

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA**



**EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
TANINOS SOBRE LA FLORA MICROBIANA RUMINAL
Y EN LA DEGRADABILIDAD *IN VITRO* DEL
FORRAJE DE ALFALFA**

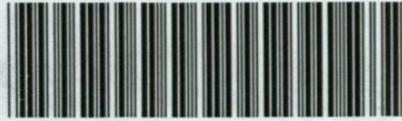
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCION ANIMAL**

**PRESENTA:
HORACIO SOLANO VAZQUEZ**

MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO 1997

TM
SB193
S6
c.1



1080072016

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TANINOS
LA FLORA MICROBIANA RUMINAL Y EN LA DEGRADABILIDAD

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

Que como requisito parcial para optar al grado de
maestro en ciencias en producción animal



Comité particular

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
TANINOS SOBRE LA FLORA MICROBIANA RUMINAL
Y EN LA DEGRADABILIDAD *IN VITRO* DEL
FORRAJE DE ALFALFA

Asesor Principal

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCION ANIMAL

Dr. M. Sc. Diego Manuel Barragán
Coasesor

Ph.D. Erasmo Gutiérrez Ornelas
Coasesor

PRESENTA:

HORACIO SOLANO VAZQUEZ



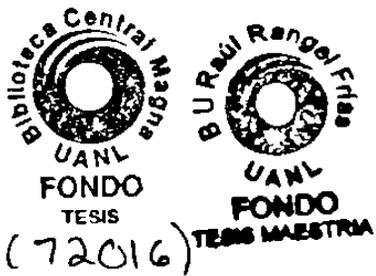
de 1997

MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO 1997

5364

TM
SB193
S6



**EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TANINOS SOBRE
LA FLORA MICROBIANA RUMINAL Y EN LA DEGRADABILIDAD *IN*
VITRO DEL FORRAJE DE ALFALFA**

Que como requisito parcial para optar al grado de
maestro en ciencias en producción animal

Presenta

Horacio Solano Vázquez

Comité particular

;



Ph.D. Rigoberto González González
Asesor Principal



Dr. sc. agr. Hugo Bernal Barragán
Coasesor



Ph.D. Erasmo Gutiérrez Ornelas
Coasesor

Marín Nuevo León

Julio de 1997

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme permitido la realización y el financiamiento de mis estudios de postgrado.

Al Ph.D. Rigoberto González González por brindarme su amistad y su tiempo en la asesoría, realización y terminación de este trabajo.

Al Dr.Sci.Agr. Hugo Bernal Barragán por las facilidades otorgadas en el laboratorio de bromatología , así como en la enseñanza de las diferentes técnicas de investigación.

Al Ph.D. Erasmo Gutiérrez Ornelas por compartir sus conocimiento y por su contribución en las revisiones realizadas en el presente trabajo.

Al Dr.Sci.Agr. Mario A. Ramírez de la Garza por su ayuda en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

A la división de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía “**Graduados**”, por permitirme realizar mis estudios de maestría en su plantel, así como a su personal administrativo.

A todos los doctores y maestros que me brindaron su amistad y conocimientos a lo largo de dos años de estudio, *gracias*.

Dedicatorias.

A Dios:

Por darme la gracia de estar vivo y por permitirme la oportunidad de poder disfrutar de todas sus bondades.

A mis Padres:

Dr. Cesar Héctor Solano Chávez, por su apoyo a lo largo no solo de mi carrera sino también de mi vida, así como por su constantes muestras de cariño. Gracias por todo.

Sra. Socorro Vázquez de Solano (†) por haberme traído a este mundo y por todo el amor y cariño que de ella recibí.

A mi Familia:

De nueva cuenta a todos los que conforman el “Clan Solano”: a mis Hermanos Gloria Solano, Patricia Solano, Socorro Solano, Nancy Solano, José Solano, Cesar Solano, Carolina Solano, Oscar Solano. A mis cuñados: Hugo, José Luis, Raúl, Horacio, Raquel. A mis sobrinos: Hugo, Joel, Pepe, Carlos, Patricia, Raúl, Tania, Elidia, Santiago, Alan, y a los que faltan.

A mi esposa Cindy:

Por ser mas que una esposa, amiga, y confidente, ya que es una de las personas mas importantes que forman parte de mi vida, y por ser una compañera incondicional que siempre me ha dado toda su comprensión, cariño, amor y por todo el apoyo que me a dado a lo largo de mis estudios de maestría .

A mis compañeros y amigos de la maestría generación: 94 -96.:

MVZ. Mc. David Alonso Villarreal C., Ing. Mc. Ramón Macias, MVZ. Mc. Moisés Franco Molina, MVZ. Mc Héctor Fimbres Durazo, MVZ. Francisco de Paula Gutiérrez, MVZ. Mc. Geraldina Guerrero, a todos ellos gracias por compartir una etapa importante en nuestra formación académica.

A todos los compañeros y amigos de Agronomía:

Que me brindaron su amistad, y que gracias a ellos el camino fue mas agradable.

A mis Compadres:

MVZ. Dolores y Alberto, por depositar en mi su confianza y su amistad, a mis **ahijadas** Karol y Karen a las que quiero mucho.

A mi comadre MVZ. Laura Patricia Gallegos D. y a mi nuevo **ahijado** Armandito

A mis compañeros de Veterinaria:

MVZ.Mc. Rogelio Alejandro y MVZ. Elizabeth Nájera

MVZ. René Roberto Neira M.

MVZ. Betariz Alejandra López L.

MVZ. Marialuiza Hinojoza Hernández

MVZ. Gerardo Muñoz Garza

“A los caídos en el transcurso de sus estudios”

Índice

Tema	Página
Aprobación de tesis	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatorias.	iv
Índice de tablas y gráficas.	vi
I. Introducción.	1
II. Literatura revisada.	4
2.1. Función de los taninos.....	4
2.2. Estructura química.....	5
2.2.1. Taninos hidrosolubles.....	5
2.2.2. Taninos condensados	6
2.3. Localización de los taninos.	8
2.4. Efectos de los taninos en el valor nutritivo del forraje de leguminosas.....	9
2.4.1. Efectos negativos.	9
2.4.1.1. Palatabilidad.	9
2.4.1.2. Digestión.	10
2.4.2. Efectos positivos.	12
2.5. Mecanismos contra los taninos.....	14
2.6. Efecto de los taninos en la alimentación de no rumiantes.....	15
2.6.1. Cerdos.	16
2.6.2. Pollos.	17
2.7. Efecto de los taninos en el análisis de F.D.N.	18
2.8. Efecto de los taninos en la digestibilidad <i>in vitro</i>	19

2.9. Microbiología del rumen.....	21
2.9.1. Microclima ruminal.	21
2.9.2. Microorganismos ruminales.....	22
2.10. Efecto de los taninos en la flora ruminal.....	22
III. Materiales y métodos.	25
3.1. Localización del área de estudio.....	25
3.2. Desarrollo del experimento.....	25
3.3. Técnica de Vainillina-HCL.....	26
3.4. Digestibilidad <i>in vitro</i>	27
3.5. Conteo de microorganismos.....	28
3.6. Diseño estadístico.....	29
IV. Resultados.....	30
V. Discusiones.	40
VI. Resumen.	42
Bibliografía.....	44
Apendice.....	52

Indice de cuadros del apendice

Cuadro		Página
1	Análisis de varianza hora 4.....	54
2	Comparación de medias hora 4.....	54
3	Análisis de varianza hora 8.....	54
4	Comparación de medias hora 8.....	53
5	Análisis de varianza hora 16.....	53
6	Comparación de medias hora 16.....	53
7	Análisis de varianza hora 24.....	54
8	Comparación de medias hora 24.....	54
9	Análisis de varianza hora 32.....	54
10	Comparación de medias hora 32.....	55
11	Análisis de varianza hora 40.....	55
12	Comparación de medias hora 40.....	55
13	Análisis de varianza hora 48.....	56
14	Comparación de medias hora 48.....	56
15	Análisis de digestibilidad <i>in vitro</i>	56
16	Comparación de medias de la digestibilidad <i>in vitro</i>	57

Indice de figuras.

	Pagina
Figura 1 Estructura quimica de taninos condensados e hidrosolubles.....	7
Cuadro 1 Tratamientos.....	26
Figura 1 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 4 de digestion.....	30
Figura 2 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 8 de digestion.....	31
Figura 3 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 16 de digestion.....	32
Figura 4 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 24 de digestion.....	33
Figura 5 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 32 de digestion.....	34
Figura 6 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 40 de digestion.....	35
Figura 7 Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 48 de digestion.....	36
Figura 8 Digestibilidad <i>in vitro</i> del forraje de alfalfa con diferentes concentraciones de taninos.....	38
Figura 9 Efecto de diferentes concentraciones de taninos en diferentes tiempos de muestreo, sobre el crecimiento de las bacterias ruminales.....	39

I. INTRODUCCION.

Uno de los factores principales que limita el pastoreo y semi-pastoreo de pequeños rumiantes, e incluso el de bovinos en regiones áridas y semiáridas del país, es el del aprovechamiento adecuado de los nutrientes obtenidos de las plantas que conforman su dieta alimenticia, que incluye principalmente arbustos y árboles de talla pequeña. Estas plantas producen forraje durante la mayor parte del año, aunque su valor nutritivo puede ser variable, dependiendo del clima y precipitación.

Las plantas utilizadas por los rumiantes en pastoreo frecuentemente poseen concentraciones minerales y proteicas lo suficiente como para satisfacer las demandas nutricionales de bovinos, cabras y borregos en pastoreo (Neira, 1993).

Sin embargo, algunas de las plantas que conforman su dieta, poseen concentraciones de compuestos secundarios, que juegan un papel importante en la protección de la planta contra el ataque de hongos y bacterias además de insectos y animales herbívoros, a estos compuestos se les llama factores antinutricionales y entre estos se encuentran las lecitinas, los taninos, y compuestos inhibidores de proteasas (Ming-Cheng, et al., 1994).

Los taninos se pueden encontrar en las plantas en dos formas principales, hidrosolubles (TH), y condensados (TC), la principal importancia de los taninos es la capacidad que tienen de formar complejos estables con las proteínas, precipitándolas y protegiéndolas de la digestión y del ataque de la flora microbial del rumen y enzimática, haciendo a la proteína indigestible.

Lo anterior afecta tanto el consumo de la materia seca, como el adecuado desdoblamiento de carbohidratos, proteína y la adecuada utilización de energía en algunas especies de animales domésticos entre las que se incluyen caprinos, ovinos, conejos, aves de corral, ratas y venados (Vaithiyanathan y Kumar, 1993).

En un estudio realizado en el Estado de Nuevo León se encontró que plantas como el Chaparro prieto, Guajillo y Junco, poseen concentraciones de taninos que pudieran afectar tanto el consumo como el adecuado aprovechamiento de proteína, así como el de la utilización de la fibra por acción de las bacterias ruminales (Solano, 1994).

Posibles ventajas de los taninos son sus efectos positivos como es la prevención de timpanismos, al evitar una sobrefermentación del forraje por parte de las bacterias del rumen, y de evitar una excesiva degradación de la proteína en el rumen.

Lo anterior puede ser de importancia nutricional, ya que al estar la proteína protegida y resistir la degradación ruminal, aumenta la cantidad de proteína de sobrepaso ya que la proteína ligada al tanino resiste el ataque microbial y enzimático del rumen e incluso el pH del abomaso por lo que una mayor cantidad de proteína de sobrepaso llega al intestino delgado, lugar donde puede ser mejor aprovechada por el animal.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar el efecto de diferentes concentraciones de taninos sobre el crecimiento de la flora microbiana ruminal y sobre la digestibilidad *in vitro* del forraje de alfalfa.

Ademas se trato de identificar el tipo de microorganismo que pueda degradar el complejo tanino-proteína.

El objetivo anterior, surgió de la hipótesis de que la flora microbiana del rumen no puede romper el complejo tanino-proteína. Además, de que la adición de taninos al forraje de alfalfa disminuye su digestibilidad, y afecta de manera negativa el crecimiento de las bacterias ruminales.

II. LITERATURA REVISADA

2.1. Función de los taninos.

El crecimiento de las plantas en un medio ambiente en el cual están compitiendo continuamente por espacio y nutrientes han hecho que algunas de ellas desarrollen sistemas de defensa para evitar ser depredadas, tales sistemas son generalmente pasivos y pueden ser clasificados de dos formas: físicos, como son la presencia de espinas y hojas correosas, o los químicos (Russell y Michael, 1992).

Entre los mecanismos químicos se encuentran los inhibidores de la tripsina, hemaglutininas, fitatos y taninos., estos últimos al igual que otros productos, forman un grupo importante de ingredientes secundarios de las plantas, los cuales generalmente están relacionados con los mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de hongos patógenos, bacterias, virus, insectos y herbívoros.

Estos mecanismos, además afectan de manera negativa la adecuada utilización de las plantas por parte de los rumiantes, ya que algunas plantas como las leguminosas, que poseen un contenido relativamente alto de proteína, en algunas ocasiones su calidad nutritiva puede bajar debido a la presencia de taninos (Ming-Cheng et al., 1994; Solano, 1994).

2.2. Estructura química.

Los taninos son compuestos químicos formados por fenoles solubles en agua con un peso molecular que varía entre los 500 y los 3,000, además de poseer la propiedad de precipitar ciertos componentes de las plantas tales como alcaloides, carbohidratos y principalmente proteínas, formando con estas últimas un complejo estable (Leinmuller et al., 1991; Vaithyanathan y Kumar, 1993).

Sin embargo, muchos fenoles solubles con una estructura análoga y propiedades químicas similares a la de los taninos no precipitan proteínas, además, existen algunos fenoles con alto peso molecular y con una estructura similar a la de algunos taninos pero que no son solubles en agua (Reed, 1995).

El efecto de los taninos en los herbívoros es difícil de predecir por la diversidad química de los taninos y de la fisiología animal, esto debido a que los polifenoles (Taninos) no constituyen un grupo químico unificado, y poseen además una gran variedad de estructuras moleculares; aunque por lo general se dividen en dos grupos principales, los cuales están conformados por los taninos hidrolizables (TH) y por los taninos condensados (TC) o proanthocyanidinas (Bryant et al., 1992).

2. 2. 1. Taninos hidrosolubles.

Los taninos hidrolizables (TH) son polímeros de ácidos esterificados como el ácido gálico, ácido egálico, ácido fecarboxilioco fenolatado de ácido gallico (gallotanin) o de ácido hexaidroxydifenily (Figura 1), con una molécula central que generalmente está formada por un compuesto de carbohidrato como glucosa o un polifenol como la catequina. Estos compuestos pueden ser separados en sus

productos por hidrólisis, con ácidos o reacciones enzimáticas (Reed, 1995; Leinmuller et al., 1991).

Los TH son potencialmente tóxicos para los rumiantes ya que son degradados por los microorganismos del rumen y absorbidos en forma de pyrogallol, una toxina con efecto tanto hepatotóxico como nefrotóxico (Reed, 1995 ; Hagerman et al., 1992).

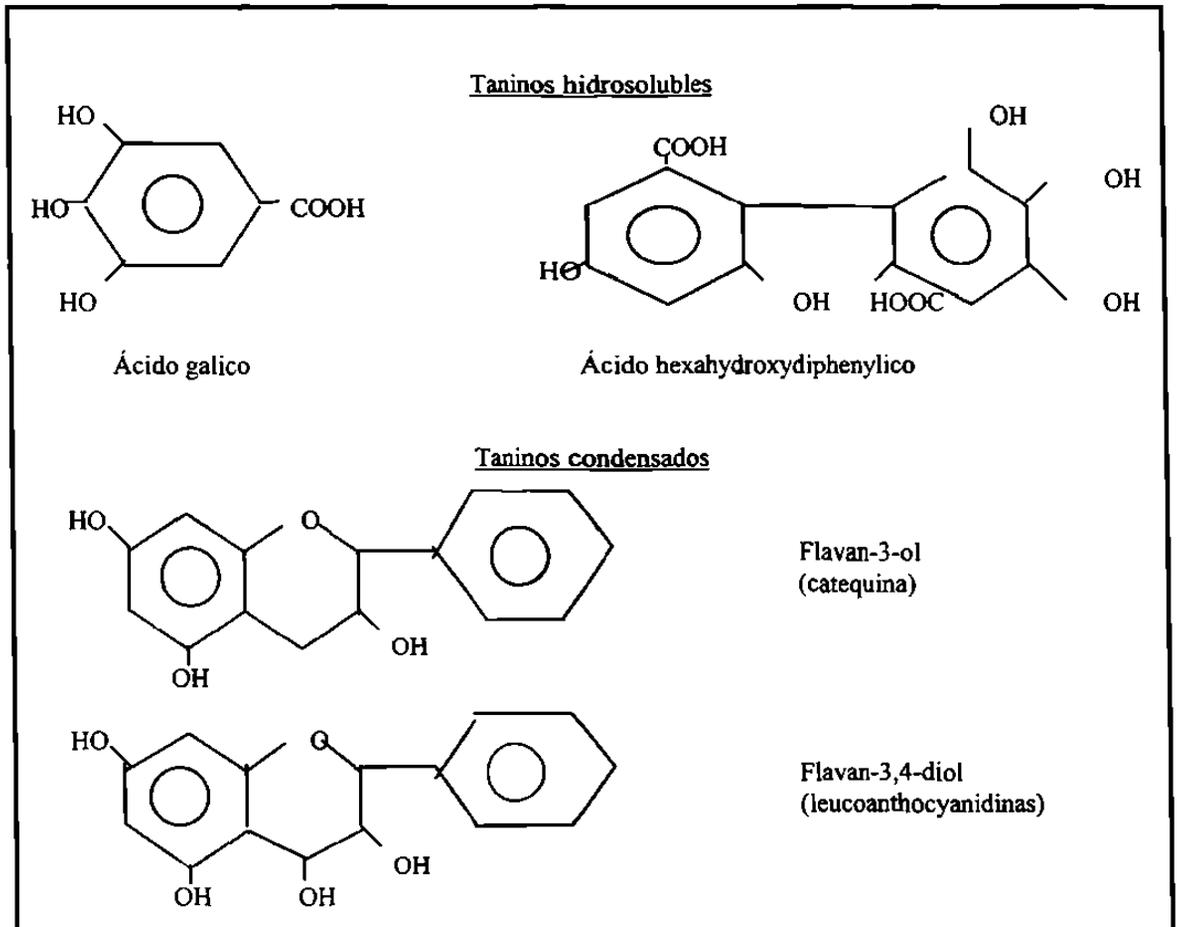
2. 2. 2. Taninos condensados.

Los taninos condensados (TC o proanthocyanidinas) son los que se encuentran en forma mas común en forrajes de leguminosas y están formadas por polímeros compuestos de flavan-3-ol (catequina) ó flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidinas), o sus derivados que están ligados por estructuras de doble carbono o carbono oxígeno (C-C o C-O-C) (Figura 1), por lo que no es susceptible a hidrólisis (Leinmuller et al., 1991).

Los TC no son considerados tóxicos debido a que no son absorbidos por el animal, pero están asociados con lesiones de la mucosa intestinal (Reed 1995; Leinmuller et al., 1991).

Como se mencionó anteriormente no todos los fenoles poseen la capacidad de precipitar proteínas, por lo que Horvath (1981; citado por Reed ; 1995) desarrollo una definición más amplia de taninos: “cualquier compuesto fenólico de suficiente peso molecular conteniendo suficiente hidroxilos fenólicos y otro grupo propio (ej. carboxilos) para formar un complejo fuerte con proteínas y otras macromoléculas bajo las condiciones medioambientales estudiadas”.

Figura 1.- Estructura química de taninos condensados e hidrosolubles.



La interrelación que existe entre el complejo tanino-proteína, depende tanto de la estructura de las proteínas como de los taninos, ya que diferentes proteínas poseen diferente afinidad a los taninos. La afinidad de los taninos hacia las proteínas depende principalmente de dos factores, su tamaño molecular y de la habilidad de las proteínas de reaccionar con grupos fenólicos (Vaithyanathan y Kumar, 1993).

2.3. Localización de los taninos.

Los taninos están presentes en la mayoría de los géneros de las plantas, como son arbustos, pastos y algunos forrajes de árboles, pero se encuentran principalmente en las leguminosas que son consumidas por los rumiantes.

Los taninos se pueden localizar tanto en la pared celular como dentro de la vacuola citoplasmática de algunas leguminosas, y esto a su vez se encuentran localizados en los dicotiledones, principalmente como taninos condensados, aunque en las hojas de numerosos árboles y arbustos se pueden encontrar de las dos formas (Hagerman et al., 1992; Mc Allister et al., 1994).

En las semillas de algunas plantas los TC se encuentran muy concentradas en la piel oscura de la semilla, por ejemplo, en el grano de sorgo, aproximadamente el 81.6 % de los TC se encuentran en la piel de la semilla y el 51.1 % en el pericarpio. Mientras que en las hojas de las plantas los taninos se localizan en la vacuola citoplasmática o en la pared celular (Leinmuller et al., 1991). El contenido de taninos en todo el *faba beans* es asociado con el color de la capa de la semilla, encontrándose rangos de 0.75 a 2 % (Van der Poel et al., 1992).

Además, la concentración de taninos en las plantas varía tanto con la especie, así como con la edad de la planta, ya que se ha encontrado que el contenido de taninos se incrementa consistentemente con la etapa de maduración de las plantas (Khazaal y Orskov, 1994b; Makkar y Singh, 1991). Además de variar también con la estación del año ya que en estaciones en las que el clima es adverso, la concentración de taninos tiende a aumentar en las plantas (Burns y Cope, 1974; Solano, 1994).

2. 4. Efecto de los taninos en los valores nutritivos del forraje de leguminosas.

El efecto de los taninos en el valor de la digestibilidad de varias arbustivas depende del tipo de tanino y especie animal , ya que los bovinos son los menos adaptados a alimentos con taninos que las cabras o los venados (Lou, 1994).

Los taninos en el forraje de leguminosa pueden tener efectos tanto negativos como positivos en el valor nutritivo del forraje, esto es debido principalmente a su efecto inhibitorio de la microflora ruminal. Los taninos en altas concentraciones reducen el consumo y la digestibilidad de proteína y carbohidratos, y el desarrollo de los animales (Reed et al., 1990). Sin embargo, los taninos en concentraciones que van de bajas a moderadas previenen timpanismos e incrementan el flujo de nitrógeno no amoniacal y aminoácidos esenciales del rumen.

2. 4. 1. Efectos negativos.

2. 4. 1. 1. Palatabilidad.

La selectividad del animal en pastoreo hacia una especie de planta en particular, esta determinado en parte genéticamente, y por experiencias anteriores o condicionamiento, tanto por el efecto fisiológico y nutricional del animal así como de la disponibilidad de forraje en el ambiente. Esto concuerda con teorías sobre la evolución de defensas químicas de las plantas, tales componentes como alcaloides y taninos tienden a provocar sensaciones ácidas (Mc Leod, 1974).

Los taninos pueden reducir el consumo de forraje de leguminosas por una disminución en la palatabilidad, esto debido a un efecto de “astringencia” o por un efecto negativo en la digestión.

La astringencia es la sensación que provocan los taninos causada por la formación de complejos entre los taninos y las glicoproteínas de la saliva. La astringencia puede producir un incremento en la salivación y disminuir por consiguiente la palatabilidad del forraje consumido.

Sin embargo, Waghorn (1994) citado por Reed (1995), sugiere que el cambio en la disminución ruminal y el porcentaje de digestión es más importante que la palatabilidad en la reducción del consumo de borregos alimentados con dietas puras de *Lotus pedunculatus* en comparación con borregos alimentados con *L. pedunculatus* junto con polietylen glycol (PEG).

Estudios en vivo han mostrado que la alimentación y el incremento en la proporción de alimentos ricos en taninos en las dietas de rumiantes pueden reducir significativamente tanto el consumo, como la digestibilidad de la proteína y materia seca (Kumar y Vaithiyanathan, 1990).

2. 4. 1. 2. Efecto de los taninos en la digestión.

En la digestión, los taninos afectan la tasa de ganancia para animales en crecimiento, ya que esta refleja el consumo total y la disponibilidad de los nutrientes en la dieta. Una baja tasa de crecimiento puede ser debido a un bajo consumo total de alimento por parte de los animales al ser alimentados con dietas

altas en taninos, esto fue observado en animales alimentados con vainas de *A. sieberiana* y hojas de *A. cyanophylla* (Reed et al., 1990).

La presencia de taninos en especies como *sainfoin* puede ser responsable por la baja degradabilidad de la proteína en el rumen, y reduce la digestión de N en el intestino delgado (Kraiem et al., 1990).

La diversidad de los efectos que poseen los taninos en la digestión, es debido en parte a las diferencias en la capacidad de los animales de manejar los taninos y a diferencias en la reactividad química de varios tipos de taninos. Recientes trabajos han demostrado que varios mecanismos son utilizados por animales para contrarrestar el efecto de los taninos ingeridos en la digestibilidad (Hagerman et al., 1992).

En el crecimiento y la tasa de ganancia para animales en desarrollo se refleja el consumo total y la disponibilidad de nutrientes en la dieta. Una menor tasa de crecimiento debido a una disminución del consumo total fue observado en animales alimentados con el fruto de *A. sieberiana* y *A. nilotica*, la cual contiene altos niveles de taninos (Tanner et al., 1990).

Un menor consumo total y una menor tasa de crecimiento fue además observado en animales alimentados con vainas de *A. siberiana* y hojas de *A. cyanophylla* (Reed et al., 1990). El efecto negativo de los taninos en la tasa de crecimiento fue causada por una combinación de la reducción del consumo y la baja digestibilidad verdadera de la proteína.

Esto también fue observado en carneros suplementados con *Sesbania sesban* y *Sesbania goetzei*, con niveles alto, mediano y bajo de taninos, en el que

se encontró que los coeficientes de digestión de lignina detergente ácida (LDA) y para los coeficientes de nitrógeno insoluble detergente neutro (NDIN) fueron negativos para los animales alimentados con los niveles altos. Además la tasa de ganancia de peso y el consumo de alimento disminuyó para los animales alimentados con el nivel alto (Wiegand et al., 1995).

El efecto negativo del contenido de taninos en los valores nutritivos de 24 variedades de frijol de soya (*Vacia faba*) puede ser esperado por una alta correlación negativa ($r = -0.94$) entre el contenido de taninos y la digestibilidad de la materia seca *in vitro* y de la digestibilidad de la proteína cruda *in vitro* ($r = 0.088$) (Garrido et al., 1991).

Además los TC pueden disminuir la absorción de aminoácidos esenciales cuando se encuentran presentes en altas concentraciones; Entre los aminoácidos más susceptibles están la metionina y la lisina, la disminución en la disponibilidad de la metionina puede incrementar la toxicidad de otros compuestos de las plantas tales como son los glucósidos cianogénicos, debido a que la metionina interviene en la destoxicación de la cianidina viametilación a tiocinato (Van Hoven, 1984).

Sin embargo, Bryant et al. (1992) menciona que la disminución del consumo voluntario de plantas que contienen taninos condensados no está necesariamente relacionado con la inhibición de la digestión.

2. 4. 2. Efectos positivos.

El efecto positivo “práctico” de los taninos, en la nutrición de los rumiantes está en base a la utilización de la proteína, ya que por lo general las proteínas de los forrajes tienen una excesiva proteólisis y/o desaminación que ocurre en el

rumen lo que limita la producción en los modernos sistemas de alimentación (Beever et al., 1989).

No obstante que el principal efecto de los taninos está en relación con la disminución de la digestibilidad de la proteína y la materia orgánica, estos mismos efectos pueden beneficiar al animal, ya que evitan la excesiva degradación de la proteína en el rumen por parte de la microflora al disminuir su actividad proteolítica, esto además previene la formación de espuma, evitando de ese modo la formación de timpanismos. Esto se ha demostrado cuando los taninos están presentes en la dieta tanto en forma natural o cuando se les agrega (Kraiem et al., 1990). Se a visto una reducción del 9.7 % en la producción de VFA y de un 11.7 % en la presión del gas, en forraje “pata de pájaro” trefoil con alta concentración de taninos (Chiquette et al., 1988).

Estudios realizados por Driedger y Hatfield (1972) demuestran que el rumen impone una limitación sobre el potencial metabólico de los rumiantes con respecto al suplemento cualitativo y cuantitativo de aminoácido, ya que se encontró que algunas proteínas son degradadas rápidamente por los microorganismos del rumen a amonia y que esta es absorbida y excretada como urea.

La incidencia de proteólisis de la proteína de la dieta puede ser disminuída por medio de protección de la proteína del ataque de la flora microbiana del rumen, esto se observó en alimentos que contenían niveles de taninos de 10 y 25% ya que después de 24 horas, disminuye significativamente la digestión de la proteína, además de reportar que disminuye la digestión de la tripsina (Chiquette, et al., 1988).

Además, los taninos no solo precipitan las proteínas con las que se encuentran en el forraje, también precipitan las proteínas de los alimentos al agregárseles, haciendo que estas proteínas no sean degradadas en el rumen, pero pueden ser hidrolizados en las condiciones ácidas del abomaso y pueden ser absorbidas por el intestino delgado (Kraiem et al, 1990); esto se comprobó en un estudio realizado por Harrison (1973; citado por Reed, 1995) en el cual a ovejas alimentadas con una dieta de *sainfoin* seco, se encontró que tuvieron un mayor flujo de aminoácidos esenciales hacia el duodeno comparado con ovejas alimentadas con alfalfa seca.

Además la conversión de nitrógeno proteico a nitrógeno no proteico puede afectar negativamente tanto el consumo y la utilización del nitrógeno del forraje por parte de los rumiantes (Albrecht y Muck, 1991).

2. 5. Mecanismos contra los taninos.

Aunque los animales generalmente no puedan degradar los taninos, algunos posibles mecanismos de defensa de los microorganismos contra el efecto negativo de los taninos es la secreción de polímeros ligados a taninos, síntesis de enzimas resistentes a taninos y por biodegradación de taninos.

Cambios en la producción de glicocalix de las bacterias ruminales en respuesta a los taninos de una variedad de trébol (pata de pájaro) fue observado por medio del microscopio electrónico, estos cambios pueden indicar que las bacterias producen glycoproteínas que son análogas a las glicoproteínas salivales que son secretadas por ratas en respuesta a los taninos en la dieta (Reed, 1995).

Por ejemplo, en algunos mamíferos tales como el venado, la saliva aparentemente protege de la formación del complejo tanino-proteína de otras proteínas que son más vulnerables a los taninos, caso que no ocurre con las cabras (Hagerman et al., 1992).

2.6. Efecto de los taninos en la alimentación de animales no rumiantes.

La industria de la alimentación animal depende de un adecuado suministro de ingredientes proteicos. Tradicionalmente tanto el frijol de soya como la harina de frijol de soya han servido como una importante fuente de proteína en alimentos para especies no-rumiantes. Otras semillas de leguminosas tales como field beans (*Vicia faba*) también puede ser una alternativa como fuente proteica en las dietas, ya que contiene niveles de proteína en el rango entre 200 y 320 g/kg de materia seca.

El efecto negativo de los taninos en la digestibilidad de las proteínas es más enfatizado, ya sea inhibiendo la actividad enzimática o incrementando la secreción de proteína endógena.(Jansman et al., 1993a).

La mayoría de las variedades de faba beans (*Vicia faba*) contienen concentraciones altas de taninos condensados (proanthocyanidins) y está establecido claramente el efecto en la reducción el valor nutritivo del mismo por los animales monogástricos y rumiantes. Los taninos además actúan en la inhibición de algunas enzimas digestivas tales como la tripsina y α - amylase. (Treviño y Centeno, 1992).

Las proteínas de semillas de frijol de soya (*Vicia Faba*) aparentemente pueden llenar satisfactoriamente los balances con respecto a los aminoácidos

esenciales, con la excepción de aminoácidos con azufre y particularmente metionina, sin embargo, el uso de frijol de soya en las dietas de monogástricos ha sido reportado que deprime la digestibilidad aparente de los compuestos nitrogenados, estos efectos de detrimento están atribuidos a la presencia de taninos condensados en la mayoría de las variedades más comunes de faba beans en crecimiento (Ortíz et al., 1993).

El alto contenido de taninos en especies de serica *Lespedeza cuneata* está asociada con un bajo consumo de forraje de serica por la fauna silvestre, además de que una fracción de los taninos inhibe la acción de enzimas como la celulasa y posiblemente de otras enzimas producidas por la flora microbiana (Cope et al., 1971).

Plantas como la alfalfa, poseen proteínas que son altamente degradadas en el rumen, y son pobremente utilizadas por rumiantes, ya que el incremento en la digestibilidad de la proteína en el rumen disminuye la digestibilidad intestinal (Makoni et al., 1995).

2. 6. 1. Cerdos.

La utilización de frijol de *faba* y algunas otras semillas de leguminosas para la formulación de raciones en la alimentación intensiva de monogástricos es una actividad común. Sin embargo, su uso es restringido debido a la presencia de factores antinutricionales (FAN), tales como inhibidores de la tripsina y por taninos. Ya que estos últimos, son la causa del uso reducido del frijol (faba) en la producción animal (Van der Poel et al., 1991).

La digestibilidad ileal y cecal de los nutrientes de 4 variedades de frijol, fueron determinadas en cerdos con cánulas "T" en el ciego en dietas con baja concentración de taninos (0.1 %), medio contenido de taninos (0.4 %) y contenido

alto (1.0 %)., encontrando que la ausencia de taninos condensados en el frijol puede tener un efecto positivo en la digestibilidad fecal y en el íleon, particularmente de los aminoácidos de la proteína cruda (Jansman et al., 1993a).

Estos resultados coinciden con otro estudio en el cual se utilizaron cerdos jóvenes alimentados con dietas con taninos en niveles bajos (> 0.10% E.C) y alto (3.3 % E.C.). En el tratamiento alto, se observó una disminución en la actividad de la tripsina y quimiotripsina en el intestino delgado ($P < 0.05$), y además se pueden disminuir la retención de N y afectar negativamente el crecimiento de los cerdos (Jansman et al., 1993b).

2. 6. 2. Pollos.

La presencia de taninos en las dietas de pollo reduce significativamente la digestibilidad de la proteína de un 88.8 a un 80.8 % y esto está altamente correlacionado entre el valor de taninos en la dieta y los valores de digestibilidad de la proteína de frijol (*Vicia faba*) al aplicar taninos a las dietas de monogástricos, se ha reportado una reducción de la digestibilidad aparente de los compuestos nitrogenados (Ortíz et al., 1993).

La utilización de dietas basadas en *faba beans* con o sin la adición de taninos (8, 16 y 24 g/kg) por 24 días a pollos en crecimiento de 3 días, mostró que la adición de taninos adicionales en la dieta basal reducen significativamente ($P < 0.01$) el peso del pollo, el consumo de alimento, y la eficiencia del alimento. Una correlación significativa ($P < 0.01$) entre el nivel de taninos en la dieta y el desempeño de los parámetros del pollo fue registrada, aunque la digestibilidad del

almidón de frijol (*faba beans*) no fue afectada significativamente por la concentración de taninos en la dieta (Treviño et al., 1992).

Además, se observó que la adición de taninos en la dieta basal de pollos en crecimiento reduce la digestibilidad ($P < 0.01$) de un 88.8 a un 80.8% y esto tuvo una alta correlación entre el nivel de taninos en la dieta y los valores de digestibilidad. (Ortíz et al., 1993).

Estudios realizados en aves de postura a los cuales se les dio una dieta con dos diferentes niveles de taninos (bajo 0.03 % y alto 1.05 %), muestran una menor producción, tanto en la tasa de postura, consumo de alimento, peso y masa del huevo con la dieta alta en taninos (Alvarado et al., 1995).

2. 7. Efecto de los taninos en el análisis de fibra detergente neutro.

Los taninos pueden “contaminar” la pared celular de algunos arbustos, la FDN, la FDA y la lignina. Las proanthocianidinas insolubles presentes en la pared celular están correlacionadas negativamente con la digestibilidad de la pared celular (Lou C., 1994).

El sistema detergente para analizar la fibra del forraje y la partición de la pared celular y del contenido celular, son usados para determinar el valor nutritivo de los arbustos utilizados en las dietas de los herbívoros. Diferentes estudios muestran que los taninos y otros compuestos fenólicos interfieren con la interpretación de resultados del análisis del forraje del sistema detergente (Makkar et al., 1995).

Esto debido a que el contenido de proanthocyanidinas insolubles (TC) esta positivamente correlacionado con fibra detergente neutro (FDN) y N ligado a fibra, esto debido a que los taninos condensados pueden ligar proteínas y hacerlas menos solubles en detergente-neutro e incrementa el contenido de (FDN) (Reed, 1986).

En especies de Acacia, las proanthocyanidinas (TC) están asociadas con altos niveles de nitrógeno insoluble detergente que puede resultar en la formación de complejo de tanino-proteína. En un estudio realizado con acacias Africanas se encontró que existe una correlación positiva entre FDN, lignina detergente ácida (LDA) y taninos insolubles al igual que una correlación positiva en el grano de sorgo (Reed, et al., 1986).

Las hojas y ápices de arbustos pueden contener arriba del 50 % de su materia orgánica como fenoles incluyendo taninos y proanthoaynidinas (TC) que son insolubles tanto en acetona, como en detergente-neutro.

En un estudio realizado por Makkar (1995), sugiere que la técnica de extracción con el sistema detergente no predice o determina la digestibilidad *in vivo* de la los constituyentes de la pared celular por lo que estas técnicas no son convenientes para forrajes ricos en taninos.

2. 8. Efecto de los taninos en la digestibilidad *in vitro*.

Aunque los taninos juegan un papel en la prevención de timpanismos, su principal importancia es en la digestibilidad del forraje. Estudios realizados *in vitro* e *in sacco*, han demostrado que concentraciones altas de taninos condensados disminuyen la digestibilidad de la materia seca de *L. cuneata*, *faba beans* y

birdsfoot trefoil. Además, altas concentraciones de taninos (10.6 % en base a materia seca) reducen el consumo de materia seca y la degradación ruminal de la proteína y disminuyen en el rumen la digestión de carbohidratos solubles y hemicelulosa (Chiquette et al., 1989).

En estudios se ha demostrado que el contenido de taninos del sorgo demostró tener un efecto negativo en la digestibilidad *in vitro* (IVDOM) para la materia inicial ($r = -0.483$), Sin embargo, solamente del 0.1 a 7.9 % de la variación de la IVDOM de la materia inicial esta directamente relacionada con el contenido de taninos (Alkamper y Jeong, 1991).

Estudios realizados por Cope y Burns (1971) en el cual utilizaron forrajes de *Lespedeza cuneata* para ver el efecto del consumo del forraje y de la concentración de taninos en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, encontraron un efecto negativo entre la concentración de taninos del forraje y la digestibilidad de la materia seca, entre genotipos de plantas con altas y bajas concentraciones de taninos.

Sin embargo, los estudios de los efectos antinutricionales de las plantas que contienen taninos, utilizando técnicas de laboratorio producen resultados contradictorios. La digestibilidad de la proteína y de FDN de 72 arbustos Africanos fue correlacionada negativamente ($P < 0.01$) con taninos condensados, sin embargo en otros estudios no se encontro significancia y obtuvieron una correlación baja entre taninos y diferentes ensayos, así como en la degradación *in situ* de la materia seca (Khazaal et al., 1994).

2. 9. Microbiología del Rumen.

2. 9. 1. Microclima ruminal.

Los microorganismos dentro del rumen se encuentran en un ecosistema acuático en el cual tienen una tendencia natural a interactuar y fijarse a la superficie ruminal. En rumiantes recién nacidos, este fenómeno natural es observado 38 horas después del nacimiento, con bacterias que forman el fluido ruminal las cuales se fijan y colonizan el tejido del tracto digestivo (Mc Allister et al., 1994).

La población microbiana del rumen esta regulada por un peculiar balance ecológico de las condiciones que tienden a prevalecer. El medioambiente ruminal contiene un número de factores únicos, diferentes a cualquier otro sistema anaeróbico. El cual posee un flujo constante de agua y de alimento lo que permite mantener constantes las poblaciones de microorganismos.

La acidosis producida por la fermentación de los alimentos es reducida y el pH ruminal se mantiene constante entre 6-7, esto debido a que los productos de la fermentación son removidos al ser absorbidos por la pared celular del rumen, además de ser neutralizada por el continuo flujo de saliva de aproximadamente 70-90 litros/día en bovinos (Van Soest, 1982).

Las bacterias que se fijan a la pared del rumen utilizan el oxígeno, hidrolizan urea y en conjunto con bacterias en la fase de fluido, modifican el medioambiente ruminal, los hongos y protozoarios en el rumen empiezan a poblarlo entre los 8 a 10 días y 12 a 20 días respectivamente (Mc Allister et al., 1994).

2. 9. 2. Microorganismos ruminales.

Aproximadamente 200 especies de bacterias han sido identificadas y más de 20 tipos habitan el rumen en un rango que va desde 10^7 a 10^{10} células/ml de fluido ruminal. Valores mayores a los de 10^7 células/ml han sido utilizadas para clasificar especies ruminales predominantes (Scott, 1994).

Las bacterias del rumen son anaerobios obligadas, sin embargo también existen bacterias anaerobios facultativas, aunque su número no es importante en términos de función normal del rumen. La estimación del número total y del tipo de bacterias es basado usualmente por el método de conteo directo (Cuadro 1).

2. 10. Efecto de los taninos en la flora ruminal.

El aspecto cuantitativo de la fijación y colonización de bacterias del rumen a varios forrajes, tanto de leguminosas como de árboles esta en relación con los constituyentes de su pared celular, entre los que se pueden identificar factores que afecten la digestibilidad del forraje por efecto directo sobre la flora microbiana (Makkar et al., 1989).

Cuadro 1.- Volúmenes relativos y número de microorganismos obtenidos por el método de conteo directo en caprinos (Van Soest, 1982).

Grupo	Número por ml. ($\times 10^6$)	Volumen medio de células (μ^3)	Masa neta mg/100 ml.
Pequeñas bacterias	16,000	1	1,600
<i>Selenomonas</i>	100	30	300
<i>Oscillospera</i>			
flagelados	1	250	25
Protozoarios ciliados			
<i>Entodinium</i>	.3	10,000	300
<i>Dasytricha,</i> <i>Diplodinium</i>	.03	100,000	300
<i>Isotricha, Epidinium</i>	.011	1,000.000	1,100

Los taninos en los forrajes de las plantas pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos del rumen, la digestión de forrajes y la producción de metano, este efecto inhibitorio puede estar relacionado con la fijación de microorganismos celulolíticos tales como *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvens*, *R. albus*, y *C. longisporum* a las partículas del alimento.

Sin embargo se ha encontrado en estudios *in vitro*, que cultivos de bacterias celulolíticas con organismos que puedan degradar fenoles como son *Eubacterium oxidoreducens* G14 y *Syntrophococcus sucromutans* S195 se puede incrementar el aumento de arbustos degradados, pero esto fue observado hasta las 72 horas de incubación. (Varel y Krumholz, 1991).

El complejo formado por los taninos condensados con las proteínas, resiste la digestión microbiana y se a encontrado que a concentraciones de 200 µg/ml inhiben por completo el crecimiento de *Butyrvibrio fibrisolvens*, y a 100 µg/ml se observo floculación y elongación de células, pero otras bacterias como es el caso de *Provotella ruminocola* y *Streptococcus bovis* crecen en presencia de 600 µg/ml de taninos condensados, sin embargo, aunque no afecta la morfología de *P. ruminocola*, si causa una formación extensa de cadenas y de división incompleta de *S. bovis*, además interfiere con la fijación de *Fibrobacter succinogenes* hacia la celulosa (Mc Allister et al., 1994).

Sin embargo, aunque los taninos tengan un efecto negativo en las bacterias ruminales, Reed (1990) hipotetizo que los taninos pueden incrementar el rendimiento microbiano por un aumento en el flujo del N no amoniacal mayor al contenido del N del forraje de las leguminosas que contienen taninos. Esto debido a que el N no es creado en el rumen, además parte del incremento del flujo de nitrógeno no amoniacal puede ser por fuentes endógenas que pueden ser incorporadas dentro de las fracciones microbiales.

III. MATERIALES Y METODOS

3. 1. Localización del área de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Microbiana, así como en el laboratorio de Bromatología, localizados en la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., ubicada en el kilómetro 17 de la carretera Zuazua- Marín en el municipio de Marín, Nuevo León.

3.2. Desarrollo del experimento

Para determinar la digestibilidad *in vitro* del forraje de alfalfa y para el conteo de microorganismos ruminales se probaron diferentes concentraciones de taninos en 8 tratamientos (T1 0 mgE.C., T2 5 mgE.C., T3 10 mgE.C., T4 15 mgE.C., T5 20 mgE.C., T6 25 mgE.C., T7 30 mgE.C. y T8 35 mgE.C.) (mgE.C.= miligramos equivalentes de catequina) los cuales fueron adicionados en forma líquida a la muestra de alfalfa antes de la digestibilidad *in vitro* (Cuadro 1). En la prueba de digestibilidad se corrieron los 8 tratamientos con tres repeticiones y sus respectivos blancos, por un tiempo de 48 horas que es el tiempo de digestibilidad bacteriana y enzimática, para determinar la digestibilidad de la materia orgánica.

Cuadro 1.- Tratamientos.

Tratamiento	Muestra alfalfa (gr)	Taninos (mgE.C.)	ml de agua
T1	0.5	0	0
T2	0.5	5	.47
T3	0.5	10	.94
T4	0.5	15	1.4
T5	0.5	20	1.9
T6	0.5	25	2.3
T7	0.5	30	2.8
T8	0.5	35	3.3

Para medir el crecimiento bacteriano en la digestibilidad de la alfalfa con diferentes concentraciones de taninos, se utilizaron los 8 tratamientos con tres repeticiones y sus respectivos blancos, al mismo tiempo que se corrieron las pruebas de la digestibilidad in vitro para la prueba de conteo de microorganismos, para lo cual se tomaron muestras en diferentes tiempos de incubación, realizándose primero dos muestreos cada 4 horas y posteriormente cada 8 horas hasta completar las 48 horas (0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 hrs) de digestibilidad microbiana, tomándose en cada hora de muestreo 1 ml de cada tubo. Para la prueba de conteo, se tomaron muestras primero de las horas 0 a la hora 16 y en una segunda corrida de la hora 24 a la 48.

3. 3. Técnica de Vainillina-HCL

Para determinar la concentración de taninos que habia que colocar en forma liquida en la muestra se utilizó la técnica de vainillina-HCL, la cual

consiste en pesar 1 g de tanino comercial al cual se le agrega 50 ml de metanol por 28 horas para la extracción de los taninos de la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una alicuota del extracto y se le agrega una solución de vainillina y ácido clorhídrico. El color resultante es leído después de 20 minutos con un espectrofotómetro con una longitud de onda de 520 nm. La lectura resultante se comparó con una curva de regresión obtenida por una standard, para lo cual se utilizó una solución patrón equivalente a 100 mg/50 ml, lo que equivale a $40 \text{ mg}/20 \text{ ml} = 2 \text{ mg/ml}$ (mg de catequina por ml), para los blancos se utilizó 1 ml de metanol mas 5 ml de vainillina/HCL. Todas las muestras y los blancos se corrieron por triplicado (Burns 1971).

3. 4. Digestibilidad *in vitro*

Esta técnica consiste en colocar 0.5 g de muestra con 10 ml de líquido ruminal en un medio buffer por un periodo de incubación de 48 hrs para simular los procesos digestivos en el rumen, al término de este periodo de incubación. se realiza una segunda incubación con una mezcla de ácido clorhídrico-pepsina para simular la digestión en el abomaso. Las cantidades de materia orgánica que desaparecen después de ambas etapas, se consideran como digeridas (Tilley y Terry, 1963).

La muestra de líquido ruminal se obtuvo de 2 toros de raza Holstein fistulados en el rumen, los cuales fueron alimentados por un periodo de adaptación de seis días con forraje de alfalfa. Las muestras de líquido ruminal se extrajeron y filtraron por medio de una gasa estéril, y fueron transportadas al laboratorio en un termo cerrado a una temperatura de 38-39°C. Una vez en el

laboratorio, se filtró nuevamente y se le adiciono CO_2 para eliminar el oxígeno y mantener un pH estable.

3. 5. Conteo de Microorganismos

Para el conteo de bacterias ruminales en la digestibilidad *in vitro* se utilizó la técnica de conteo directo (Colomé et al., 1986), el cual determina el número total (tanto vivos como muertos) de microorganismos en una suspensión de la cual se coloca una muestra en una cámara de conteo o hematocitómetro. Esta es una cámara con una depresión de 0.1 mm, esta dividida en nueve cuadros de 1 mm^2 . El cuadro central esta dividido en 25 cuadros pequeños, los cuales están divididos a su vez en 16 cuadros.

Para contar el número de células por ml, se cuentan las bacterias en 5 de los cuadros de 1/25 mm^2 (se cuentan los de las esquinas y el central) , el número de bacterias en los 5 cuadros se multiplica por 5 (células/ mm^2) y por el inverso de la dilución. Se multiplica el número de células/ mm^2 por 1,000 para obtener el número de células/ mm^3 , el cual se multiplica por 10,000 y el resultado se expresa en células/ml de suspensión.

Para el conteo se tomó 1 ml de cada muestra (por triplicado) y se diluyó en agua bidestilada a una temperatura de 38-39°C para obtener una dilución de 1/10. Posteriormente se tomó una muestra y se colocó en la cámara de conteo, la cual se colocó en un microscopio para su lectura con un aumento de 40X.

3. 6. Diseño estadístico

Los resultados obtenidos tanto del conteo de microorganismos como de la prueba de digestibilidad *in vitro*, fueron analizados bajo un diseño completamente al azar y las diferencias se analizaron con una comparación de medias (DMS) con la ayuda del paquete “Diseños Experimentales” (Olivares, 1994). El modelo estadístico utilizado es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = observación del tratamiento i en la repetición j .

μ = efecto verdadero de la media general.

τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} = error experimental.

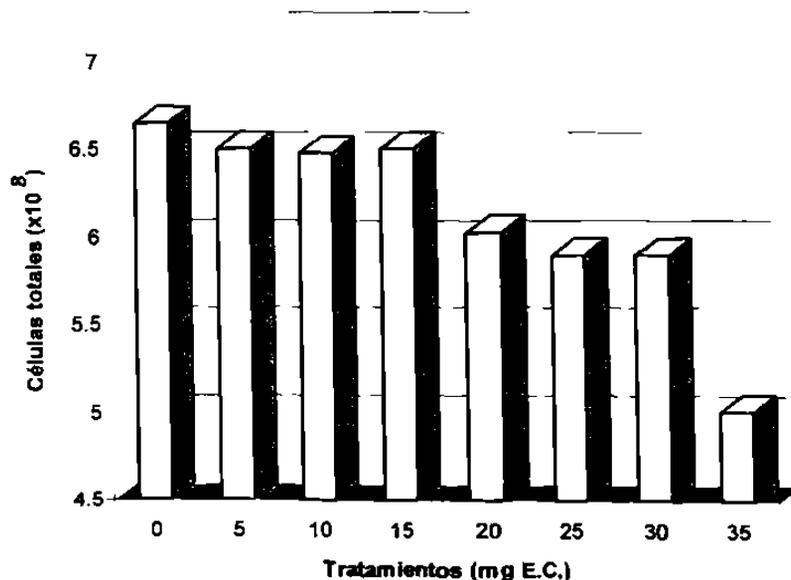
IV. Resultados

Crecimiento Bacteriano.

En la Figura 1 se aprecian los resultados del análisis de la hora 4 del crecimiento bacteriano *in vitro*, en donde se encontró una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) (apéndice, cuadro 1) entre los diferentes tratamientos y el número de bacterias totales en la digestibilidad de la materia orgánica del forraje de alfalfa adicionado con diferentes concentraciones de taninos.

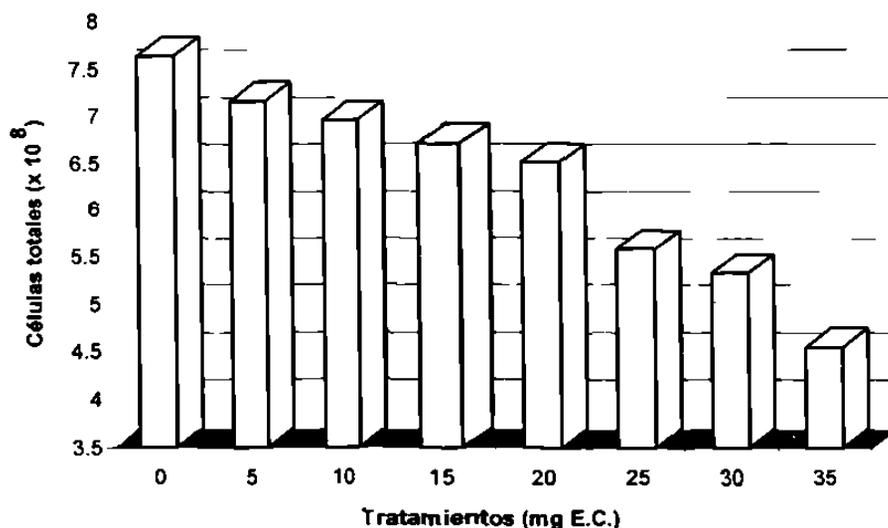
El tratamiento 1 (0 mgE.C.) resultó con la mayor concentración de bacterias ruminales (6.65×10^8), mientras que el tratamiento 8 (35 mgE.C.) obtuvo la menor concentración de bacterias (5.0×10^8), así mismo los tratamientos con las concentraciones de bacterias intermedias fueron los T2 (6.50×10^8), T3 (6.48×10^8) y T4 (6.0×10^8), los cuales no se encontro diferencia significativa (apéndice, cuadro 2).

Figura 1.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 4 de digestion



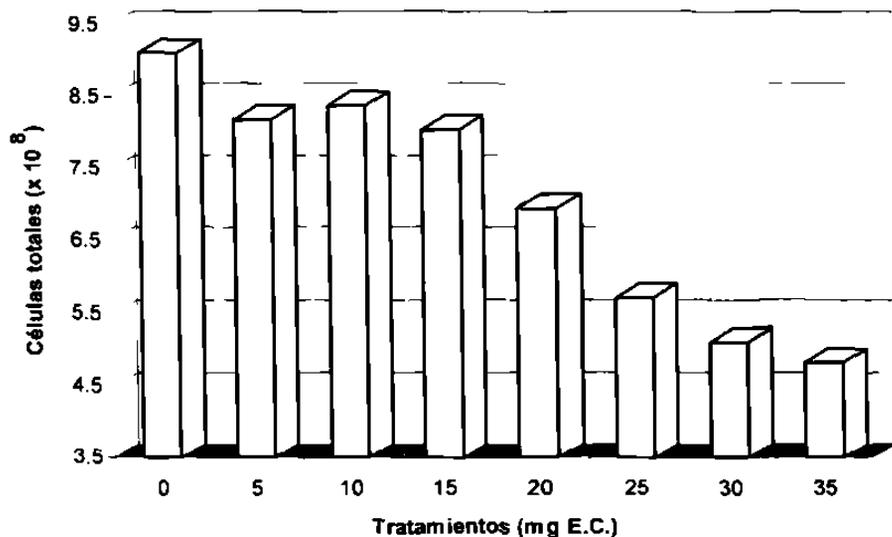
En la hora 8 del crecimiento bacteriano, se encontro una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos (apéndice, cuadro 3), de los cuales los tratamientos 1 y 8 obtuvieron las concentraciones mayores y menores (7.6×10^8 y 4.55×10^8) de células totales. Como se aprecia en la figura 2, los tratamientos 2 (5 mg.E.C.) y 3 (10 mg.E.C.) aunque presentaron concentraciones diferentes (7.16×10^8 y 6.96×10^8), no se encontró diferencia estadística (apéndice, cuadro 4), al igual que los T4 (6.71×10^8) y T5 (6.51×10^8) y los tratamientos T6 (5.58×10^8) y T7 (5.33×10^8) que resultaron estadísticamente iguales.

Figura 2.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 8 de digestion.



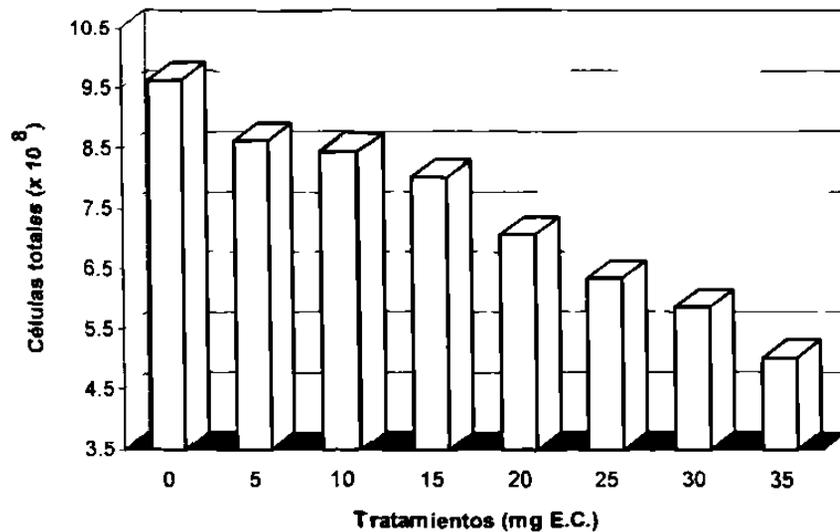
En el análisis de la hora 16 (apéndice, cuadro 5), se muestra nuevamente que hubo una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los diferentes tratamientos, donde los tratamientos que resultaron con la concentración de células más altas fueron los T1 (9.11×10^8), T3 (8.38×10^8) y T2 (8.20×10^8), estos dos últimos fueron estadísticamente iguales (apéndice, cuadro 6) al igual que el T3 y T4 (8.05×10^8), como se aprecia en la figura 3. Los tratamientos T7 (5.10×10^8) y T8 (4.83×10^8) resultaron con las concentraciones de células totales más bajas.

Figura 3.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 16 de digestión.



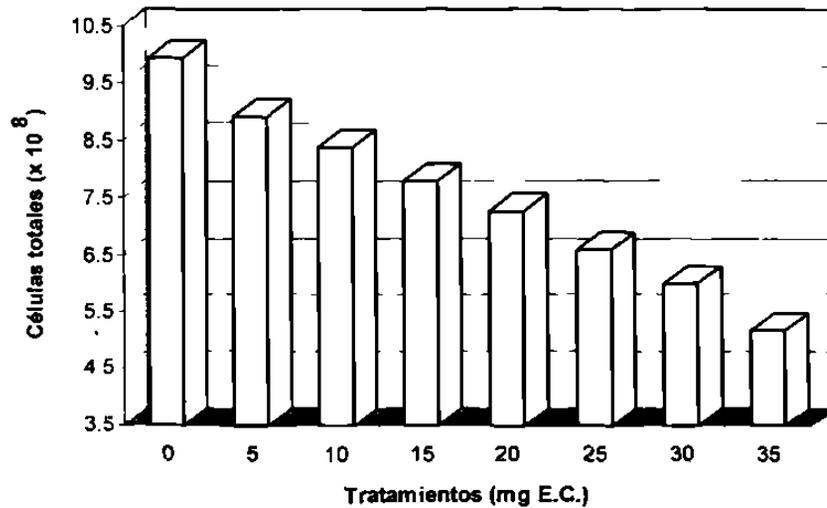
En la hora 24 del crecimiento bacteriano *in vitro*, se encontró una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos (apéndice, cuadro 7), donde el T1 (5.10×10^8) obtuvo el mayor número de células totales, así como el T8 (5.03×10^8) que obtuvo el menor número de células. En esta etapa de la prueba todos los tratamientos resultaron estadísticamente diferentes (apéndice, cuadro 8) donde los T4 (15 mg.E.C.) y T5 (20 mg.E.C.) obtuvieron los valores intermedios de concentración de células totales (8.03×10^8 y 7.08×10^8) (figura 4).

Figura 4.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 24 de digestión.



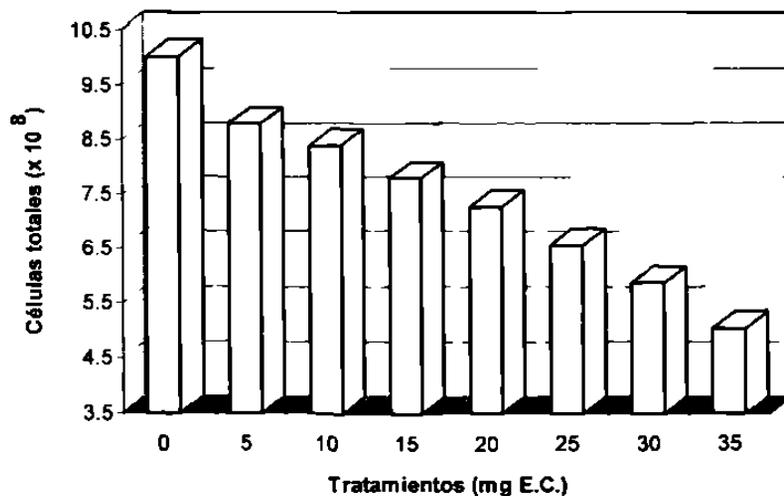
Como se aprecia en la figura 5 de la hora 32 del crecimiento bacteriano *in vitro*, se encontró una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en los diferentes tratamientos (apéndice, cuadro 9), en donde los tratamientos T1 y T8 fueron nuevamente los que obtuvieron las concentraciones de células mayores y menores (9.95×10^8 y 5.18×10^8) respectivamente. Así mismo, todos los tratamientos resultaron diferentes (apéndice, cuadro 10). Los tratamientos que resultaron con células intermedias son los T4 (7.8×10^8) y T5 (7.28×10^8).

Figura 5.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 32 de digestión.



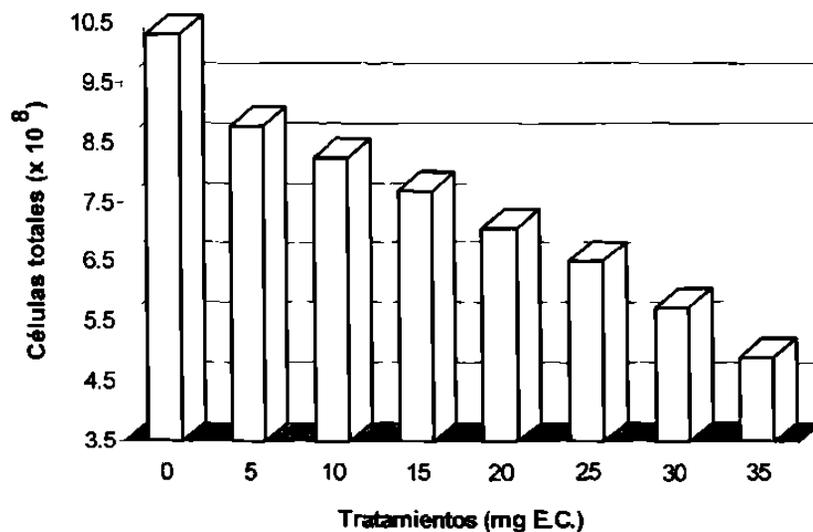
En los resultados estadísticos (apéndice, cuadro 11) se encontró una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos de la hora 40 del crecimiento bacteriano *in vitro*, en donde los T2 (8.80×10^8) y T3 (8.40×10^8) resultaron estadísticamente iguales (apéndice, cuadro 12) al igual que los tratamientos T3 (8.40×10^8) y T4 (7.80×10^8). La mayor concentración de células totales (1.02×10^8) fue para el T1, y la menor concentración (5.0×10^8) fue para el T8, como se puede ver en la figura 6.

Figura 6.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 40 de digestion.



Los resultados obtenidos del análisis estadístico de la hora 48 (apéndice, cuadro 13) indican nuevamente que hubo una diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los diferentes tratamientos, en donde el T1 (1.03×10^8) obtuvo la mayor concentración de células totales, mientras que el T8 (4.9×10^8) presentó la concentración mas baja. En este tiempo del crecimiento bacteriano, todos los tratamientos resultaron estadísticamente diferentes (apéndice, cuadro 14a) como se aprecia en la figura 7.

Figura 7.- Crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de taninos en la hora 48 de digestion.

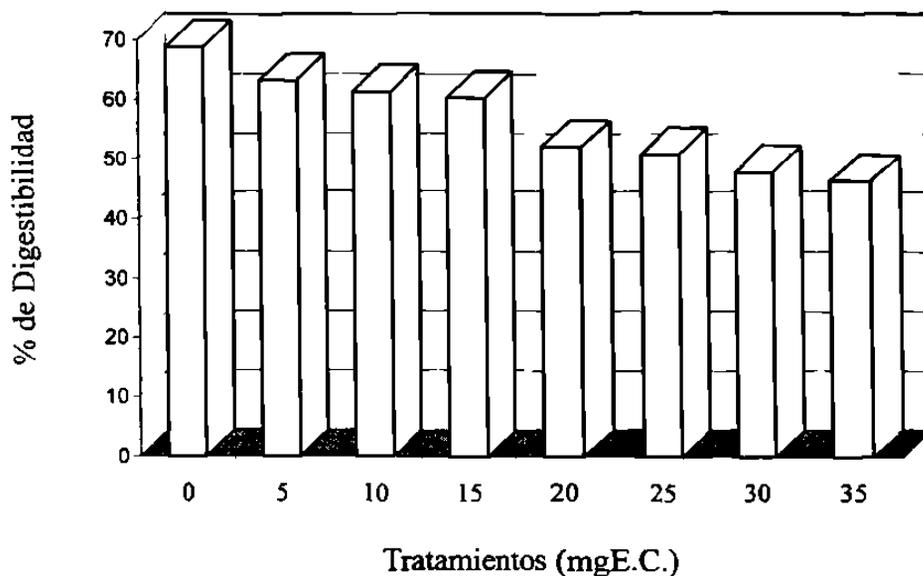


Digestibilidad *in vitro*.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico (apéndice, cuadro 15) de la prueba de digestibilidad *in vitro* del forraje de alfalfa adicionado con diferentes concentraciones de taninos, muestra que hubo una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos. En el análisis de diferencia mínima significativa (DMS) (apéndice, tabla 16), muestra que no hubo diferencia estadística entre los tratamientos T2 (5 mg.E.C.) y T3 (10 mg.E.C.) (figura 8), al igual que los tratamientos T5 (20 mg.E.C.) y T6 (25 mg.E.C.) y los tratamientos T7 (30 mg.E.C.) y T8 (35 mg.E.C.).

En la figura 8 se aprecia que la digestibilidad bajó del 68 % en el T1, a un 46 % en el T8, con una disminución en la digestibilidad del 32.67%. La adición de 5 mg.E.C. (del T1 al T2) de taninos en la alfalfa, disminuyo un 8.13 % la digestibilidad de la materia orgánica. Entre los tratamientos T2 (63.32 %), T3 (61.42 %) y T4 (60.47 %) se registró una disminución sostenida en la capacidad de digestibilidad de aproximadamente un 2 %, al igual que entre los tratamientos T5 (52.19 %) y T6 (50.93 %), y los tratamientos T7 y T8. Sin embargo, del T4 (15 mg.E.C.), al T5 (20 mg.E.C.) la digestibilidad baja aproximadamente un 12%, mientras que entre el T6 (25 mg.E.C.) al T7 (30 mg.E.C.) la disminución en la digestibilidad es solo del 4.52 %.

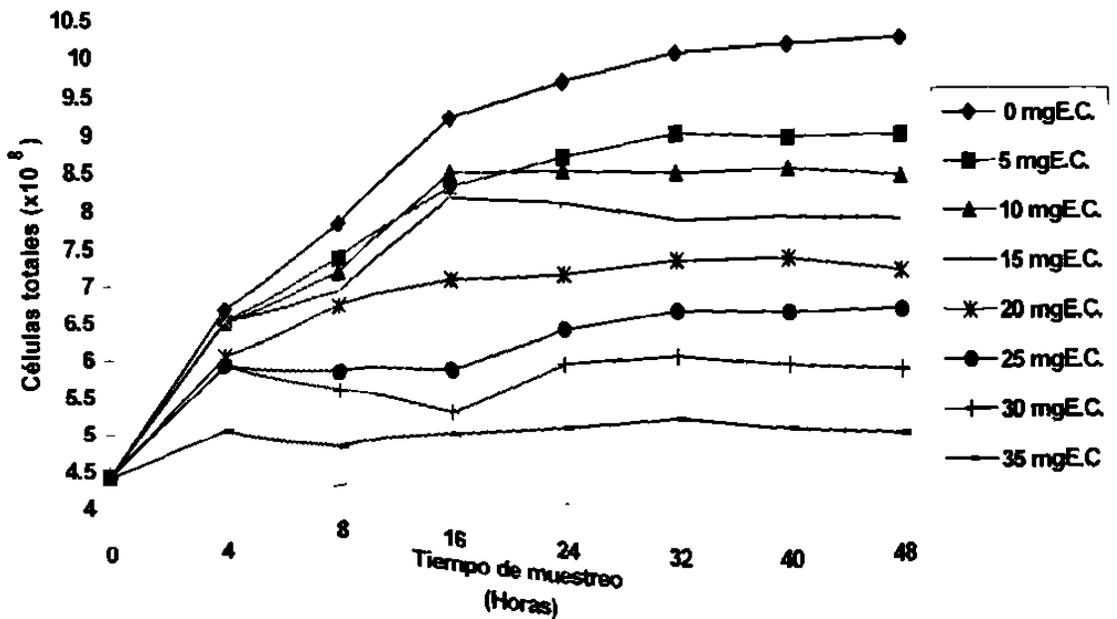
Figura 8.- Digestibilidad *in vitro* del forraje de alfalfa con diferentes concentraciones de taninos.



En la figura 9, se puede apreciar el efecto de las diferentes tratamientos y del tiempo de muestreo sobre el número de bacterias ruminales (células totales). En la hora 4 del muestreo se aprecia que los tratamientos T1 (0 mgE.C.), T2 (5 mgE.C.), T3 (10 mgE.C.) y T4 (15 mgE.C.) tienen un crecimiento similar en el número de células totales (6.65×10^8 , 6.50×10^8 , 6.48×10^8 y 6.50×10^8), de la misma forma los tratamientos T5 (20 mgE.C.), T6 (25 mgE.C.) y T7 (30 mgE.C.) con una concentración de células totales de 6.0×10^8 , 5.9×10^8 y 5.9×10^8 respectivamente. En la hora 16 del muestreo se aprecia que los tratamientos T1 (8.2×10^8), T2 (8.38×10^8) y T3 (8.05×10^8) se mantienen con una concentración de células totales similares, mientras que el T1 (9.11×10^8) y el T8 (4.83×10^8) son los tratamientos con la mayor y menor concentración de células totales.

A partir de la hora 24 a la hora 32 de muestreo, todos los tratamientos empiezan a disminuir la velocidad de crecimiento de las bacterias ruminales, en algunos tratamientos como el T3 y T4 empiezan a disminuir en el número células totales (8.56×10^8 y 8.03×10^8). De la hora 32 a la 48, Las concentraciones de células totales se mantienen casi con las mismas concentraciones y en algunos tratamientos empieza a decrecer su concentración como el T3 (8.23×10^8), T5 (7.0×10^8), T7 (5.73×10^8) y T8 (4.9×10^8).

Figura 9.- Efecto de diferentes concentraciones de taninos en diferentes tiempos de muestreo, sobre el crecimiento de las bacterias ruminales.



V. Discusión

Los resultados obtenidos de los datos analizados tanto en la prueba de digestibilidad, como en la prueba de conteo de microorganismos, indican que el efecto negativo que hubo entre las concentraciones de taninos presentes en el forraje de alfalfa y la digestibilidad de la materia orgánica y el crecimiento de microorganismos ruminales es debió a un efecto directo de los taninos sobre las bacterias que intervienen en la digestibilidad de la materia orgánica. Los resultados obtenidos en la reducción en la digestibilidad de la materia orgánica del forraje de alfalfa (de un 68.93 % a un 46.41 %), concuerdan con los resultados obtenidos por Coppock y Reed (1992), en donde la digestibilidad de la alfalfa (69 %) tuvo un efecto negativo ($P < 0.05$) en dietas de *Acacia* que contenían taninos (0.40 y 0.12 % de proanthocyanidinas insolubles).

Estudios realizados *in vitro* han demostrado que la presencia de fenoles en el forraje tiene un efecto tóxico tanto para las bacterias del rumen, como también para los protozoarios y hongos, por lo que afectaría en forma negativa la digestibilidad de la materia orgánica y la proteína (Mc Allister et al., 1994). La reducción de la digestibilidad puede ser explicada por tres mecanismos de acción de los taninos sobre los microorganismos ruminales descritos por Scalbert (1991), citado por Reed (1995) los cuales son: 1.- inhibición de enzimas y la privación de sustratos, 2.- acción en membranas y 3.- privación de iones metal.

Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente prueba no concuerdan con los obtenidos por Makkar, et al., (1989), en los cuales no se encontró correlación ($r = 0.49$) entre el contenido de taninos del forraje de *Q. incana* (26.26 mg/g⁻¹), *B. variegata* (105.78 mg/g⁻¹), *S. tetraesperma* (27.87 mg/g⁻¹) y *L.*

leucocephala (25.93 mg/g^{-1}) y la pérdida de materia seca *in sacco* y entre taninos condensados y la capacidad de precipitación de proteínas PPC ($r = 0.72$).

Las diferencias encontradas en las pruebas realizadas y los datos obtenidos, pueden ser debidas a que la degradación de la proteína y la materia orgánica de algunos forrajes de leguminosas, solamente es explicada en parte, por los niveles de taninos presentes, tal y como fue propuesto por Broderick y Albrecht (1994), al encontrar la misma relación proporcional con la tasa de degradación ruminal en forrajes que no contenían taninos y forrajes que contenían niveles bajos de taninos.

Longland et al. (1995), encontró relación entre la acumulación de gas de la fermentación bacteriana y la digestibilidad a las 12, 25, 46 y 168 hrs y el contenido de fenoles ($r > -0.92$; $P < 0.001$) y el contenido de taninos ($r > -0.72$; $P < 0.02$) en forrajes de leguminosas con concentraciones variadas de taninos como *L. leucocephala* (22 mg/g^{-1} TC), *Tadehagi sp.* (175 mg/g^{-1} TC), *L. leucocephala* (7.8 mg/g^{-1} de Taninos ligados) y *F. macropilla* (31.9 mg/g^{-1} de Taninos ligados). Estos datos concuerdan con los obtenidos en la prueba de crecimiento microbiano en los diferentes tiempos de incubación de este trabajo (4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 hrs.), en donde se encontraron disminuciones en el número de bacterias ruminales.

Los resultados del presente trabajo muestran claramente el efecto negativo de los taninos sobre la actividad de los microorganismos ruminales, por lo cual repercute tanto en la digestibilidad de la materia orgánica, de la proteína, como de la materia seca. Sin embargo, concentraciones bajas de taninos podrían aumentar la tasa de proteína de sobrepaso y disminuir el consumo de materia seca al evitar una digestibilidad excesiva de la materia orgánica, así como de la proteína.

VI RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivos el determinar el efecto de las diferentes concentraciones de taninos en el crecimiento de la flora microbiana ruminal y la digestibilidad *in vitro* del forraje de alfalfa. Para determinar el efecto de los taninos en la degradabilidad de la materia orgánica de la alfalfa se utilizó la técnica de digestibilidad *in vitro*, utilizándose 8 concentraciones de taninos, T1 (0 mg.E.C.), T2 (5 mg.E.C.), T3 (10 mg.E.C.), T4 (15 mg.E.C.), T5 (20 mg.E.C.), T6 (25 mg.E.C.), T7 (30 mg.E.C.) y T8 (35 mg.E.C.). Para la prueba de crecimiento bacteriano, se utilizó la técnica de conteo directo en cámara, utilizándose 3 repeticiones con sus respectivos blancos en la misma corrida de la prueba de digestibilidad *in vitro*, por lo que se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación, en las horas 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 en las pruebas de digestibilidad *in vitro*. La concentración de taninos se determinó por medio del método de la vainillina/HCL. Los taninos adicionados al forraje de alfalfa mostraron tener un efecto negativo en el crecimiento de las bacterias ruminales ($P < 0.01$) en todo el período de la digestión bacteriana, y en todos los diferentes tiempos de incubación. El T1(0 mg.E.C.) tuvo el mayor número de células totales en todos los tiempos de prueba de la hora 4 con un número total de 6.65×10^8 hasta la hora 48 con 1.03×10^9 células. Los tratamientos 7 (30 mg.E.C.) y 8 (35 mg.E.C.) fueron los únicos tratamientos en los que el número de células totales fue decreciendo de un 5.9×10^8 hasta un 5.73×10^8 para el tratamiento 7, mientras que para el tratamiento 8 disminuyó de un 5.0×10^8 en la hora 4 a un 4.9×10^8 en la hora 48. La disminución en el número de bacterias ruminales por acción de los taninos es la causa de la disminución en la digestibilidad de la materia orgánica del forraje de alfalfa, ya que se encontró una disminución de la misma de un 8.13 % al agregar (5 mg.E.C) al forraje de alfalfa, y continua disminuyendo 2 % por cada 5 mg. que se le adicionan hasta los 15 mg.E.C.. La digestibilidad de la

materia orgánica de la alfalfa disminuye de un 68 % (T1) a un 46 % (T8) lo que indica el efecto negativo de los taninos en la capacidad de digestibilidad de los microorganismos del fluido ruminal.

VII. Bibliografía.

- Albrecht K. A. y R. E. Muck.** 1991. Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. *Crop Sci.* 31: 464.
- Alkamper J. y J. Dae Han,** 1991. The influence of enviromental factors and fertilization on the tannin content of sorghum. *Anim. Research Dev.* 36 - 55.
- Alvarado L. J., Soto C. D., Morales B. E., y Avila G. E.,** 1995. Efectos de la adición de diferentes niveles de DL-Metionina en dietas con sorgo con contenido alto y bajo en taninos, en el comportamiento productivo de gallinas de postura. Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal A.C., Memorias VII Congreso Nacional Amena.
- Beever D. E., M. Gill y J. D. Sutton.,** 1989. Limits to animal production with high forage diets. *J. Anim. Sci.* 67 (suppl.1): 298.
- Broderick G. A. y Albrecht K. A.,** 1994. Ruminant in vitro degradation of protein in tannin free and tannin containing forage legume species. *J. Anim. Sci.* 72, (supp.1): 385.
- Bryant J. P., R. Paul B., y Clausen T. P.,** 1992. Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals. *J. Range Manage.* 45: 18.
- Burns R. E.,** 1971. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agronomy Journal.* 63: 511.

- Burns J. C., y Coipe A. W., 1974.** Nutritive value of crownvetch forage as influenced by structural constituents and phenolic and tannin compounds. *Agronomy Journal*. 66:195 .
- Chiquette J., Cheng K. J., Rode L. M., y Milligan L. P., 1989.** Effect of tannin content in two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus L.*) on feed digestibility and rumen fluid composition in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 69: 1031 .
- Chiquette J., Cheng K. J., Costerton J. W. y Milligan L. P., 1988.** Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Loutus corniculatus L.*) using in vitro and in sacco techniques. *Can. J. Anim. Sci.* 68: 751.
- Clarke R. T. J., 1977,** Methods for studying gut microbes. In. *Microbial ecology of the gut*. Academic press. London. pp. 1 - 33.
- Colomé S. J., Kubinski A. M., Cano J. R., y Grady V. D., 1986.** Laboratory exercises in microbiology. California Polytechnic State University. West Publishing Company. Pag: 69 - 72.
- Cope A.W. y Burns J.C., 1971.** Relationship between tannin levels and nutritive value of sericea. *Crop Sci.*, 11: 231.
- Cope A. W., Bell T.A., y Smart W. W. G., 1971.** Seasonal Changes in an Enzyme inhibitor and tannin content in *Sericea Lespedeza*. *Crop Sci.* 11: 893.

- Coppock D. L. y J. D. Reed, 1992.** Cultivated and native browes legumes as calf supplements in Ethiopia. *J. Range Manage.* 45: 231.
- Driedger A., y E. E. Hatfield, 1972.** Influence of tannins on the nutritive value of soybean meal for ruminants. *J. Anim. Sci.* 34: 465.
- Garrido A., Gómez C. A., Guerrero J. E., y Marquardt R. R., 1991.** Chemical composition and digestibility in vitro of *Vicia faba* L. cultivars in tannin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35: 205.
- Hagerman A. E., C. T. Robbins., Y. Weerasuriya, T. C. Wilson y C. McArthur., 1992.** Tanin chemistry in relation to digestion. *J. Range Manage.* 45: 57.
- Jansman A. J. M., Huisman J., y Van Der Poel., 1993a.** Ileal and faecal digestibility in piglets of field beans (*Vicia faba* L.) varying in tannin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 42: 83.
- Jansman A. J. M., Verstegen M. W. A., y Huisman J., 1993b.** Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vacia Faba* L.) with a low and high content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43: 239.
- Khazaal K., Boza J., y Orskov E. R., 1994.** Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without insoluble polyvinylpyrrolidone or nylon bag. *Animal Feed Science and Technology.* 49 :133.

- Khazaal K., y Orskov E. R., 1994.** The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble polyvinylpyrrolidone for the assessment of phenolic-related antinutritive factors in browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47: 305.
- Kraiem K., Garrett J. E., Meiske J. C., Goodrich R. D. y Marten G. C., 1990.** Influence of method of forage preservation on fibre and protein digestion in cattle given lucerne, birdsfoot trefoil and sainfoin. *Anim. Prod.* 50: 221.
- Kumar R., y Vaithyanathan S., 1990.** Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30: 21.
- Leinmüller E., Herbert S., and Menke H. K., 1991.** Tannins in ruminant feedstuffs. *Animal Research and Development.* 33: 9.
- Longland C. A., Michael K. T., Ruth S., S. J. Lister, C. J. Powell, and P. Morris, 1995.** Non-starch polysaccharide composition and *in vitro* fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 161.
- Lou C. N., 1994.** Tannin and *in vitro* digestibility of tropical browse: Predictive equations. *J. Range Manage.* 47: 398 .
- Makkar H. P. S., N. K. Borowy, K. Becker y A. Degen, 1995.** Some problems in fiber determination of a tannin-rich forage (*Acacia saligna* leaves) and their implications in *in vivo* studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 67.

- Makkar H. P. S., y Singh B., 1991.** Distribution of condensed tannins (proanthocyanidins) in various fiber fractions in young and mature leaves of some oak species. *Anim. feed Sci. Technol.* 32: 253.
- Makkar H. P. S., Singh B., y Negi S., 1989.** Relationship of rumen degradability with microbial colonization, cell wall constituents and tannin levels in some tree leaves. *Anim. Prod.* 49: 299.
- Makoni N. F., Von Keyserlingk M. A. G., Shelford J. A., y Fisher L. J., 1995.** Degradability of frozen and ensiled alfalfa proteins by sheep and assessment of duodenal digesta protein. *Anim. Feed Sci. Technol.* 53: 221
- Mc Allister T. A., Bae H. D., Jones G. A., y Cheng K. J., 1994.** Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72: 3004.
- McLeod M. N., 1974.** Plant tannins their role in forage quality. *Nutr. Abstr. Rev.*, 44: 803.
- Ming-Cheng J. Ch., James W. Bailey y J. L. Collins. 1994.** Dietary tannins from cowpeas and tea transiently alter apparent calcium absorption but not absorption and utilization of protein in rats. *J. Nutr.* 124: 283.
- Neira Morales R., 1993.** Composición química y digestibilidad in situ de la proteína de 15 arbustos nativos del Noreste de México. Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.A.N.L.

- Olivares S. E.**, 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5, Facultad de Agronomía UANL. Marín Nuevo León México.
- Ortiz L. T.**, Centeno C., y Treviño J., 1993. Tannins in faba bean seeds: effects on the digestion of protein and amino acids in growing chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41: 271.
- Reed J. D.**, 1986. Relationships among soluble phenolics, insoluble proanthocinidins and fiber in East African browse species. *J. Range Manage.* 39: 5.
- Reed J. D.**, 1995, Nutritional Toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73: 1516.
- Reed J. D.**, H. Soller, y A. Woodward. 1990. Fooder tree and straw diets for sheep: intake, growyh, digestibility and the effects of phenolics on nitrogen utilization. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30: 39.
- Russell J. M.**, y M. H. Ralphs., 1992. Plant toxins and palatability to herbivores. *J. Range Manage.* 45: 13.
- Solano V. H.**, 1994. Dinamica estacional del contenido de minerales y taninos del forraje de 15 plantas arbustivas nativas del Estado de Nuevo León. Tesis de Licenciatura. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.A.N.L.
- Scott A. M.**, 1994. Nutrient transport by ruminal bacteria: a review. *J. Anim. Sci.* 72: 3019.

- Tanner J. C., J. D. Reed and E. Owen., 1990.** The nutritive value of fruits (pods with seeds) from four *Acacia* spp. Compared whit extracted noug (*Guiztia abyssinica*) meal as supplements to maize stover for Ethiopian highland sheep. *Anim. Prod.* 51: 127.
- Tilley J. M. A. y Terry R. A., 1963.** A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. British Grassl. Soc.* 18:104.
- Treviño J., Ortiz L., y Centeno C., 1992.** Effect of tannins from faba beans (*Vicia faba*) on the digestion of starch by growing chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37: 345.
- Wiegand R. O., Reed J. D., Said A. N., y Ummuna V. N., 1995.** Proanthocyanidins (condensed tannins) and the use of leaves from *Sesbania sesba* and *Sesbania goetzsi* as protein supplements. *Anim. Feed Sci. Technol.* 54: 175.
- Vaithyanathan S., y Kumar R., 1993.** Relationship between protein-precipitating capacity of fooder tree leaves and their tannin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 44: 281.
- Van Der Poel, Gravendeel S., Van Kleef D. J., Jansman A. J. M. y Kemp B. 1992.** Tannin-containing faba beans (*Vicia faba* L.) effects of methods of processing on ileal digestibility of protein and strach for growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 36: 205.

- Van Der Poel**, Gravendeel S., y Boer H., 1991. Effect of different processing methods on tannin content and in vitro protein digestibility of faba bean (*Vicia faba* L.). *Anim. Feed Sci. Technol.* 33: 49.
- Van Hoven W.**, 1984. Tannins and digestibility in greater kudu. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 177 (suppl).
- Van Soest J. P.**, 1982. Nutricional ecology of the ruminant. O & B Books inc. Portland, OR 97209. pag: 152.
- Varel V. H.**, Jung G. H. y Krumholz R. L., 1991. Degradation of cellulose and forage fiber fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in coculture with phenolic monomer-degrading bacteria. *J. Anim. Sci.* 69: 4993.

Apéndice

Cuadro 1.- Análisis de varianza Hora 4.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P > F
Tratamientos	7	2449.343	349.906	23.45	0.00
Error	16	238.656	14.916		
Total	23	2688.000			

P < 0.01

C.V.= 3.15 %

Cuadro 2- Comparación de medias hora 4

Tratamiento	Células totales (x10 ⁸)
1	6.66 a
2	6.5 a
3	6.48 a
4	6.5 ab
5	6.03 bc
6	5.9 c
7	5.9 c
8	5.01 d

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente

Cuadro 3.- Análisis de varianza Hora 8.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P > F
Tratamientos	7	9279.312	1325.616	137.141	0.00
Error	16	154.656	9.666		
Total	23	9433.968			

P < 0.01

C.V.= 2.46 %

Cuadro 4.- Comparación de medias hora 8

Tratamiento	Células totales ($\times 10^8$)
1	7.63 a
2	7.16 b
3	6.96 bc
4	6.71 cd
5	6.51 d
6	5.58 e
7	5.33 e
8	4.55 f

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente

Cuadro 5.- Análisis de varianza Hora 16.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P > F
Tratamientos	7	22358.718	3194.102	547.866	0.00
Error	16	93.281	5.830		
Total	23	22452.000			

P < 0.01

C.V.= 1.17 %

Cuadro 6.- Comparación de medias hora 16.

Tratamiento	Células totales ($\times 10^8$)
1	9.11 a
3	8.2 b
2	8.38 bc
4	8.05 c
5	6.95 d
6	5.71 e
7	5.13 f
8	4.83 f

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente

Cuadro 7.-Análisis de varianza Hora 24.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P > F
Tratamientos	7	20581.343	2940.191	441.201	0.00
Error	16	106.625	6.664		
Total	23	20687.968			

P < 0.01

C.V.= 1.75 %

Cuadro 8. Comparación de medias hora 24

Tratamiento	Células totales (x10 ⁸)
1	9.63 a
2	8.63 b
3	8.46 b
4	8.03 c
5	7.08 d
6	6.35 e
7	5.88 f
8	5.03 g

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente.

Tabla 9.- Análisis de varianza Hora 32.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P > F
Tratamientos	7	20737.625	2962.517	497.314	0.00
Error	16	95.312	5.957		
Total	23	20832.937			

P < 0.01

C.V.= 1.63 %

Cuadro 10.-Comparación de medias hora 32

Tratamiento	Células totales (x10 ⁸)
1	9.95 a
2	8.91 b
3	8.40 c
4	7.80 d
5	7.28 e
6	6.61 f
7	6 g
8	5.18 h

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente.

Cuadro 11.- Análisis de varianza Hora 40.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
Tratamientos	7	23094.625	3299.232	203.567	0.00
Error	16	259.312	16.207		
Total	23	23353.937			

P < 0.01

C.V.= 2.67 %

Cuadro 12.-Comparación de medias hora 40.

Tratamiento	Células totales (x10 ⁸)
1	10.2 a
2	8.81 b
3	8.4 bc
4	7.78 c
5	7.26 d
6	6.55 e
7	5.86 f
8	5.05 g

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente.

Cuadro 13.- Análisis de Varianza Hora 48.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
Tratamientos	7	25843.375	3691.910	777.884	0.00
Error	16	75.937	4.746		
Total	23	25919.312			

P < 0.01

C.V.= 1.47 %

Cuadro 14.- Comparación de medias hora 48.

Tratamiento	Células totales (x10 ⁸)
1	10.3 a
2	8.78 b
3	8.23 c
4	7.68 d
5	7.01 e
6	6.5 f
7	5.73 g
8	4.9 h

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente.

Cuadro 15.- Análisis de Digestibilidad in vitro.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	P>F
Tratamientos	7	1355.2031	193.600	39.900	0.00
Error	16	77.6328	4.8520		
Total	23	1432.8359			

P < 0.01

C.V.= 3.93 %

Tabla 16.- Comparación de medias de la digestibilidad *in vitro*.

Tratamiento	Media
1	68.927 a
2	63.3167 b
3	61.4233 b
4	57.4700 c
5	52.1833 d
6	50.9233 de
7	47.8033 ef
8	46.4067 f

*Medias con letras diferentes no son iguales estadísticamente.

