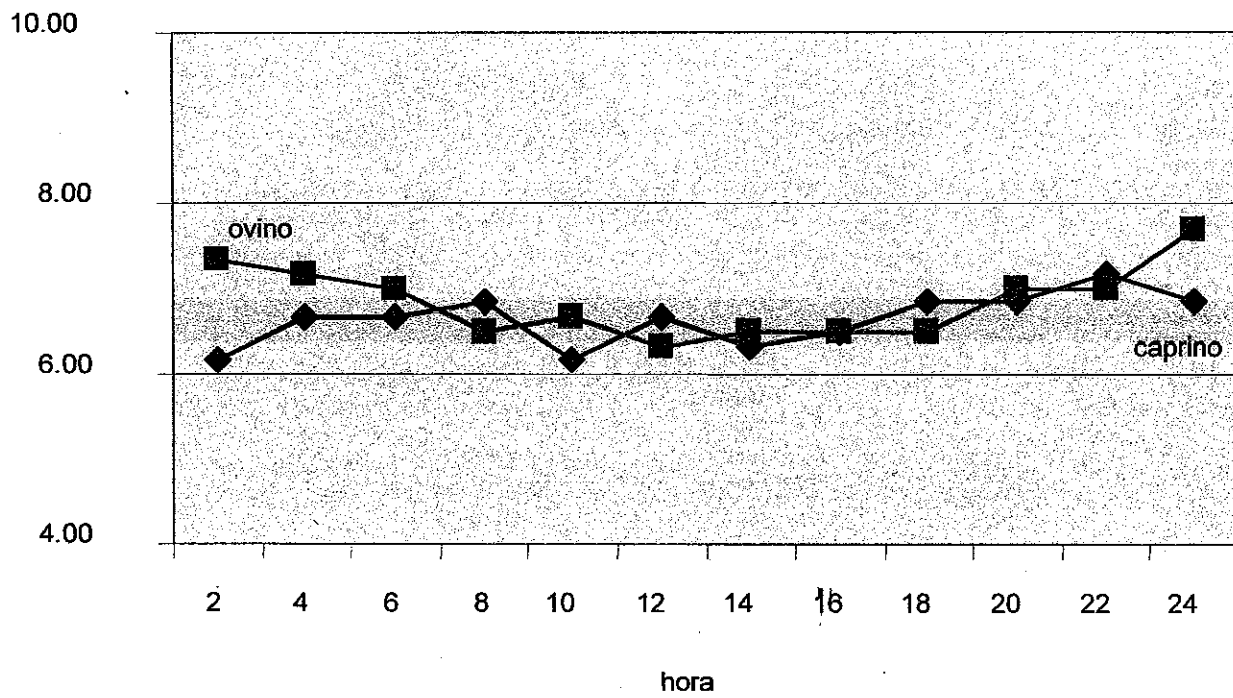
El pH del líquido ruminal de los animales que recibieron forraje de lupino varió con el nivel del mismo (Gráfica 4;  $P < 0.05$ ), dicho parámetro se incrementó cuando el forraje de lupino estuvo presente en el alimento ofrecido. Lo anterior pudiera ser el reflejo de la forma en que se encuentra el nitrógeno en el ingrediente, ya que el reprove de proteína cruda no muestra la forma química del mismo.

Además se observaron variaciones similares entre las especies animales utilizadas en el presente estudio (Gráfica 5). Considerando lo anterior se puede pensar en el aumento de la cantidad de compuestos que afectan el metabolismo de nitrógeno por parte de la microflora ruminal y su subsecuente producto metabólico sea el amoníaco, lo que incrementó el pH del líquido ruminal de las especies animales utilizadas.

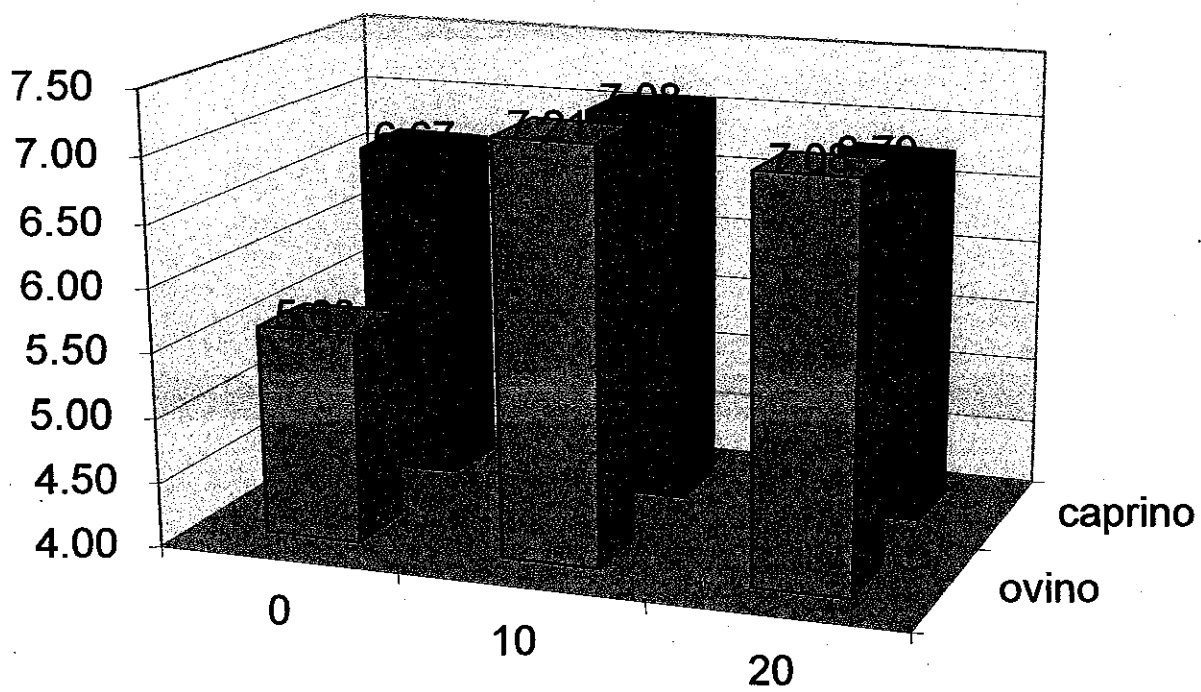
Gráfica 4. Cambios del pH ruminal con forraje de *Lupinus*.



Gráfica 5. Variación del pH ruminal por especie animal.



Gráfica 6. Variación del pH ruminal.



Nivel de forraje de lupino (% de MS).

## **CONCLUSIÓN.**

Incrementar el nivel de inclusión del forraje de arbustiva del genero *Lupinus* reduce la cantidad de protozoarios en el líquido ruminal en pequeños rumiantes como el ovino y el caprino.



**LITERATURA CONSULTADA.**

- Ankrah, P., Loerch, S.C., Kampman, K.A. y B.A. Dehority. 1990. Effects of defaunation on *in situ* dry matter and nitrogen disappearance in steers and growth of lambs. J. Anim. Sci. 68:3330-3336.
- Balbuena, O. 2003. Manipulación de la función ruminal para incrementar la producción ruminal. Argentina. INTA, EEA. 1:10.
- Bengaly, K. 1996. The effect on intake and digestion of maize stover when supplemented with urea and / or Lablab (*Lablab purpureus*) hay and gives to native cattle in Southern Mali. MSc. Thesis. Univ. Aberdeen, U.k.
- Bird, S.H. 1989. Production from ciliate-free ruminants. En: Nolan, J.V., Leng, R.A. y D.I. Demeyer (Eds.). The role of protozoa and fungi in ruminant digestion. Pennambul books, Armidale NSW 2351, Australia. Pág. 233-246.
- Bird, S.H. y M. Secombe. 1998. A comparative study of faunated lambs and lambs reared from birth free of ciliated protozoa. Proc. Australian Soc. Anim. Prod. 22:391-395.
- Bird, S.H., Romulo B. y R.A. Leng. 1994. Effects of lucerne supplementation and defaunation on feed intake, digestibility, N retention and productivity of sheep fed straw based diets. Anim. Feed Sci. Technol. 45:119-129.
- Bird, S.H. y R.A. Leng. 1985. Productivity responses to eliminating protozoa from the rumen of sheep. Rev. Rural Sci. 6:109-115.
- Bocquier, F. 1994. Effet de la supplémentation de méthionine protégée sur la production et la composition du lait de brebis Lacaune. Proc. Renc. Rech. Ruminants. Pág. 101-104.

- Broudiscou, L., Pochet S. y C. Poncet. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49:189-202.
- Broudiscou, L., van Nevel C.J. y D.I. Demeyer. 1990. Effect of soya oil hydrolysate on rumen digestion in defaunated and refaunated sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30:51-67.
- Chandramoni, A., Tiwari C. M., Haque M., Lal, M., Jadhao S.B. y M.Y. Khan. 2002. Energy balance in faunated and defaunated sheep on a ratio high in concentrate to roughage (good quality) ratio. *Pakistan J. Nutr.* 1:31-33.
- Chaudhary, L.C. y A. Srivastava. 1995. Performance of growing Murrah buffalo calves as affected by treatment with Manoxol and the presence of ciliate protozoa in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51:281-286.
- Chaudhary, L.C. y A. Srivastava. 1996. Digestion of starch and nitrogen in different part of the alimentary canal of defaunated murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 9:667-670.
- Chaudhary, L.C., A. Srivastava y K.K. Singh. 1995. Rumen fermentation pattern and digestion of structural carbohydrates in buffalo (*Bubalus bubalis*) calves as affected by ciliate protozoa. *Anim. Feed Sci. Technol.* 56:111-117.
- Chaudhary, L.C., Kamra D.N., Agrawal N., Singh R. y N.N. Pathak. 1994. Effect of defaunation on enzyme profile and degradability of oat hay in buffalo calf rumen. *Indian J. Microbiol.* 35:103-107.

- Chaudhary, U.B., Nawab S., Ogra, J.L. y S.B.N. Rao. 1998. Influence of eliminating rumen ciliates on growth, nutrient intake, its utilization, and rumen fermentation pattern in goats fed straw-based diet. *Indian J. Anim. Sci.* 68:1274-1276.
- Coleman, G.S. 1988. The importance of rumen ciliate protozoa in the growth and metabolism of the host ruminant. *Int. J. Anim. Sci.* 3:75-95.
- Cottle, D.J. 1988. Effects of defaunation of the rumen and supplementation with amino acids on the wool production of housed Saxon Merinos. 1. Lupins and extruded lupins. *Austr. J. Exp. Agric.* 28:173-178.
- De Smet, S., Demeyer D.I. y C.J. Van Nevel. 1992. Effect of defaunation and hay : concentrate ratio on fermentation, fibre digestion and passage in the rumen of sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37:333-344.
- Dehority, B.A. 1993. Microbial ecology of cell wall fermentation. En: Jung H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.). *Forage cell wall structure and digestibility.* Madison, Wisconsin. Pág. 425-453.
- Demeyer, D.I. 1988. Interdépendance des effets de la défaunation sur l'activité muralytique, le volume et la vitesse de renouvellement du contenu du rumen. Résultats préliminaires et hypothèse. *Reprod. Nutr. Dev.* 28:161-162.
- Demeyer, D.I. y C.J. van Nevel. 1986. Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:161-179.
- Fahmy, W.G. y M.R. Murphy. 1995. Effect of defaunation and amino acid supplementation on growth and amino acid balance in growing sheep. *Ann. Zootec.* 44 (Suppl. 34):364.

- Fonty, G. y E. Forano. 1999. Écologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahiers Agriculture*. 8:21-35.
- Fonty, G. y K.N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fibre digestion. En: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.). *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, San Diego, USA. Pág. 655-679.
- Fonty, G., Jouany J.P., Forano E. y Ph. Gouet. 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. En: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (Ed.). *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Paris, France. Pág. 299-348.
- Forano, E., Broussolle V. y R. Durand. 1996. Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Ann. Zootech.* 45:(Suppl 1):345.
- Fujihara, T., Oka N., Todoroki M. y K. Nakamura. 1994. The effect of rumen protozoa on the urinary excretion of purine derivatives in goats. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3:234.
- Habib, G., Nolan J.V. y R.A. Leng. 1989. Fermentative digestion and metabolism in faunated or fauna-free lambs fed roughage-based diets. In: Nolan, J.V., Leng R.A., Demeyer D.I. (Eds.). *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul books, Armidale, Australia. Pág. 323-326.
- Han, C.Y., Lu D.X., Hu M. y Z.L. Tan. 1999. Influence of controlling Protozoa on the degradation and utilization of dietary fibre and protein in the rumen and nitrogenous flow entering the duodenum of sheep. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 12:1241-1245.

- Hsu, J.T., Fahey G.C., Merchen N.R. y R.I. Mackie. 1991. Manipulation of defaunation and various nitrogen supplementation regimens on microbial numbers and activity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 69:1279-1289.
- Hegarty, R.S., Nolan J.V. y R.A. Leng. 1991. Sulphur availability and microbial fermentation in the fauna-free rumen. *Archiv. Anim. Nutr.* 41:725-736.
- Hill, G.D. 1977. The composition and nutritive value of lupin seed. *Nutr. Abstr. Rev.* 47:511-519.
- Hristov, A.N., McAllister T.A., Van Herk F.H., Cheng K.J., Newbold C.J. y P.R. Cheek. 1999. Effect of *yucca Schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77:2554-2563.
- Hsu, J.T., Fahey G.C., Merchen N.R. y R.I. Mackie. 1991. Manipulation of nitrogen digestion by sheep using defaunation and various nitrogen supplementation regimens. *J. Anim. Sci.* 69:1290-1299.
- Ivan, M., Charmley L.L., Neill L. y M. Hidiroglou. 1991. Metabolic changes in the rumen following protozoal inoculation of fauna-free sheep fed a corn silage diet supplemented with casein or soybean meal. *Ann. Rech. Vét.* 22:227-238.
- Ivan, M., Dayrell S., Mahadevan S. y M. Hidiroglou. 1992. Effects of bentonite on wool growth and nitrogen metabolism in fauna-free and faunated sheep. *J. Anim. Sci.* 70:3194-3202.
- Ivan, M., P.S. Mir, Z. Mir, T. Entz, M.L. He y T.A. McAllister. 2004. Effects of dietary sunflower sedes on rumen protozoa and growth of lambs. *Br. J. Nutr.* 92:303-310.

- Ivan, M., Neill L. y T. Entz. 2000. Ruminal fermentation and duodenal flow following progressive inoculations of fauna-free wethers with major individual species of ciliate protozoa or total fauna. *J. Anim. Sci.* 78:750-759.
- Jarillo Rodríguez, J. y L. Ramírez Avilés. 1997. Pastoreo intensivo y tradicional: Su influencia sobre el sistema suelo-planta-animal en el sureste de México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.* 5 (Supl. 1): 72-75.
- Jouany, J.P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilisation by ruminants. *J. Nutr.* 126:1335-1346S.
- Jouany, J.P. y C. Martin. 1997. Effect of protozoa in plant cell wall and starch digestion in the rumen. En: Onodera, R. (Ed.). *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants.* Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/S. Karger, Basel. Pág. 11-24.
- Jouany, J.P. y K. Ushida. 1998. The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 12:113-128.
- Jouany, J.P., Demeyer D.I. y J. Grain. 1988. Effect of defaunating the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 21:229-265.
- Jouany, J.P., Mathieu F., Sénaud J., Bohatier J., Bertin G. y M. Mercier. 1998. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:401-416.
- Jouany, J.P., Sénaud J., Toillon S., Ben Salah M., Lassalas B., Bohatier J. y G. Prensier. 1995. Effect of ruminal inoculation of *Isotricha* alone or a mixed B-type fauna in a defaunated rumen on the digestion of a hay-maize diet (70:30) in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 35:11-25.

- Koenig, K.M., Newbold C.J., McIntosh F.M. y L.M. Rode. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78:2431-2445.
- Kumar, R. y S. Vaithyanathan. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30:21- 38.
- Ku Vera, J.C., L. Ramírez Avilés, G. Jiménez Ferrer, J.A. Alayón y L. Ramírez Cancino. 2005. Árboles y arbustos para la producción animal en el trópico Mexicano. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica" Consultado el 10 de enero 2006.
- Ley, C.A., Cobos P.M., Hernández S.D., Ortega C.M. y G.M. Crosby. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad defaunante de fármacos y plantas. Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría. IREGEP, Ganadería. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Mackie, R.I. y B.A. White. 1990. Rumen microbial ecology and nutrition. Symp. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73:2971-2995.
- Maguy, E. 2002. Effets de la défaunation de ruminants sur les performances de production, en fonction de la ration ingérée. Étude des variations de la protéosynthèse et de la cellulolyse microbienne ruminale. Tesis doctorado. Institut National Agronomique, Paris-Grignon (INA-PG). Francia.
- Martin, C. y B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67:409-415.

- McVaugh, D. 1987. Flora Novogaliciana, V. *leguminosae*. A descriptive account of the vascular plants of western Mexico. The University of Michigan press. Ed. Ann Arbor. USA. Pág. 567-569.
- Michalowski, T. 1990. the synthesis and turnover of the cellulose matter of ciliates in the rumen. *Acta Protozool.* 29:47-72.
- Michalowski, T., K. Rybicka, K. Wereszka y A. Kasperowicz. 2001. Ability of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for *in vitro* growth. *Acta Protozool.* 40:203-210.
- Minitab. 1998. User's Guide 2: Data Analysis and Quality Tools. Minitab Inc. State College.
- Muzquiz, E.M. 1988. Factores antinutritivos y toxicos que afectan a la utilización de las semillas del *Lupinus hispanicus* Boiss. et Reut. Para su uso alimentario. Tesis Doctorado. Universidad Complutense. Madrid, España.
- Nagaraja, T.G., Godfrey S.I., Winslow S.W., Rowe J.B. y K.E. Kemp. 1995. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in faunated or ciliate-free sheep overfed with barley grain. *Small Ruminant Res.* 17:1-8.
- Nagaraja, T.G., Towne G. y A.A. Beharka. 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed high grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2410-2414.
- Navas, C.A., Cortés C.J. y M.E. Gutiérrez. 1997. Efecto de la reducción de la población de protozoarios ciliados sobre el funcionamiento ruminal en ovinos alimentados con tamo de trigo. *Archivo Latinoam. Prod. Anim.* 5:98-101.



- Navas, A., MA. Laredo, A. Cuesta, H. Anzola y J.C. Leon. 1992. Evaluation of *Enterolobium cyclocarpus* as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Livest. Res. Rural Dev.* 4:312-315.
- Navas, A., M.A. Laredo, A. Cuesta, H. Anzola y J.C. Leon. 1993. Effect of supplementation with a tree legume forage on rumen function. *Livest. Res. Rural Dev.* 5:75-80.
- Nozière, P. y B. Michalet-Doreau. 1996. Validation of *in sacco* method : influence of sampling site, nylon bag or rumen contents, on fibrolytic activity of the solid-associated microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 57:203-210.
- Nozière, P., Besle J.M., Martin C. y B. Michalet-Doreau. 1996. Effect of barley supplement on microbial fibrolytic enzyme activities and cell wall degradation rate in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 72:235-242.
- Pérez, J.D., Zapata, G. y E. Sosa. 1995. Utilización del ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) como forraje en la alimentación de ovinos en crecimiento. *Agroforestería de las Américas.* 7:17-21.
- Topps, J.H. 1992. Potential, composition and use of legume shrubs and trees as fodders for livestock in the tropics. *J. Agric. Sci., Cambridge.* 118:1-8.
- Ramírez Cancino, L. y J.C. Ku Vera. 1997. Suplementación con follaje de árboles a ovinos alimentados con pasto taiwan: Consumo, digestión ruminal y suministro de nitrógeno microbiano al duodeno. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Veracruz. Veracruz, México. Pág. 111.

- Reyes Solorio, E. 2004. Producción de ganado ovino para carne en Jalisco: El modelo GGAVATT como estrategia de transferencia de tecnología. [www.funprojal.org.mx/proyectos/convocatoria2004/14-2004-2402.html](http://www.funprojal.org.mx/proyectos/convocatoria2004/14-2004-2402.html). consultada el 10/03/05.
- Ruiz, M.A. y J. Sotelo. 2001. Chemical composition, nutritive value and toxicology evaluation of Mexican wild lupins. *J. Agric. Food Chem.* 49:5336-5339.
- Rusell, J.B. y J.L. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science.* 292:1119-1122.
- Santra, A. y S.A. Karim. 2000. Growth performance of faunated and defaunated Malpura weaner lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:251-260.
- Sauvant, D. y J. van Milgen. 1995. Dynamics aspects of carbohydrate and protein breakdown and the associated microbial matter synthesis. *Proc. 8<sup>th</sup>. Int. Symp. Ruminant Physiol. (Ed.), Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction.* Delmer publishers, Albany, Germany. Pág. 71-91.
- Sodi, A.D., González M.R. y R.S. Martínez. 2004. Efectos de la defaunación sobre la fermentación. Universidad Nacional Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria, República Argentina. [http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/manejo del alimento/11-efectos defaunacion sobre la fermentacion.htm](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/11-efectos_defaunacion_sobre_la_fermentacion.htm), consultado el 11/10/05.
- Teferedenge, B. 2000. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 59:209-214.
- Ushida K. y J.P. Jouany. 1994. Fibre digesting capacities of 5 genera of rumen ciliates. *Proc. Nutr. Physiol.* 3:168-174.

- Ushida, K., Jouany J.P. y D.I. Demeyer. 1991. Effects of presence or absence of rumen protozoa on the efficiency of utilisation of concentrate and fibrous feeds. En: Tsuda, T., Sasaki, Y., Awashima, R. (Eds.). Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Tokyo. Pág. 625-654.
- Vermorel, M. y J.P. Jouany. 1989. Effects of rumen protozoa on energy utilisation by wethers of two diets based on ammonia treated straw supplemented or not with maize. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 2:475-476.
- Wallace. R.J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proc. Nutr. Soc. 63:621-629.
- Weimer, P.J., Waghorn G.C., Odt C.L. y D.R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82:122-134.
- Yang, C.M.J. y G.A. Varga. 1993. The effects of continuous ruminal dosing with dioctyl sodium sulphosuccinate on ruminal and metabolic characteristics of lactating Holstein cows. Br. J. Nutr. 69:397-408.
- Yang, W.Z. 1992. Étude de la cinétique de la colonisation des aliments dans le rumen des moutons. Conséquence sur la compartimentation de la biomasse et de la dynamique à la sortie du rumen dans le cas de différents types de rations. PhD. Tesis. Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand II, France.
- Zamora-Natera, J.F. 2005. Alcaloides en *Lupinus exaltatus* Zucc. (*Fabaceae*): contenido, composición y actividad biológica. Tesis doctorado. Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Campus Montecillo. Edo. de México.