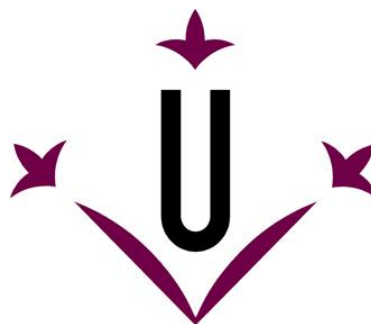




Universidad
Zaragoza



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

UNIVERSITAT DE LLEIDA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR ENGINYERIA AGRÒNOMA

TRABAJO FIN DE MASTER



Síntesis de proteína microbiana en el rumen en terneras de cebo:

Comparación de dos marcadores (Bases Púricas vs ^{15}N)

Alumno: Jesús Mora Gil

Tutor: Joaquim Balcells Terés

Cotutor: Manuel Fondevila Camps

Agradecimientos

Gracias a todos los que me han prestado su ayuda y apoyo, a los que menciono y a los que no, porque gracias a ellos este Trabajo fin de Master se ha hecho realidad.

En primer lugar agradecer al Profesor Joaquim Balcells Teres, del Departament de Producció Animal y a la vez tutor de este trabajo por todas sus explicaciones, sugerencias y confianza en este Trabajo. No menos importante el profesor Daniel Villalba Mata, por su ayuda, especialmente en el trabajo en granja así como el análisis estadístico. Gracias también a Manuel Fondevila, co-tutor del Trabajo por sus consejos e información aportada.

A la empresa “Can Sargaire” por la predisposición e ilusión en este proyecto, ofreciendo su granja.

A los trabajadores del laboratorio de Nutrició Animal de la Universidad de Lleida, en especial a Anna Ñaco y Dolors Cubiló, por tener paciencia en enseñarme y colaborar cuando faltaban horas.

A Xavier Cortès y Pilar Oliva, por el trabajo en granja y en laboratorio.

Y finalmente y no por eso menos importante amigos y familia, a mis padres Enric y Carme y mi hermana Meritxell.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	6
3.1 El animal rumiante y sus microbios.....	7
3.1.1 Bacterias	8
3.1.2 Protozoos.....	111
3.1.3 Hongos	112
3.2 Cuantificación de la producción de proteína microbiana en el rumen.....	13
3.2.1 Muestreo de la digesta.....	13
4. MATERIAL Y METODOS	19
4.1 Animales e instalaciones.....	20
4.2 Alimentos y diseño experimental	21
4.3 Preparación y administración de los marcadores de flux	23
4.3.1 Lignina Sulfurico.....	24
4.3.2 Iterbio Acetato (Yb-Ac)	24
4.4 Preparación y administración de los marcador microbiano	24
4.5 Procedimiento de muestreo y conservación de las muestras	26
4.5.1 Alimento.....	26
4.5.2 Heces	26
4.5.3 Contenido digestivo.....	26
4.6 Métodos analíticos	27
4.6.1 Principios inmediatos	27
4.6.2 Metabolitos ruminales	27
4.6.3 Iterbio y lignina sulfúrico	27
4.6.4 Bases púricas	28
4.7 Cálculos y análisis estadísticos	28
4.7.1 Flujos digestivos.....	28
4.7.2 Digestibilidad aparente.....	28
4.7.3 Ingestión Voluntaria.....	28
4.7.4 Contribución Microbiana a la digesta duodenal.....	29
4.7.5 Bases Púricas.....	29

4.7.6 Análisis Estadísticos.....	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONS.....	43
7. BIBLIOGRAFIA.....	45

Índice de Tablas

Tabla 1. Bacterias del rumen.....	8
Tabla 2. Protozoos del rumen y sustrato asociado.....	12
Tabla 3. Ingredientes y composición de nutrientes de las raciones.....	23
Tabla 4. Parámetros productivos.....	32
Tabla 5. Ingestión diaria y digestibilidad.....	34
Tabla 6. Parámetros ruminales.....	36
Tabla 7. Proteína microbiana en el abomaso.....	38
Tabla 8. N ingerido y flujo abomasal de N, total o microbiano.....	40

Índice de Figuras

Figura 1: Plano de la nave.....	21
Figura 2: Aspecto del pienso y el RCM.....	22
Figura 3. Protocolo temporal de preparación de alimento.....	24
Figura 4: Administración de marcadores.....	25

Abreviaturas

BP: Bases Púricas

PP: Ración pienso y paja

RCM: Ración completa mezclada con una forrajera “unifeed”

PV: Peso Vivo

MS: Materia Seca

MO: Materia Orgánica

PB: Proteína Bruta

EE: Extracto Eterio

FB: Fibra Bruta

FND: Fibra Neutro Detergente

FAD: Fibra Ácido Detergente

AA: Aminoácido

CMD: Crecimiento medio diario

MODI: Materia Orgánica Digerible Ingerible

MSI: Materia Seca Ingerida

BAL: Bacterias Asociadas a la fase Líquida

BAS: Bacterias Asociadas a la fase Sólida

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Los animales rumiantes tienen la capacidad de aprovechar recursos alimenticios abundantes como lo son los forrajes y otros alimentos ricos en carbohidratos estructurales a los cuales el sistema enzimático de los animales superiores no les permite acceder. No obstante estas especies han desarrollado un sistema de compartimientos de fermentación en los cuales se dan las condiciones óptimas para facilitar el crecimiento de las poblaciones microbianas simbióticas (bacterias, hongos y protozoos) que si son capaces de utilizar-los.

Dichas poblaciones fermentan los carbohidratos estructurales (Hemicelulosa, celulosa y pectinas) y producen como producto final de la fermentación (productos de excreción) ácidos grasos volátiles (AGV) que constituyen la principal fuente de energía para las especies rumiantes.

De forma colateral, en este proceso de fermentación, la proteína es fermentada también a péptidos, aminoácidos y finalmente a amoníaco que constituye a su vez la fuente de N fundamental para el crecimiento de la micro biota ruminal.

La masa microbiana que se produce en el rumen, como excedente de este proceso de fermentación, constituye la principal fuente de aminoácidos absorbida por los rumiantes. Así en cualquier tipo de ración la proteína microbiana sintetizada en el rumen constituye más del 50 % de la proteína absorbida en el intestino delgado. A pesar de la importancia que ello supone la proteína microbiana es cuantificada con escasa precisión (Webster, 1996) y ello es así dada la complejidad y escasa precisión de la metodología utilizada. Por ello los resultados se caracterizan por una elevada variabilidad.

Para la cuantificación del N de origen microbiano se precisa de una muestra digestiva post-ruminal (abomaso o duodeno) para determinar la proporción de proteína microbiana en el quimo. Este muestreo se puede realizar a partir de diferentes tipos de cánulas o post-mortem. Si se pretende además cuantificar el flujo total de proteína microbiana es necesario utilizar marcadores de flujo que permiten reconstruir el flujo total a partir de unas muestras parciales del quimo. En el primer

caso las cánulas pueden alterar el flujo y/o el comportamiento digestivo, en el segundo sólo podemos realizar un muestreo único.

Una vez obtenida la muestra digestiva es necesario identificar que proteína en el quimo es de origen microbiano discriminándola de la de otros orígenes (dietético, endógeno). Para este proceso se usan sustancias características de las poblaciones microbianas y que no estén presentes en los otros sustratos, a estas sustancias las definimos como marcadores microbianos. En el presente trabajo se pretende comparar la utilización de dos marcadores microbianos de diferente naturaleza (Bases puricas y N¹⁵) para estimar la producción de proteína microbiana y discernir las diferencias, de existir, pueden estar condicionados por el uso de raciones de diferente naturaleza.

Las raciones objeto del presente estudio serán, una convencional, a base de alimento concentrado (pienso) y paja de cereales y una segunda ración constituida básicamente por forrajes (tipo “*unifeed*”). En ambos casos la raciones experimentales se suministrarán “ad libitum” a terneras en cebo intensivo y condiciones comerciales de producción.

2. OBJETIVOS

Este trabajo se plantea un doble objetivo, a nivel pedagógico introducir y entrenar al alumno en el método de investigar. El segundo objetivo se basa en establecer un procedimiento que permita estimar la producción de proteína microbiana en condiciones prácticas de producción. Dentro de este objetivo distinguimos los siguientes objetivos parciales:

- i) Determinar la digestibilidad y producción de proteína microbiana en el rumen en terneras en cebo recibiendo “ad libitum” dos tipos de raciones, una ración convencional a base de pienso y paja (PP) y una ración forrajera (Ración completa mezclada: RCM) tipo “unifeed” .
- ii) Comparar en estas condiciones la precisión de un marcador microbiano natural como lo son las Bases púricas frente a un marcador isotópico N¹⁵.

3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

3.1 El animal rumiante y sus microbios

En el rumen conviven poblaciones microbianas en simbiosis con el huésped, estas poblaciones son mayoritariamente bacterias protozoos y hongos. Los microorganismos tienen la ventaja de aprovecharse del ambiente idóneo para su desarrollo y acceder así a ciertos nutrientes inaccesibles para el sistema digestivo del rumiante por falta de las enzimas adecuadas (Ben-Ghedalia, 1981), a cambio, el animal rumiante aprovecha de los productos de la fermentación (AGV) y de la masa microbiana generada durante el proceso de fermentación.

La cantidad de dichos microorganismos es de 10^{10} bacterias y 10^6 protozoos/ml (Czerkowsky, 1986), distribuyéndose en los ambientes que le sean más favorables, estos ambientes son, entre otros, la fase líquida, sólida o la pared ruminal

La mayor parte de microorganismos son anaerobios estrictos o facultativos, citar que el oxígeno puede acceder al ecosistema ruminal con el agua de bebida, durante la rumia o por difusión a través de la pared ruminal. El poco oxígeno es rápidamente utilizado como aceptador de electrones (Van Soest, 1994)

3.1.1 Bacterias

Según el sustrato que utilizan las bacterias ruminales pueden ser clasificadas en:

Tabla1. Bacterias del rumen (Yokoyama & Johnson, 1988)

Celulíticas	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Proteolíticas	<i>Ruminobacter amylophylus</i>
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>		<i>Prevotella ruminicola</i>
	<i>Ruminococcus albus</i>		<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
Hemicelulolíticas	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Productoras de NH ₃	<i>Streptococcus bovis</i>
	<i>Prevotella ruminicola</i>		<i>Megaspharea elsdenii</i>
	<i>Ruminococcus spp</i>		<i>Selenomonas ruminantium</i>
Pectinolíticas	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Ureolíticas	<i>Prevotella ruminicola</i>
	<i>Prevotella ruminicola</i>		<i>Succinivibrio dextrinosolvans</i>
	<i>Lachnospira multiparus</i>		<i>Selemonas spp</i>
	<i>Succinivibrio dextrinosolvans</i>		<i>Prevotella ruminicola</i>
	<i>Treponema bryantii</i>		<i>Ruminococcus bromii</i>
	<i>Streptococo Boris</i>		<i>Butyrivibrio spp</i>
Amilolíticas	<i>Ruminobacter amylophylus</i>		<i>Treponema spp</i>

	<i>Streptococcus bovis</i>	Utilizan lípidos	Anaerovibrio lipolytica
	<i>Succionomas amylolytica</i>		Butyrivibrio fibrisolvens
	<i>Prevotella ruminicola</i>		Treponema bryantii
Utilizan azúcares	<i>Treponema bryantii</i>		Eubacterium spp.
	<i>Lactobacillus ruminus</i>		Fusocillus spp
	<i>Lactobacillus vitulinus</i>		Micrococcus spp.
Utilizan ácidos	<i>Megaspharea elsdenii</i>	Productoras de CH ₄	Methanobrevibacter ruminatum
	<i>Selenomonas ruminantium</i>		Metanobacterium formicicum

3.1.1.1 Bacterias Celulíticas:

Son aquellas responsables de la degradación de los carbohidratos estructurales que constituyen de la pared celular y dentro de este grupo, algunas especies se especializan en la fermentación de la celulosa: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* (Dehority, 1993), o de la hemicelulosa: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* y *Ruminococcus spp* (Fondevila & Dehority, 1994). Este tipo de especies muestran una mayor especialización sobre el sustrato que las bacterias que fermentan carbohidratos solubles.

Se estima que a pH inferiores de 6 se reduce el crecimiento de las bacterias celulíticas y resulta ser 0 a $\text{pH} \leq 5.6$. Por tanto, dietas elevadas en carbohidratos no estructurales, provocan un descenso de pH y reducen el nivel y la eficiencia de fermentación de la fibra.

Las bacterias celulíticas son mayoritarias en dietas con altos % en carbohidratos estructurales y sus enzimas, las celulasas permiten la degradación de la fibra en disacáridos y componentes más simples (Yokoyama & Johnson, 1988).

Estas poblaciones tienen capacidad y preferencia por el amoníaco como fuente de N y las cadenas de carbohidratos ramificados, procedentes de la des-aminación de ciertos aminoácidos, actúan como factores de crecimiento.

3.1.1.2 Bacterias amilolíticas

Las bacterias amilolíticas tienen la capacidad de producir α -amilasa, enzimas extracelulares capaces de degradar el almidón (Yokohama & Johnson, 1988). Los títulos de estas bacterias incrementan en raciones con altos porcentajes de almidón, raciones ricas en granos de cereal y el tipo de fermentación será más resistente a cambios bruscos de pH. La concentración de especies amilolíticas es mayor que las celulíticas (Orskov & Ryle, 1998) y se asocian con producciones elevadas de ácido láctico, ya sea porque son sus productoras o porque limitan a su absorción.

3.1.1.3 Bacterias Proteolíticas

La gran mayoría de especies bacterianas tienen actividad proteolítica aunque se considera que dicha actividad es predominante en: *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio* y *Ruminobacter amylophilus*. Estas bacterias utilizan péptidos y aminoácidos que son degradados y desaminados hasta ácidos carboxílicos y amoníaco. Finalmente este amoníaco se utiliza para la síntesis proteica con una alta eficiencia (mayor de 0.7; ARC, 1984). La actividad proteolítica es dependiente de la pared bacteriana y la mayoría de proteasas son peri-plasmáticas. Es necesario el contacto físico entre ambos enzima y sustrato y un 75% de la actividad depende de la microbiota adherida al sustrato.

3.1.1.4 Bacterias metanogénicas

Son las bacterias capaces de producir metano, pertenecen al grupo *Archaeobacterias* (Stewart et al., 1980) y su función consiste en unir hidrogeniones H_2^+ con CO_2 , con un coste energético energía. A pesar del coste que supone este proceso, permite el mantenimiento de otros microorganismos y/o actividades como la fermentación de la celulosa al controlar el potencial redox y el pH del medio.

Las especies mejor adaptadas a las condiciones ruminales són las siguientes: *Methanosarcina*, *Methanomicrobium*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*.

3.1.2 Protozoos

Los protozoos son inferiores en número a las bacterias, entre 10^5 y 10^6 células/ml, pero por su dimensión pueden representar más del 40% de la masa microbiana total del rumen (Orpin, 1984) La mayoría de los protozoos del rumen son anaerobios estrictos y básicamente constituyen dos grupos taxonómicos: Holòtroficos del orden *Trichostomatia* y Entodiniomorfs del orden *Entodiniomorphida*. Los *Trichostomatia*, metabólicamente, utilizan principalmente carbohidratos solubles, y por tanto, aumentarían su número en dietas como las utilizadas en el cebo intensivo de terneros (Jouany, 1989). Por contra los protozoos *Entodiniomorphida* se multiplican en un ambiente propio de una alimentación rica en forrajes (Orpin, 1984).

Los protozoos tienen actividad proteolítica, aminopectidasa y desaminasa. Esta actividad puede triplicar la actividad proteolítica de las bacterias. No tienen capacidad ureasa y no pueden usar el N amoniacal para la formación de proteína propia.

Los protozoos participan en la degradación de los carbohidratos estructurales, favoreciendo la acción de las bacterias sobre estos sustratos (Orpin, 1984). Al tener capacidad de captar y secuestrar carbohidratos solubles, los protozoos evitan o tamponan cambios bruscos de pH y por tanto mantienen la actividad de la microbiota celulítica.

Hay raciones tan ricas en carbohidratos no estructurales (concentrados) que pueden provocar una disminución brusca del pH provocando la defaunación del medio y limitando las acciones tamponadoras de los ciliados en el medio. Los protozoos pueden aportar un 20-29% de proteína microbiana al flujo intestinal.

Tabla 2. Protozoos del rumen y sustrato asociados. (Van Soest, 1994)

Género	Especie	Sustrato
Holótroficos	Isotricha	Almidón y azúcares
	Dasytricha	Almidón y azúcares
Entodinomorfos	Entodinia	Almidón
	Epidinium	Almidón y hemicelulosa
	Ophryoscolex	Almidón
	Diplodinium	
	Eudiplodinium	
	Polyplastron	

3.1.3 Hongos

Los hongos fueron descubiertos en el sistema digestivo por Orpin (1975) y posteriormente se clasificaron los géneros más característicos: *Neocallimastrix*, *Caecomyces*, *Pyromyces*, *Orpinomyces*, (Van Soest, 1994). Todos estos hongos son anaerobios asociados a la fase sólida del contenido ruminal y esta situación les permite sobrevivir a pesar de su baja tasa de regeneración. Pueden llegar a representar hasta un 85% de la población ruminal y tienen la capacidad de fermentar tanto los carbohidratos estructurales como los no estructurales

Participan activamente en la digestión de las paredes celulares y las zoosporas son atraídas por quimiotaxis hacia las zonas lignificadas, desarrollando una red filosa que penetra en las paredes ligno-celulósicas, rompiendo así las estructuras lignificadas y favoreciendo la posterior actuación de las enzimas bacterianas (Van Soest, 1994). Podemos resumir a pesar de no ser imprescindibles para el funcionamiento del rumen, sí facilitan la degradación de las estructuras

lignificadas y actuar en las enzimas bacterianas. Algunas especies de hongos son capaces de degradar el almidón por efecto de la α -amilasa.

La población ruminal de hongos también contribuye en la degradación de la proteína, a pesar de que su grado de fermentación es menor que el de las bacterias.

Como excepción con otras poblaciones, los hongos se adaptan a los cambios bruscos del tipo de carbohidratos y a las variaciones de pH. En vacuno lechero variaciones de un 80% de concentrado a un 100% de forraje no se reflejaron en la población fúngica.

3.2 Cuantificación de la producción de proteína microbiana en el rumen

La proteína microbiana sintetizada en el rumen constituye una fracción importante del total de aminoácidos absorbidos en el duodeno, siendo siempre el componente mayoritario o incluso alcanzando la totalidad de la proteína absorbida (AFRC, 1992). Su cuantificación está condicionada por diferentes factores limitantes que pasaremos a describir a continuación.

3.2.1 Muestreo de quimo duodenal

3.2.1.1 Cánulas:

Esta es la forma más común para obtener muestras de muestrear el contenido digestivo y se trata, básicamente, de un sistema tubular mediante el cual nos permite muestrear el contenido digestivo. Distinguimos diversos tipos de cánulas, las cánulas de re-entrada que permiten la recolección de toda la digesta y por tanto su cuantificación y muestreo directo.

El inconveniente de este sistema de canulación es su implantación quirúrgica, que provoca interferencias físicas sobre el peristaltismo o por afectación indirecta del sistema nervioso, a parte, también genera espacios muertos en los cuales el quimo alimentario no circula o lo hace de forma deficiente, lo que provoca que aumenten los tiempos de retención.

La alternativa son las cánulas tipo “T” o simples que dejan un orificio permanente en el animal y que permiten recoger muestras puntuales de la digesta post-ruminal, normalmente se sitúan entre el abomaso y el duodeno, son menos agresivas con el animal, pero su uso está ligado con la utilización de marcadores de flujo para reconstruir el flujo total a partir de muestras puntuales.

Tanto en el caso de cánulas de reentrada como con las cánulas simples tipo “T” la implantación quirúrgica limita el número de animales experimentales.

3.2.1.2 Sacrificio.

La obtención de muestras detrás el sacrificio del animal permite muestrear el contenido digestivo (u obtener la totalidad del contenido, i.e. abomaso) a diferentes niveles de forma simultánea, es una prueba simple, económica y se puede usar un número amplio de animales.

3.2.2 Marcadores de Flujo

Los marcadores de flujo digestivo permiten reconstruir, a partir de muestras puntuales la totalidad del flujo en un espacio de tiempo (día/hora/minuto) que ha pasado por un tramo concreto (duodeno, abomaso). Se trabaja con sustancias que tengan características específicas, la primera es que sean indigestibles y no se puedan absorber en el tracto digestivo, así que, la cantidad suministrada ha de coincidir con la excretada o la que pasa (por unidad de tiempo) por un tramo concreto. Los marcadores además tienen que ser inertes, no deben alterar las enzimas digestivas ni reaccionar con el resto de componentes de la digesta.

Por último cabe considerar que sea una sustancia de determinación simple y que su procedimiento analítico esté perfectamente definido. Una sustancia que cumpla íntegramente todas estas características no existe y en la existente podemos encontrar descritas ventajas y desventajas de cada sustancia utilizada como marcador de flujo. (De Vega, 1991).

3.2.2.1 Marcadores únicos

Utilizar un marcador único ha sido el proceso más común y se han utilizado sustancias de diferente naturaleza, bolas de vidrio o plásticos en sus inicios, tintes etc. No obstante, las sustancias más utilizadas son aquellas cuya cinética sea similar a la de la digesta. Entre estas sustancias y por su importancia cabe destacar el Cr_2O_3 , el procedimiento se basa en suministrar el marcador un tiempo suficiente, previo al muestreo (que variará en función de la especie) 48-72 h en animales mono gástricos (i.e cerdos, aves) mientras que alcanzar el equilibrio marcador-digesta en rumiantes se alargará hasta periodos de 7-10 días.

Si asumimos que el marcador indigestible se encuentra en equilibrio en el tracto digestivo entonces la ingestión de marcador (I) ha de ser igual a su excreción (E) :

$I = E$ o: $I \text{ (g/día)} = \text{Flujo [en un tramo]} \times \text{Concentración del marcador en ese tramo.}$

Y por tanto el flujo conociendo, i) la concentración en las muestras y ii) la ingestión diaria de marcador, puede ser estimado: (Beever et.al, 1978).

$$\text{Flujo (g/día)} = I / ([c] \text{ marcador en el tramo}).$$

En marcadores de este tipo, (Cr_2O_3) se ha demostrado que puede haber recuperaciones incompletas del marcador relacionadas, bien con acumulaciones en ciertos tramos del digestivo, o bien con una sub/sobreestimación en el proceso analítico de cuantificación en el alimento o en el contenido digestivo.

El óxido de cromo es un marcador de fase única, no obstante sabemos que el contenido digestivo puede fluir en formas más diversas constituyendo diferentes fases “cinéticas”. En este sentido sería impracticable utilizar un marcador para cada una de las fases teóricas para que reflejase mejor su comportamiento cinético, por ello se ha llegado a un compromiso entre precisión y aplicabilidad con un sistema de doble marcado. Considerando con ello que existen dos fases mayoritarias, una sólida o particulada y la otra líquida. En este caso se debe usar un marcador para cada fase. Dentro del primer grupo podemos citar el óxido de cromo, acetato de Iterbio y de Europio. Mientras que en el segundo grupo como marcadores de fase líquida distinguimos el Cromo o el cobalto-EDTA como principales marcadores.

3.2.3 Marcadores microbianos

Una vez se ha podido muestrear el quimo en el tracto duodeno-abomasal, el siguiente paso, que caracteriza este procedimiento, es diferenciar la proteína de origen microbiano de la que no lo es. La parte no microbiana está compuesta a la vez por la proteína dietética que ha sido capaz de pasar ilesa la fermentación del rumen y una fracción endógena constituida fundamentalmente por células de descamación del rumen y restos de las enzimas digestivos. Por tanto, una sustancia que pueda ser considerada y definida como marcador microbiano ha de estar ausente en ambas fracciones, la dietética y la endógena. En este sentido cabe destacar que, mientras en el quimo duodenal hay gran cantidad de residuos endógenos, estos residuos son prácticamente ausentes cuando la cánula se sitúa a nivel del abomaso.

Las sustancias que puedan ser consideradas como marcadores microbianos han de ser, además, biológicamente estables, inocuas, tener una distribución homogénea y ser de fácil determinación analítica. Una vez más, como sucedía con los marcadores de flujo se debe remarcar que no ha sido descrito ningún marcador que cumpla a la perfección todas las definiciones.

Finalmente podemos distinguir dos tipos de sustancias marcadores de la población microbiana, aquellas que naturalmente forman parte de las células microbianas, como es el caso del ácido Di-amino-pimélico (DAPA), y que se clasifican como marcadores internos o naturales y aquellas de origen isotópico.

3.2.3.1 Marcadores Internos

a) Bases púricas:

La elevada concentración de ácidos nucleicos (AN) en las células microbianas y la rápida degradación de los AN de origen dietético en el rumen posibilitan usar estos compuestos como marcadores microbianos. Inicialmente las determinaciones se realizaban sobre el total de ácidos nucleicos (McAllan & Smith, 1973), posteriormente solo ARN y últimamente sobre las bases puricas (BP: adenina y guanina, Martin-Orue et al 1986).

La gran ventaja de los AN como marcadores microbianos es su distribución homogénea entre todas las poblaciones microbianas, no obstante cuando los valores derivados de estas sustancias (las BP) se comparan contra aquellos valores obtenidos con otros marcadores (Pérez et al., 1997) parece que existe una cierta sobreestimación, que se explica con la presencia de AN capaces de pasar ilesos la fermentación en el rumen. No siempre este proceso ha sido demostrado (Mota et al., 2008) y no existe la certeza de cuál es el valor real (cuando comparamos los valores derivados de dos marcadores) ya que no hay un valor de referencia suficientemente válido.

Un aspecto crítico del uso de las BP como marcador microbiano es la variabilidad de la composición (BP o la relación BP/N) que se han descrito dentro de las poblaciones extraídas del rumen (Martín-Orue et al 1986), la relación de BP/N en las bacterias aisladas de la fracción sólida (BAS) puede ser la mitad que la obtenida en aquellas aisladas en la fracción líquida (BAL Martín-Orúe et al.,1997) y similar a la aislada a partir las de los extractos protozoarios (Robinson, 1996; Vicente et al.,2004)

El ritmo de crecimiento, el tipo de sustrato, el plano de alimentación, el momento del muestreo son factores que pueden afectar también la relación de BP/N de las poblaciones microbianas.

3.2.3.2 Isotópicos o externos

La utilización de estas sustancias como marcadores microbianos se basa en su administración en forma inorgánica, de forma que el isótopo puede ser incorporado en las estructuras proteicas microbianas y así poder diferenciarlas de aquellas estructuras dietéticas o endógenas, que por ser inertes no pueden realizar este proceso de incorporación. Podemos diferenciar entre isótopos radioactivos, como el ^{35}S y el ^{32}P y aquellos no radioactivos o fríos como lo es el ^{15}N . La relación entre la actividad radioactiva (^{35}S , ^{32}P) o el enriquecimiento (^{15}N) determinada en los microorganismos y el quimo nos permite cuantificar la contribución de la proteína microbiana (marcada) a la total del quimo. Sólo cuando el isótopo se haya equilibrado en los compartimientos microbianos del rumen [48-96 h Pérez et al., (1996), ello implica que se ha incorporado de forma homogénea todas las poblaciones microbianas], podemos proceder al procedimiento de cuantificación. Normalmente los isotópicos son considerados los

marcadores de referencia. Por contra son extremadamente caros tanto en lo que refiere a su compra como en su utilización y análisis.

El ^{15}N es un isótopo estable y por tanto no es necesario el uso de instalaciones o personal especializado. Es el más práctico en el ámbito de la alimentación, ya que, al encontrarlo en forma de diferentes sales amonio [$^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$] o cloruro [$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$] se puede distribuir junto al alimento o por infusión ruminal. Su escasa presencia en condiciones naturales (0,3663%, AIEA) facilita su utilización como marcador microbiano, y se encuentra validado y referenciado en la bibliografía existente (Carro & Miller, 1999; Vicente *et al*, 2004; Mota *et al*, 2005; Belanche *et.al*, 2008). Las ventajas y desventajas son las que le corresponden como isótopo y ya han sido comentadas anteriormente.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Animales e instalaciones

Se han utilizado 24 terneras, cruces de Charoles x Limosín con un peso medio al inicio del experimento de 300 kg (terneras pasteros) y de 7 meses de vida. Se realizó el seguimiento de los parámetros productivos hasta los ≈ 400 kg de PV, y a partir de ese momento procedió a realizar los estudios de estimación de la síntesis microbiana en el rumen (ESMR) aprovechando para ello el sacrificio de los animales y así obtener las muestras necesarias en los diferentes tramos del digestivo.

Los animales se alojaron en una nave convencional semi-cubierta con suelo de hormigón y orientada al sur para evitar heladas y vientos dominantes. La nave está dividida en dos corrales idénticos, separando los dos lotes. Durante el experimento los animales dispusieron de cama de paja y agua limpia a voluntad. La prueba se realizó en el municipio de Almacelles (Segrià, Lleida).



4.2 Raciones y diseño experimental

Las terneras se dividieron al inicio de la prueba en dos lotes experimentales (12 terneras/lote) y se equilibraron por peso vivo. Ambos lotes fueron alimentados “ad libitum” con dos tipos de raciones, convencional a base de pienso (93 % total ingesta) y paja (7 % del total de la ingesta) [PP] o bien una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed”. La composición de ambas raciones esta detallada en la tabla 4. Los parámetros productivos (peso, crecimiento, ingestión voluntaria, etc) se controlaron en todos los animales, pero las pruebas de digestibilidad y las de ESMR se realizaron, dentro de cada lote, en un sub-grupo más reducido (6 animales/lote) seleccionadas por un criterio de docilidad.

Durante la totalidad del periodo experimental (120 días) el alimento del lote PP se administró semanalmente mientras que en el lote RCM se suministró cada dos días para evitar problemas de calentamiento y alteración del alimento. Los animales se pesaron semanalmente en una báscula de precisión (± 0.1 kg,) que se alojó durante la pesada al final de la manga de manejo situada en la parte posterior de la nave (Figura 1).

Figura 1: Plano de la nave.

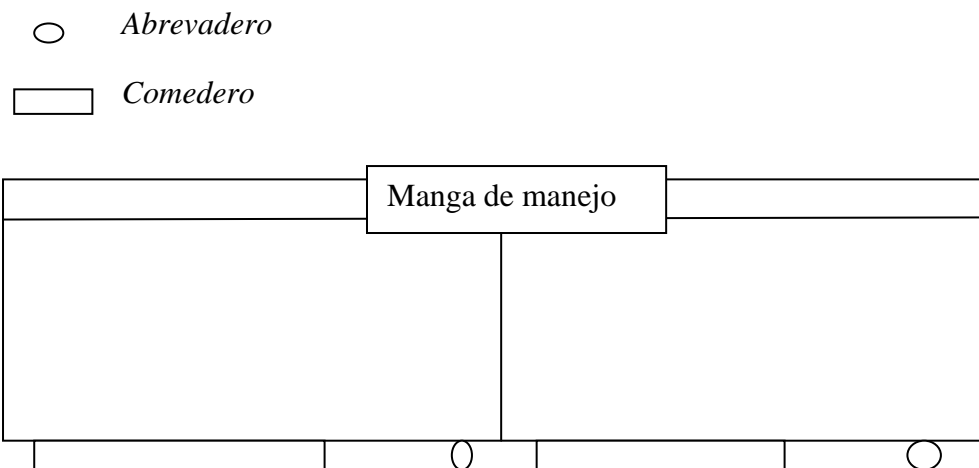


Figura 2: Detalle del pienso (PP) y la RCM previo a su suministro.



Tabla 3: Ingredientes y composición química de la ración

Ingredientes (%):	Pienso	RCM	Paja
Maíz	47.01	-	-
Torta Soja 47	5.8	-	-
Cebada	17.15	-	-
Altramuz	10	-	-
Glutenfeed	9.55	-	-
DDGG Maíz	6	-	-
Grasa	0.88	-	-
Aceite de Palma	0.5	-	-
Ensilado Ray grass	0	29.9	-
Ensilado Girasol	0	27,7	-
Pastone	0	42,2	-
Paja de cebada	0	0	100
Aditivo Mineral (1)	0	0.86	-
Composición Química (g/kg DM)			
MS	-	49.2	89,0
Cenizas	6.84	9.53	6,7
MO	93.2	90.5	93,4
PB	15.8	14.0	3,8
EE	6.30	7.2	2,5
FB	10.6	15,7	41,1
FND	29,3	26.2	74,4
FAD	12,3	15.2	44,6

MS: Materia Seca; MO: Materia Orgánica; PB: Proteína Bruta; EE: Extracto Etéreo; FB: Fibra Bruta; FND: Fibra Neutro detergente; FAD: Fibra ácido detergente

4.3 Preparación y administración de los marcadores de flujo

Para determinar la digestibilidad de las raciones, los niveles de consumo y el flujo duodenal se utilizó un sistema dual de marcadores externos indigestibles: la Lignina sulfúrico (LS) y el iterbio acetato (Yb). El período de administración fue de 10 días, 7

de los cuales se destinaron a equilibrar los marcadores en la digestivo, el resto a la recogida puntual de heces. Los protocolos de administración se presentan a continuación.

4.3.1 Lignina Sulfúrico (LS)

La lignina sulfúrico es un marcador interno, no requiere su administración y sólo un protocolo de muestreo que coincidió con el del Yb especificado posteriormente.

4.3.2 Iterbio Acetato (Yb)

El protocolo de administración y muestreo del Yb-Ac fue el siguiente, las dosis de Yb (2 mg Yb/Kg PV) diluidas en agua (0.8 g Yb /50 ml agua destilada) se administraron en dos tomas diarias (25 ml: a las 8:00 y 18:00 h, respectivamente) mediante una pistola de inyección oral. El protocolo de preparación de ambos marcadores se presenta en el cuadro adjunto. Para la infusión del marcador los animales eran inmovilizados en una caja tipo “Texas” situada provisionalmente al final de la manga de manejo. Durante la administración del marcador y a partir de los 7 días se procedió a tomar muestras fecales por colección directa del ano.

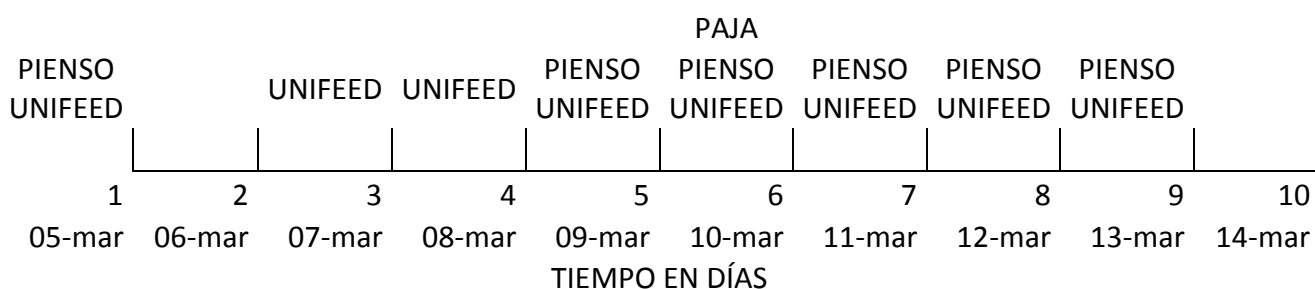


Figura 3. Protocolo temporal de preparación de alimento

4.4 Preparación y administración del isótopo

Como marcador microbiano exógeno se utilizó un isótopo no radiactivo, el ¹⁵N. Se trata de un átomo que existe en la atmosfera con un enriquecimiento natural de 0,366%, esto

es la proporción de átomos de N que poseen un neutrón más, ello permite distinguir-lo analíticamente siendo totalmente inocuo. El isótopo fue administrado en forma de cloruro de amonio ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) con un enriquecimiento del 10% a una dosis experimental de 2 mg $^{15}\text{N/g}$ N ingerido (Perez et al. 1986). El cloruro de amonio se administró mezclado con el alimento siguiendo el siguiente protocolo, La dosis calculada se mezcló inicialmente (en el laboratorio con 1 kg de alimento, PP o RCM) posteriormente en granja la pre-mezcla se volvió a mezclar con 30 kg de materia fresca del alimento previo a su suministro. El isótopo se administró cinco días (120 h) previos al sacrificio. Para ello se consideró que 72 h son suficientes para que el isótopo se equilibrase en el “pool” microbiano de N ruminal (Perez et al. 1986, comprobar). El nivel de enriquecimiento natural (background) se determinó en 2 de las terneras, (1/lote), escogidas al azar que no habían tenido contacto con el isótopo.

El protocolo de administración de los diferentes marcadores se presenta esquematizado en la figura 4, al final de la prueba experimental de los días 110 a 120 de la prueba (d_{110} - d_{120}).



Figura 4: Administración de marcadores y muestreos correspondientes al final del período experimental

4.5 Procedimiento de muestreo y conservación de las muestras

4.5.1 Alimento

Durante la administración del marcador (d_{110} - d_{120}) se recogió durante su elaboración una muestra de RCM y una muestra de pienso. La paja se muestreó una vez a la semana cuando se renovó la bala (400 kg). Las muestras se identificaron y almacenaron en bolsas de plástico a -20°C para su posterior análisis.

4.5.2 Heces

Cuatro días antes del sacrificio (d_{116} - d_{120} , Figura 4) se recogieron muestras de heces de los animales correspondientes al estudio de cinética de marcadores. El muestreo se realizaba en el mismo momento de la administración del Yb por el método de estimulación rectal y para evitar contaminaciones se almacenaban (-20°C) en recipientes de plástico estériles de 50 ml.

4.5.3 Contenido digestivo

Al final del ensayo (d_{120}), fueron transportados (7:00 h, por lotes experimentales) al matadero (INDELE S.A. Alcoletge, Segrià Lleida) donde fueron sacrificados (10.30 h) sin haber sido sometidos a ayuno previo y así optimizar la representatividad del muestreo digestivo. El protocolo de sacrificio fue el convencional (bala captiva) y en la cadena de despiece los aparatos digestivos fueron etiquetados, seccionados y separados de la canal (20 minutos tras el sacrificio) para proceder en la sala de vísceras al muestreo del rumen (parcial) y abomaso (total).

4.5.3.1 Digesta abomasal

Tras identificar el aparato digestivo, se disecó el abomaso y se muestreó su contenido por vaciado del órgano. Las muestras se refrigeraron inmediatamente (0°C) en el matadero y llevadas al laboratorio para congelar (-20°C) y liofilizarlas posteriormente.

4.5.3.2 Digesta ruminal

Tras el muestreo abomasal se procedió al rumen. Tras la apertura del compartimento se procedió a homogeneizar el contenido dentro de la propia víscera. Una vez homogeneizado el contenido se extrajo (500 ml) contenido ruminal que fue rápidamente refrigerado in-situ (0°) y transportadas al laboratorio para su muestreo y

extracción de bacterias ruminales. A la entrada al laboratorio el líquido ruminal fue muestreado, obteniéndose sendas muestras para el análisis de amoníaco (NH_3) y ácidos grasos volátiles (AGV). En el primer caso, dos ml de contenido ruminal se acidificaron con 2 mL de 0.2 N HCl, y se congeló (-20 °C) hasta su análisis. Las muestras para analítica de AGV, 2 mL de contenido ruminal, fueron mezclados con 1 mL de una solución conservante que contenía cloruro de mercurio (2 g/L), ácido ortofosfórico (20 ml/l) y ácido 4-metilvalérico (2 g/l, utilizado como patrón interno) en agua destilada.

El resto de contenido ruminal fue filtrado a través de una doble capa de gasa quirúrgica, el filtrado fue centrifugado en primera instancia a baja intensidad (500g: 7 min,) para descartar el precipitado (detritus alimentario), posteriormente en una segunda fase el sobrenadante se sometió a una centrifugación a alta intensidad (18.000g: 25 min,) recogiendo en este caso el precipitado que contenía las bacterias ruminales (BAL). El precipitado o “*pellet*” bacteriano se congeló (-20°C) hasta su posterior análisis.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Principios inmediatos

MS de alimentos y heces se determinó por secado en estufa (100°C) hasta peso constante. En el caso de bacterias y quimo se determinó por liofilización. MO ,PB, FB, EE se analizaron según AOAC (2004). La FND, FAD y LS se analizaron según Van Soest *et al.*, (1991)..

4.6.2 Parámetros ruminales

La determinación en el contenido ruminal se realizó en el caso del NH_3 por colorimetría según Chaney and Marbach (1962) y los AGV por cromatografía de gases según Jouany (1982). La abundancia isotópica se determinó por un espectrofotometría de masas (VG PRISM II, IRMS conectado a un catalizador DUMAS-style N analyser EA 1108, Carlo Erba, Milan, Italy), el enriquecimiento isotópico corrigiendo por la abundancia natural determinada en los animales que no recibieron el isótopo.

4.6.3 Iterbio

El Iterbio se determinó según el procedimiento descrito por Vega &Poppi, (1997), así 0.2 g de las muestras (pienso, heces y quimo) previamente molidas (0,1mm) se digirieron en (15 ml en una proporción 4/1 de HNO_3 y HClO_4 diluidos ambos al 70%)

durante 12 h. Después de este período la digestión continuó en un baño de arena (100°C) incrementado progresivamente la temperatura (100° C/hora) hasta llegar a los 400^a C. Se consideró que la digestión de la MO había sido completa cuando la muestra alcanzó un aspecto totalmente transparente (volumen residual ≈ 5 ml). Finalizada la digestión la muestra se filtró (Whatman 0.1 mm) y se diluyó hasta 25 ml para ser analizada por espectrometría de absorción atómica.

4.6.4 Bases púricas:

El análisis de las Bases púricas, tanto en el rumen como en el abomaso se analizaron a por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a partir del método propuesto por Balcells *et al.* (1992).

4.7 Cálculos y análisis estadísticos

4.7.1 Flujos digestivos:

Flujo abomasal (Fa) de MS, MO, Fibra, N y NM se determinaron a partir de la cantidad de Yb administrado (Q_{It}) dividido por la concentración [Yb] del marcador en cada uno de los sustratos (MS, MO, Fibra, N y NM) en el quimo.

i.e: Flujo_(MS) = $Q/[Yb_{(MS)}]$.

Para realizar los cálculos se asume que la recuperación de Yb en abomaso es total.

4.7.2 Digestibilidad aparente

La digestibilidad aparente de los diferentes componentes de la digesta (MS, MO, Fibra, N) se determinó a partir de las concentraciones de la lignina sulfúrico en el alimento [M_i] en relación a la concentración del marcador en heces [M_f] a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Digestibilidad Aparente}_{(MS)} = 1 - ([M_i]_{MS} / [M_f]_{MS})$$

4.7.3 Ingestión Voluntaria:

La ingestión voluntaria se calculó en función de:

(i) excreción fecal de MS (E_{FMS}):

$E_{FMS} = Q_{Yt} / [Yb_f]$, siendo Q_{Yt} = la cantidad de Yb administrada y $[M_f]$ = la concentración del marcador (Yb) en heces.

(ii) la digestibilidad fue calculada en base la concentración en heces y alimento de LS:

$$\text{Digestibilidad MS} = 1 - ([LS_i]_{MSI} / [LS_f]_{MSFecal});$$

Finalmente la Ingestión Voluntaria (IV) se calculó en base a:

$$MSI = MSE (Yb) / (1 - \text{Digestibilidad MS (LS)})$$

4.7.4 Contribución Microbiana a la digesta duodenal:

El origen del N en la digesta post-ruminal o abomasal fue determinado utilizando dos marcadores microbianos: interno, las bases puricas y uno isotópico, el ^{15}N .

La proporción de proteína Microbiana se determinó a partir del enriquecimiento de ^{15}N (E) determinado en el N abomasal (E_{Digesta}) y a las bacterias (E_{LAB})

$$MN/N_{\text{digesta}} = E - N_{\text{digesta}} / E - N_{\text{LAB}}$$

El enriquecimiento isotópico se calculó por diferencia en la tasa ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) entre las muestras obtenidas tras (120 h) la administración del isótopo y las obtenidas en los animales que no tuvieron contacto con él.

4.7.5 Bases Púricas:

De forma similar al modelo utilizado para el ^{15}N la proporción de N microbiano en el N duodenal se estimó a partir de la concentración de BP (mmol)/N(g), en el quimo (o digesta duodenal) $[BP_{\text{quimo}}]$ en relación a la concentración obtenida en las bacterias ($[BP]_{\text{Bacterias}}$) según la siguiente relación:

$$NM/N_{\text{digestivo}} = ([BP_{\text{quimo}}]) / ([BP]_{\text{Bacterias}}):$$

Para estos cálculos se asume que las bases púricas en el abomaso son de origen exclusivamente microbiano.

4.7.6 Análisis Estadísticos

Los datos fueron analizados en un diseño donde los animales estaban jerarquizados al tratamiento. El tratamiento fue el factor fijo mientras que el animal fue el aleatorio según el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + A_{j(i)} + E_{ij}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo se planteó, ya desde sus inicios, desde una perspectiva práctica y la idea consistió en determinar la producción de proteína microbiana en animales en condiciones prácticas de producción, es decir: i) no alterados quirúrgicamente (sin cánulas implantadas); ii) sin alterar las condiciones de producción (i.e. confinar los animales en jaulas metabólicas), iii) manteniendo el comportamiento de grupo.

Cumplir estas tres condiciones experimentales no ha estado exento de dificultades, tal como será descrito en los próximos apartados.

5.1 Ingestión Voluntaria y Digestibilidad

La primera dificultad fue la de determinar los valores individuales de IV, dado que las medidas de ingestión (alimento suministrado y rehusado) correspondían al lote (ver Cortés, 2012) y solo tendrían una utilidad orientativa dada la variación individual existente, tanto en los niveles de ingestión como en la ESMR. Los valores de ingestión individual se estimaron a partir de un sistema de doble marcado, el primer marcador, de flujo (Iterbio; Yb) y un segundo de digestibilidad (lignina sulfúrico: LS). En el caso del primero, se administraba una dosis conocida de Yb, que deberíamos detectar en los diferentes tramos del intestino, especialmente en el caso del abomaso y las heces. Conociendo la dosis del marcador administrada (ver apartado 4.3 a Material y Métodos) y la concentración del marcador en las heces es posible calcular el flujo de MS fecal.

Conocida la excreción de MS, para el cálculo de la IV individual es necesario además utilizar un segundo marcador que nos permitiera determinar, i) la digestibilidad de la MS ii) Excreción fecal y digestibilidad nos permite obtener los valores de ingestión individual. El segundo marcador fue la lignina sulfúrico, porque su utilización conlleva la mínima alteración sobre los animales experimentales.

El Yb se administró en dos dosis diarias (Ap. 4.3), para ello los animales eran conducidos a la manga de manejo donde eran inmovilizados para proceder a la administración de Yb. Esta tarea requirió una cierta docilidad de las terneras, que no todas las terneras mostraron y por esa razón uno de los animales fue descartado para evitar accidentes, este animal era del lote PP así que el número de individuos de ese lote se redujo a 5.

En la tabla 4 se presenta la IV por lotes y corresponde a la totalidad del período experimental (120 d. Diciembre 2011-Marzo 2012)

Tabla 4: Parámetros productivos registrados a dos lotes de terneras, cruces de (Charoles y Limousine; n =24) alimentadas con una ración convencional basada en pienso y paja “ad libitum” [PP] o una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed”.

Ítem	Tratamiento				
	PP (1)	RCM(2)	ES(3)	Sig(4)	P<
Peso Vivo					
<i>Inicial (Kg)</i>	230 ,4	234,9	6,25	NS	0,6196
<i>Final (Kg)</i>	374,1	350,4	6,35	*	0,015
GMD, Kg/d	1,205	0,965	0,047	**	0,0017
Ingestión MS (Kg MS/d)	6,97	5,75	-		-
<i>Concentrado (Kg DM /d)</i>	6,50	-	-		-
<i>Paja (Kg MS /d)</i>	0,47	-	-		-
Índice Conversión (Kg/Kg)	5,80	5,96	-		-

(1)Ración compuesta por pienso y paja “ad libitum” (2) Ración completa mezclada tipo “unifeed”; (3) Significación estadística del efecto tratamiento sobre los valores medios obtenidos.

Las terneras que recibieron la ración PP mostraron un mayor nivel de ingestión de MS (P<0.001) que aquellas alimentadas con la ración RCM (6,97 vs 5,75 Kg de MS por PP y RCM respectivamente), y ello se reflejo en un mayor nivel de crecimiento (1,205 vs. 0,965 por PP y RCM, respectivamente [P<0.015]) mayor peso vivo (374 vs 350 Kg por PP y RCM, respectivamente [P<0.015]). En este caso es necesario precisar que los animales fueron distribuidos inicialmente para conseguir el mismo peso inicial (230 vs 234 Kg por PP y RCM, respectivamente [P<0.62]). Cabe destacar que los animales que recibieron la dieta concentrada, mostraron mayores niveles de ganancia media diaria pero no por ello utilizaron la ración de forma más eficiente ya que los IC (GMD/ IV)

fueron similares (5.80 vs 5.96 Kg/kg). La relevancia estadística de las diferencias no pudo ser evaluada ya que los datos de ingestión voluntaria eran grupales.

En relación a la ración concentrada los animales mostraron un consumo medio diario de paja de 0.32 Kg, que representa un 7 % del consumo total diario de MS, este se sitúa dentro del rango propuesto por FEDNA (2003) para terneras de cebo intensivo y dentro del rango obtenido por aquellos autores que trabajaron en condiciones experimentales similares (Balcells et al 2012; Devant et al 2007).

Los niveles individuales de IV registradas durante el período experimental se presentan a la tabla 5, los términos que se muestran son IV de MS e IV de MOD (MODI: MOI x Digestibilidad de la MO]. En general las ingestiones de MS registradas (4.46 vs 5.53 Kg de MS para los animales que ingirieron PP y RCM, respectivamente) fueron inferiores a las registradas por lotes durante la totalidad del período (6,97 vs 5,75 Kg de MS para PP y RCM). Es decir, las estimaciones de los consumos realizadas a partir del sistema de marcadores fue, aproximadamente un 25 % inferior a la registrada por lotes. Dos razones podrían justificar las diferencias existentes, la primera estaría relacionada con una recuperación incompleta del marcador debida a razones metodológicas, básicamente, por una subestimación cuantitativa en el análisis fecal (Vega & Poppi 1997), en una hipotética retención del marcador en ciertos compartimentos cinéticos del digestivo (Mota et al 2008) o la eliminación del marcador (caso del Yb) por otras vías que podrían incluir la orina o el sudor (Mota et al. 2008).

Otra posibilidad que debe ser considerada es un descenso en la IV durante el período experimental (días 110-120) debido al estrés inducido por el manejo, confinamiento en la manga y la inmovilización, así como el muestreo fecal. Es necesario considerar que los animales se sometieron dos veces diarias al proceso de muestreo y las terneras eran animales criados en semi-libertat (procedían de la dehesa) y no habían tenido apenas contacto previo con ninguna actividad humana. En este sentido es necesario señalar, i) la estrecha correlación que se obtiene entre los niveles individuales de GMD durante este periodo y el consumo voluntario estimado mediante la técnica de marcadores ($r=0,81$; $P<0,002$) y ii) En el periodo de muestreo las ingestiones medias por lote coinciden prácticamente con las ingestiones estimadas con el sistema de marcadores. Por todo ello, es probable que sea el estrés metodológico inducido en los animales la causa más probable entre las diferencias registradas.

Tabla 5. Ingestión diaria de materia seca (MSI), materia orgánica digestible (MODI) y digestibilidad aparente y ruminal registradas en terneras cruzadas (Charoles y Limousine; n =12) alimentadas “ad libitum” con una ración basada en pienso y paja [PP] o una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed”.

	PP	RCM	<i>Pienso</i> ₍₁₎	<i>Paja</i>	ES ₍₂₎	P ₍₂₎ <	Sig
Ingestión (g/d)							
MSI	4.46	5.53	4.14	0.32	0.323	0.04	*
MODI	3.62	4.60			0.281	0.03	*
Digestibilidad Aparente							
MS	0.87	0.91	-	-	0.011	0.03	*
Digestibilidad Ruminal							
MS	0.67	0.77	-	-	0.043	0.18	NS

(1) Consumo individual de pienso y paja asumiendo que la relación de ingestión de ambos refleja la registrada en los lotes.

(2) Error estándar residual y significación del efecto tratamiento.

Es difícil contrastar los consumos obtenidos con el lote RCM con otros autores que hayan utilizado metodología similar durante el cebo, es cierto que los datos en vacuno lechero son abundantes pero tiene un escaso sentido validar o comparar los resultados obtenidos con animales en fases productivas diferentes. Sí podemos contrastar los datos registrados en las terneras que consumían la ración la ración PP, cuyos consumos en MS equivaldrían a un rango entre 1.5-1.7 % del PV (ingestión de MS/ PV animal). Dichos valores, no difiere de forma relevante de las recomendaciones existentes para terneras de este tipo en condiciones de explotación intensiva (2%, ARC 1980) y ambos estarían dentro del rango descrito en ensayos de características similares [1.3-2.3 %; Devant et al. 2007; Martin Orue et al. 1997; Pereira et al 2007].

Los crecimientos (GMD) obtenidos en ambos grupos de terneras estarían dentro del rango descrito para esta especie y condiciones de producción intensiva. Una amplia

discusión de nuestros resultados y su comparación con aquellos obtenidos en otros trabajos ser encontrado en Cortés (2012).

En relación a la digestibilidad, los datos se presentan también en la Tabla 5 y corresponden a los datos obtenidos a partir de los dos marcadores de flujo, la LS e Yb. En relación al primero de los marcadores la LS. La tasa de digestibilidad se ha calculado a partir de la diferencia entre las concentraciones del marcador en heces y alimento según las ecuaciones propuestas en Ap. 4.7. En el caso de la ración PP la concentración de marcador en la ingesta se calculó corrigiendo la concentración del marcador en el pienso por la dilución debida al consumo de paja. El consumo de medio de paja fue calculado a partir del consumo por lote durante la fase experimental.

De esta forma las tasas de digestibilidad obtenidas (0.87 vs 0.91 para PP y RCM, respectivamente; ES 0,011, $P < 0.03$) fueron superiores en el lote RCM. En el caso de la digestibilidad ruminal, aunque las diferencias numéricamente se mantuvieron, las diferencias registradas no alcanzaron significación estadística (0.67 vs 0.77; para PP y RCM, respectivamente ES 0.04; $P > 0.05$). Las digestibilidades registradas son en general elevadas cuando las comparamos con otros ensayos realizados en condiciones similares (0.6-0.7, Devant et al. 2006; Martin Orue et al. 1997; Overton et al., 1995; Yang et al., 1997). La reducción en los niveles de ingestión relacionados con el estrés experimental podría situar al digestivo en un proceso de desequilibrio y ello reflejarse en las tasas de digestibilidad.

5.2 Parámetros de la fermentación ruminal

En la tabla 6 se presentan los datos de la concentración de amoníaco, ácidos grasos volátiles (AGV), y a la proporción de los AGV, acético, propionico y butírico. En esta tabla no figura el pH, efectivamente, las muestras de rumen son *post-mortem* y durante el sacrificio no fue posible acceder al contenido ruminal y por tanto los niveles de pH no se pudieron determinar inmediatamente. Por este motivo se decidió no registrarlas y por tanto se presentan únicamente los resultados de las concentraciones de NH_3 y AGV. Los animales que consumieron la ración PP muestra un mayor contenido en PB y ello podría reflejarse en una mayor concentración de su producto de degradación, el amoníaco, aunque las diferencias registradas en las concentraciones no alcanzaron significación estadística. En

cualquier caso, en ambos casos (124.1 vs 95.6 mg NH₃/l para PP y RCM) las concentraciones registradas fueron superiores a los 50 mg/l considerados como el valor umbral para un crecimiento adecuado de la flora microbiana (Satter & Rofler, 1975).

En general uno de los puntos más críticos en la alimentación intensiva de terneros, el caso de la ración PP, son los bajos niveles de amoníaco que comúnmente se registran en el rumen, así en la mayoría de los casos las concentraciones registradas serían limitantes para un correcto crecimiento microbiano (≤ 50 mg/l; Martin Orue et al. 1997; Overton et al., 1995; Yang et al., 1997), este no sería nuestro caso aunque nuestros valores podrían estar comprometidos por el amplio margen de tiempo entre muestreo (ruminal) y la determinación de NH₃. La concentración de AGV (130,0 vs 126 mmol/l ES: 12.19 para PP y RCM, respectivamente) registradas no difirieron entre tratamientos y se situarían en el rango descrito en la literatura existente.

Tabla 6. Concentración de NH₃, AGV y sus proporciones molares en terneras cruzadas (Charoles y Limousine; n =12) alimentadas con una ración convencional basada en pienso y paja “ad libitum” [PP] o una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed”. (Mejorar estéticamente la tabla)

<i>Concentración</i>	Tratamiento		ES⁽²⁾	P<	Sig
	PP	RCM			
N-NH ₃ (mg/100 ml)	124,1	95,6	22,10	0,229	NS
Total AGV (mM)	130,0	126,5	12,19	0,785	NS
<i>Proporción Molar AGV (%)</i>					
Acetato	65,70	67,27	0,7165	0,0567	T
Propionato	15,48	14,57	0,7630	0,2643	NS
Butirato	14,43	15,42	0,7747	0,2348	NS
Tasa acetato/butirato	4,59	4,37	0,2627	0,4336	NS

Las proporciones de cada AGV fueron modificadas por el tratamiento, la ración RMC, más forrajera, mostró una mayor concentración de acético (65.7 vs 67.8 ES: 0.71;

$P < 0.05$) y una menor proporción (numérica: $P < 0.26$) de propiónico (15.5 vs 14.5 ES: 0.76). La tasa acetato/propionato reflejó la diferente distribución entre ambos AGV. No se detectaron diferencias en la concentración de butirato.

5.3 Composición de las bacterias del rumen.

Los métodos para determinar la producción de proteína microbiana en el rumen requieren una fracción microbiana representativa de la que llega al sistema enzimático del rumiante (generalmente abomaso o duodeno) para establecer allí la relación entre el marcador microbiano y la sustancia que se pretende estudiar, normalmente el flujo de proteína o aminoácidos. Este problema se complica cuando vemos que durante la digestión en el abomaso la mayor parte de las bacterias son destruidas bajo la actividad ácida y la actividad de la pepsina gástrica, por tanto en el duodeno sólo encontramos bacterias ácido –resistentes. Si las bacterias han perdido la integridad celular la relación marcador/población en un extracto aislado en el duodeno es escasamente representativa de la población que abandona el rumen (Martin-Orue et al. 1997).

Por este motivo la muestra microbiana donde establecer la relación marcador/N ha de ser aislada en un lugar de muestreo previo al abomaso, es decir el rumen. De forma que la información más común corresponde a las bacterias extraídas de la fase líquida del rumen (AFRC, 1993) asumiendo que esta fracción de bacterias, fácilmente aislables (BAL), representa el total de la población. No obstante, se ha demostrado recientemente que las bacterias asociadas a la fracción sólida o particulada (BAS) pueden ser predominantes al contenido ruminal e incluso en aquella fracción que finalmente abandona este compartimento (Faichney 1975).

Si las especies de bacterias de ambas fases son diferentes (Minato et al. 1990) y lo es su composición química (Merry y McAllan, 1983) entonces la composición de BAS debería ser considerada. El problema de esta segunda opción es metodológico y radica en la dificultad de aislar una población representativa de las BAS. Aislar las BAS requiere a un proceso previo de desligamiento celular. Para ello se han ensayado diferentes procedimientos (mecánicos, jabones, competencia de sustratos etc.) con niveles diferentes de recuperación, pero en cualquier caso nunca completo y por tanto, tiene dudable representatividad. No se puede afirmar que las diferencias químicas que se han determinado entre ambas fracciones (BAL vs BAS) son reales o son sólo un artefacto del

proceso de aislamiento (Martin-Orue et al. 1997). Ante esta incertidumbre y dada la orientación de este trabajo, eminentemente práctica, se utilizará únicamente la fracción convencional BAL, de valores más consistentes y una base de datos más amplia.

En relación a la incorporación del isótopo como marcador microbiano, la administración del cloruro de amonio marcado (10 % enriquecimiento, 120 h de infusión) dio lugar a un marcaje consistente, prácticamente se duplica el enriquecimiento natural, tanto en las N de las bacterias como el del quimo, y la intensidad del enriquecimiento no difiere entre ambos tipos de ración. El enriquecimiento natural no difirió entre los dos animales “blanco”, es decir aquellos que no tuvieron contacto con el isótopo. Tampoco se apreciaron diferencias en el contenido en bases púricas ni en la tasa BP/N de las bacterias relacionados con el tratamiento experimental (Tabla 7).

Tabla 7: Origen de la proteína microbiana en el abomaso determinada a partir del enriquecimiento de ^{15}N o la concentración de BP en bacterias ruminales (BAL) en terneras cruzadas (Charoles y Limousine; n =12) alimentadas “ad libitum” con una ración convencional basada en pienso y paja (PP) o una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed”. (Mejorar la estética y simetrías de la tabla, no seas zafio)

NM en Abomaso (%)	^{15}N	BP	ES_1	Sig_1
RCM	67,8	62,7	4,00	NS
PP	53,2	52,9	4,38	NS
ES_2	4,36	7.16		
Sig_2	**	NS		

(1)Error estándar y significación del efecto entre marcadores

(2)Error estándar y significación del efecto entre raciones

5.4 Síntesis de Proteína microbiana en el rumen.

Una de las opciones posibles para obtener muestras de quimo o digesta post-ruminal es su obtención -post-mortem- tras el sacrificio inmediato de los animales. De esta forma se obtuvieron en este experimento y para que las muestras fueran representativas deberían cumplirse dos condiciones, obtener una cantidad de muestra que permita

establecer con precisión la concentración del marcador en este tramo del digestivo (Belanche et al. 2008), la segunda es que la pauta de infusión se mantuviera. En nuestro caso las limitaciones experimentales fueron evidentes y las terneras fueron transportadas al matadero de madrugada y con ello la última dosis de marcador no pudo ser infundida. Por otra parte, el tiempo que transcurrió desde la entrada en matadero de los animales hasta su sacrificio se alargó y un cierto vaciado abomasal fue inevitable. Ambos puntos deben de ser considerados al analizar y discutir los presentes resultados

A partir de una amplia revisión de trabajos, el ARC (1984) propone que una fracción relativamente constante de lo MO lo es en el rumen (65 % en raciones). En nuestro caso las digestibilidades registradas utilizando la LS como marcador no se alejaron de este rango y fueron de 0.67 y 0.77, ES 0.043 $P < 0.18$ significación en los animales que ingirieron PP y RCM, respectivamente.

En la tabla 8 se presenta el flujo abomasal de N, que fue muy inferior al del N ingerido y por tanto la pérdida de N en el rumen fue relevante. Pérdidas netas de N en el rumen podrían estar relacionadas con dos factores, la primera podría ser un artefacto de la técnica y estar relacionada con las limitaciones potenciales de la LS como marcador de flujo y en este caso podríamos registrar una subestimación significativa del flujo de MO y N a través del . El segundo caso serían unas pérdidas reales de N.

En este sentido cabe señalar que las concentraciones de PB de la ración fue elevada (>15 %) y que además el tipo de proteína suministrada se caracteriza por una elevada degradabilidad y probablemente en este caso la producción de amoníaco podría superar, en ambas raciones, la capacidad de incorporación de N a la proteína microbiana y por tanto este excedente sería absorbido y excretado en la orina en forma urea.

Tabla 8. Valores medios del N ingerido y flujo abomasal, total o N microbiano estimado a partir de dos marcadores microbianos, interno (bases púricas; BP) o externo (isotópico: ^{15}N) en terneras post-mortem. Se utilizaron terneras cruzadas (Charoles y Limousine; n =12) que fueron alimentadas con una ración convencional basada en pienso y paja “ad libitum” [PP] o una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed”. El contenido abomasal fue recogido inmediatamente tras el sacrificio.

Flujo de N (g/N d)	Tratamiento				
	PP	RCM	ES	P<	Sig
Ingesta	102.7	123.4	7.38	0.08	T
Abomasal	63.82	65.33	8.46	0.92	NS
N Microbiano					
^{15}N	34.05	42.30	5.17	0.42	NS
Bases Puricas	33.56	35.53	3.89	0.79	NS
Eficiencia Síntesis : gN microbiano/kg MODI					
^{15}N	19.33	24.45	1.13	0.01	*
Bases Puricas	19.24	22.02	1.82	0.31	NS

La contribución media del N microbiano (NM) a la digesta abomasal fue próxima al 60 % (58.7 %), esta contribución no fue independiente del tratamiento experimental y fue inferior en aquellos animales que recibieron la ración PP (53.3; SE 4.3) que en aquellos que recibieron la ración forrajera (RCM; 67.8 SE 4.3), utilizando el ^{15}N como marcador microbiano. En el caso de las bases púricas, la contribución microbiana al flujo duodenal fue algo inferior (52.9 % SE7.16) y las diferencias inducidas por el tratamiento experimental no fueron tan evidentes. Para este tipo de especie, sistema de producción y ración el aporte microbiano a la proteína absorbida se situaría en el amplio rango propuesto en la bibliografía existente. (Vicente et al 2004; Martin-Orue et al 1997).

Considerando el ^{15}N como marcador de referencia la mayor contribución de NM a la digesta duodenal debe ser explicada en términos de una mayor síntesis o producción de NM en los animales que recibían la ración RCM en relación a aquellos que recibían la ración concentrada (42.30 vs 34.5 g/d SE 5.17 P<0.42). Lo bajos niveles de producción de NM en los animales alimentados con dieta más concentrada ha sido descrito previamente (AFRC, 1992; ARC 1984) y coincide con la mayoría de trabajos que han identificado esta fracción en terneras en crecimiento (Devant et al. 2006; Martin-Orue et

al. 1997; Balcells et al. 2012, Vicente et al 2004). Estos bajos niveles de síntesis reflejan las condiciones de fermentación inherentes a este tipo de raciones, compuestas mayoritariamente por hidratos de carbono no-estructurales (i.e almidón) (> 90 % de la MS ingerida). El impacto de este tipo de raciones es variable, pero en general se induce una fermentación propiónica más que a nivel energético es más eficiente pero que se caracteriza por una rápida y elevada producción de AGV, especialmente lactato. Ambos factores reducen y limitan las condiciones de fermentación reduciendo los niveles síntesis microbiana (ARC, 1984). Al administrar una ración más forrajera, la RCM inducimos, probablemente, un tipo de fermentación celulítica, más equilibrada que permite mejorar los procesos de síntesis en el rumen.

En relación a la eficiencia de síntesis microbiana g NM/Kg MODI los valores obtenidos se situarían en los niveles más bajos de los que podemos encontrar en el bibliografía existente (ARC, 1984; AFRC 1992, INRA 1978) como correspondería a raciones con un elevado nivel de carbohidratos no estructurales, obteniendo mayores niveles de eficiencia al incrementar la contribución de forrajes en la ración (Tabla 8).

5.5 Marcadores microbianos: Valoración.

La utilización de ambos marcadores microbianos dio lugar a valores de de NM y eficiencia de síntesis desiguales, los valores estimados a partir del ^{15}N fueron ligeramente superiores a los valores obtenidos a partir de las bases puricas (Tabla 7 y 8) sin embargo es difícil establecer cuál de ellos es el valor real dado que no existen un patrón fijo de referencia. En principio, dentro de cada ración la proporción o contribución de NM a la digesta abomasal no difirió entre marcadores microbianos ($P>0.05$) así los valores estimados para RCM fueron de 67,8 y 62.7 % SE 4.00 y para PP de 53.2 y 52.9 % SE 4.38 (utilizando ^{15}N y BP, respectivamente). Sin embargo, cuando ambas raciones fueron comparadas, la contribución del NM a la digesta abomasal estimadas con el isótopo mostraron diferencias significativas entre raciones, así la proporción de NM fue mayor ($P<0.05$) en los animales que habían ingerido RCM que aquellos alimentados con PP (67.8 vs 53.2 % SE 4.36; $P<0.01$). Cuando se utilizaron las BP como referencia, aunque las diferencias numéricas entre raciones se mantuvieron (62.7 vs 52.9, SE 7.16 $P>0.05$) las diferencias estadísticas no alcanzaron, en este caso, significación estadísticas dada la mayor variación residual registrada con las BP.

A partir de nuestros resultados no se puede afirmar que las bases púricas tiendan a sobre-estimar la contribución microbiana al flujo duodenal por la presencia en el quimo de purinas by-pass, sino al contrario de las BP se derivaron menores estimaciones coincidiendo con trabajos recientes en los que se han comparado ambos marcadores (Belanche 2012; Belanche *et al* 2013). Sin embargo, la mayor precisión en el marcado isotópico de la proteína microbiana permite evidenciar diferencias entre tratamientos que quedan enmascarados por la variación residual con las bases puricas.

Por ello a partir de nuestros resultados y para la metodología que se describe en el presente trabajo el marcado isotópico sería la técnica más precisa y por tanto la de elección.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos podemos extraer las conclusiones que se plantean a continuación.

- 1) Cuando dos grupos de terneras de características similares son alimentadas “ad libitum” con dos raciones, la primera una ración convencional, basada en concentrado más paja de cereales, la segunda una ración forrajera tipo “*unifeed*”. Los ritmos de crecimiento fueron superiores en el lote que recibió la ración convencional (1205g/d) que los que recibieron la forrajera (965 g/d), no obstante los primeros no utilizaron la ración de una manera más eficiente ya que el índice de transformación de la materia seca fueron similares (5.96 y 5.80 respectivamente)
- 2) Las digestibilidad aparente de la MS estimada a partir de la concentración de lignina sulfúrico en el alimento y las heces fueron siempre superiores en la ración forrajera tipo “*unifeed*” probablemente las diferencias registradas podrían estar relacionadas en una reducción en la digestibilidad de la fibra en la ración convencional.
- 3) El tipo de ración no modificó la composición química de las bacterias aisladas del líquido ruminal, no obstante la proporción de N microbiano presente en el abomaso fue siempre superior en la ración forrajera que en la ración convencional.
- 4) La eficiencia de síntesis microbiana (g N microbiano/Kg MOD en el rumen) registrada con la ración convencional fue baja (19.33g N microbiano/kg MODR) como corresponde a este tipo de raciones. Los niveles de eficiencia de síntesis mejoraron en aquellos animales que recibieron la ración más forrajera (24.45g N microbiano/kg MODR).
- 5) Los valores de producción y síntesis de proteína microbiana en el rumen estimados a partir de las bases púricas como marcador microbiano no difirieron de las estimadas a partir del ^{15}N . A pesar de ello el isótopo mostró una mayor precisión en las estimaciones,

7. BIBLIOGRAFIA

- **AFRC (1992)** Nutritive Requirements of Ruminant Animals: Protein Technical Committee on Responses to Nutrients. AFRC Report nº9. Nutr. Abstract. Rev. (Serie B). 62, 787-835
- **ARC (1984)** The nutrients requirements of ruminant livestock. Supp. Nº1[C.A.B., editor]
- **Askar ART (2004)** Alimentación de corderos con cebada en grano y suplemento proteico a libre elección: digestión ruminal y rendimientos productivos. Tesis Doctoral, Zaragoza
- **Balcells, J.; Guada, J. A.; Castrillo, C.; Gasa J.(1993)** Rumen digestion and urinary excretion of purine derivatives in response to urea supplementation of sodium-treated straw fed to sheep. *British Journal Nutrition*, 69, 721-732. 1993
- **Balcells J, Aris A, Serrano A, Seradj AR, Crespo J, Devant M. (2012)** Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex(R)) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *J Anim Sci*. 2012 (DOI)
- **Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., and Rode, L. M. (2001)**. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. *Journal of Animal Science* 79, 1925-1936.
- **Beever DE, Harrison DG, Thomson DJ, Cammell SB & Osbourn DF (1974)** A method for the estimation of dietary and microbial protein in duodenal digesta of ruminants. *Br. J. Nutr.* 32, 99-112
- **Belanche A (2008)**. Estudio del ecosistema ruminal y la producción de proteína microbiana mediante PCR a Tiempo Real (Tesis Doctoral)
- **Ben-Ghedalia D (1981)** Fate of digesta ribonucleic acid in small intestine of sheep. *J Dairy Sci* 64.
- **Carro MD (2001)** La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos (revisión) Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal.
- **Carro MS & Miller EL (2002)** Comparison of microbial markers (¹⁵N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. *Anim Science* 75
- **Chaney, A. L., and Marbach, E. P. (1962)**. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry* 8, 130-132

- **Cortés, X. (2012).** Comparació de dues dietes en vedells d'engreix: dieta convencional (pinso i palla) vs unifeed. *Treball de fi de grau (Ciència i Salut Animal)*. ETSEA, Universitat de Lleida.
- **Czerkawsky JM (1986)** An introduction to rumen studies. Pregamon Press Ltd, Oxford, England
- **Dalton Henrique Pereira, 2006.** Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios.
- **Dalton H. Pereira, 2007.** Nutrient intake and digestibility and ruminal parameters in beef cattle fed diets containing *Brachiaria brizantha* silage and concentrate at different ratios.
- **Dehority BA (1993)** Microbial ecology of cell Wall fermentation. *In Forage cell wall Structure and Digestibility* pag 425-454.
- **Devant, M., Anglada, A., and Bach, A. (2007).** Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. *Animal Feed Science and Technology* 137, 46-57.
- **Faichney, G. J.(1975).** The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. A: *Digestion and metabolism in the ruminant* Eds: Mac Donald, I. W. i Warner, A. C.I. Armidale University of New England Publishing Unit.
- **FEDNA, 2003.** Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de los alimentos para la fabricación de piensos compuestos. 2ª ed. De Blas, C., Mateos, G.G., Rebollar, P.G. (Eds.), Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, Spain.
- **Jouany JP, Demeyer D & GRain J (1988)** Effects of defaunating the rumen. *Anim Feed Sci Tech*, 21.
- **Jouany, J. P. (1982).** Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci Aliments* 2, 131-144.

- **Marthen L. Mullik, Dennis P. Poppi i Stuart R. McClelland, 2009**
Quantification of the Efficiency of Rumen Microbial Protein Synthesis in Steers Fed Green Tropical Grass.
- **Mc Allan AB & Smith RH (1973a)** Degradation of nucleic acid in rumen. *Br.J. Nutr*, 29.
- **Merry, R. J., McAllan, A. B.** (1983). A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *British Journal of Nutrition*, **50**, 701-709.
- **Minato, H., Miyagawa, E., Suto, T.**, (1990): Techniques for analysis of rumen microbial ecosystems. A: S.Hoshino; R.Onodera; H.Minato; H.Itabashi, (eds.) *The rumen ecosystem: the microbial metabolism and its regulation*.
- **Mota et. Al (2005)**. Metabolismo de las bases púricas: estudio de su digestibilidad intestinal y factores que modifican su tasa de excreción renal. Tesis Doctoral.
- **Mota, M; Balcells, J. Ozdemir Baber, NH, Bölüktepe, S.(2008)** Predicting rumen microbial outflow from urinary excretion of purine derivatives in goats. *Animal*. 2, 44-51, 2008
- **Olubobokun, J. A., Craig, A. M. & Nipper, W. A.** (1988). Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* **66**, 2701-2710.
- **Orpin CG (1984)** The role of ciliate protozoa and fungi in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Tech* 10.
- **Overton, T. T., Cameron, J. P., Elliott, J. P., Clarck, J. H. & Nelson, D. R.** (1995). Ruminant fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *J. Dairy Sci.* **78**, 1981-1998
- **Pérez JF, Balcells J, Guada JA & Castrillo C (1997a)** Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivatives excretion or from direct measurements of ¹⁵N and purines bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolated. *Animal Science* 65, 225-236.
- **Pérez JF, Balcells J, Guada JA & Castrillo C (1997b)** Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivatives excretion or from direct measurements of ¹⁵N and purines bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolated. *Animal Science* 65, 225-236.

- **Satter, L. D. & Roffler, R. E. (1975).** Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **58**:1219-1237.
- **S.M. Martín-Orue, J. Balcells), F. Zakraoui, C. Castrillo, 1997.**
Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. *Anim. Feed. Sci. Tech* 71
- **S.Martin-Orue, S.M.; Balcells J.; Zakraoui, F.; Castrillo, C.(1998)**
Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure.. *Animal Feed Science and Technology.* 71, 269-282 .1998
- **Van Soest PJ (1994).** Nutritional Ecology of the Ruminant; Second ed: Cornell University Press.
- **Vega A & Poppi DP (1997).** Extend of digestion and rumen condition as factor affecting passage of liquid and digesta particles in sheep. *J. Agric. Sci.* 114
- **Vicente F, Guada JA, Balcells J & Castrillo C (2004)** Microbial contribution to duodenal purine flow in fattening cattle fed concentrate diets estimated by purine N labeling (¹⁵N) of different microbial fractions. *Animal Science* 78.
- **Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Farr, B. I. & Rode, L. M. (1997).** Comparison of barley, hull-less barley and corn in the concentrate of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **80**, 2885-2895.
- **Yokoyama, M. T. & Johnson, K. A. (1988).** Microbiología del rumen e intestino. A: *El ruminante, fisiología digestiva y nutrición.* Ed. Church, C,D. Editorial Acribial. Zaragoza, Espanya.