

EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS EN LA ALIMENTACIÓN DE OVINOS DURANTE 48 HORAS DE FERMENTACIÓN *in vivo*

[EVALUATION OF PROBIOTICS IN SHEEP FEED DURING 48 HOURS OF *in vivo* Fermentation]

Carlos Meza-López¹, Rómulo Bañuelos-Valenzuela^{1§}, Lucía Delgadillo-Ruiz², Perla Iyonne Gallegos-Flores³, Francisco Echavarría-Chairez³

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas. Carretera Panamericana Fresnillo-Zacatecas s/n, Centro, CP. 98500 Víctor Rosales, Zacatecas, México. ²Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica, CP. 98068, Zacatecas, Zacatecas, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Zacatecas, México. [§]Autor para correspondencia: (apozolero@hotmail.com).

RESUMEN

El propósito fue evaluar el efecto de un probiótico comercial intervet® (PCI) y no comercial (PNC) a diferentes concentraciones sobre la población de microorganismos, producción de AGV's y metano durante 48 h de fermentación *in vivo*. Se realizó un diseño experimental completamente al azar (DECA) de manera lineal, se muestreo cada 6 h por 48 h, utilizando 21 ovinos Dorper X Katadin, la dieta de base compuesta, agua y sales minerales a libre acceso. Se administró la dosis recomendada 20 g/animal/día de probiótico, los tratamientos fueron: T1:100%PNC, T2:66%PNC, T3:33%PNC, T4: testigo, T5:100%PCI, T6:66%PCI, T7:33%PCI. Se muestreo contenido ruminal, 30 min antes de cada periodo de 6 h. La suplementación con PNC aumentó la concentración de AGV's, el metano solo se vio favorecida disminuyendo en T1 y T2 con respecto al testigo. Para los AGV's de PCI en la producción de ácido acético fue mayor en T5 (58.9 mM) con respecto al testigo (57.8 mM). Cuantificación de protozoarios en líquido ruminal del tratamiento PNC fue mayor en T3 y T7 para PCI durante 48 h. Concluyendo que el mejor tratamiento fue T3 de PNC comparándolo con el mejor tratamiento de PCI T6 asumiendo que el T3 es más económico que el T6.

Palabras clave: AGVs, bacterias, metano, probióticos, rumen.

ABSTRACT

The purpose was to evaluate the effect of a commercial intervet® (PCI) and non-commercial (PNC) probiotic at different concentrations on the population of microorganisms, production of AGVs and methane during 48 h of *in vivo* fermentation. A completely randomized experimental design (DECA) was carried out in a linear manner, it was sampled every 6 h for 48 h, using 21 Dorper X Katadin sheep, the diet of compound base, water and mineral salts freely available. The recommended dose of 20 g / animal / day of probiotic was administered, the treatments were: T1: 100% PNC, T2: 66% PNC, T3: 33% PNC, T4: control, T5: 100% PCI, T6: 66% PCI, T7: 33% PCI. Ruminal content was sampled, 30 min before each 6 h period. Supplementation with PNC increased the concentration of AGVs, methane was only favored decreasing in T1 and T2 with respect to the control. For the AGV's of PCI, the production of acetic acid was higher in T5 (58.9 mM) with respect to the control (57.8 mM). Quantification of protozoa in ruminal fluid from PNC treatment was higher in T3 and T7 for PCI during 48 h. Concluding that the best treatment was PNC T3 comparing it with the best PCI treatment T6 assuming that T3 is cheaper than T6.

Index words: AGVs, bacteria, methane, probiotics, rumen.

INTRODUCCION

La nutrición animal desempeña un papel económico importante en los sistemas de producción de ovinos, ya que la alimentación representa aproximadamente el 70 % de los costos de producción (Sandoval-Castro y Belmar 2003), para mejorar la eficiencia de nutrientes disponibles, una posibilidad para reducir los costos es la utilización de aditivos que puedan mejorar la disponibilidad de los forrajes muy fibrosos y también reducir las emisiones de CH₄ (Partida-de la Peña *et al*, 2013). Muchas investigaciones han sido dirigidas a encontrar vías para reducir y/o inhibir la emisión de metano por los rumiantes; la producción de este gas se ve afectada por una variedad de factores dietarios y microbianos y agentes químicos (ionóforos), así como también la implementación de probióticos (Itabashi y Kawata, 2000).

Los probióticos son cultivos vivos de diversos microorganismos que se suministran a los animales como suplementos alimenticios y que ejercen efectos beneficiosos en el hospedero, al modificar la población microbiana que este alberga en su tracto digestivo (Fuller, 1989). En las condiciones tropicales de producción, en las que predominan los pastos de baja calidad nutritiva, el uso de probióticos en las dietas de los pequeños rumiantes permite una mejor eficiencia en la utilización de los alimentos fibrosos, aumenta la degradación de la fibra, la producción de ácidos grasos volátiles, y produce una mayor sincronización de la flora presente en el rumen (Gutiérrez, 2014).

El probiótico no comercial es una combinación de microorganismos benéficos naturales que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (bacterias ácido-lácticas), *Saccharomices* (levaduras) y *Rhodopseudomonas* (bacterias fotosintéticas o fototróficas). Los productos desarrollados que contienen distintos tipos de probióticos son cada día más divulgados, al demostrar sus efectos mediante múltiples investigaciones (Castañeda, 2018). Los microorganismos eficientes tienen un amplio abanico de usos ya que actúan de manera sinérgica generando sustancias benéficas como antioxidantes, aminoácidos, vitaminas, enzimas y ácidos orgánicos (Iga, 1999; Higa y Wididana, 1991). Dentro de las aplicaciones en la agricultura; mejoran la microflora del suelo, promueve el crecimiento de las plantas y suprime enfermedades. En animales en general, actúan como probiótico, antioxidante y preventivo de enfermedades. En el medio ambiente, ayudan para recuperar aguas contaminadas, acelerador de la descomposición de residuos (Maheswari, y Abirami, 2019) Por lo anterior el propósito del estudio fue evaluar el efecto de los probiótico comercial y probiótico no comercial a diferentes concentraciones en la alimentación de ovinos durante cuarenta y ocho horas de fermentación ruminal *in vivo* sobre la población de microorganismos del rumen (bacterias y protozoarios) del rumen, así como la producción de AGVs y metano.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la comunidad de El Remolino, en el municipio de Juchipila, Zacatecas, México. Se utilizaron 21 ovinos cruza de Katahdin X Dorper, animales con una edad y peso promedio de 59±5 días y 14.3±1.7 Kg. Se suministró una dieta a base de rastrojo molido de maíz 70%, alfalfa 15%, grano de maíz 5%, melaza 8%, bicarbonato 1.5%, premezcla de vitaminas y minerales 0.1%, sal común 0.4%. Se suministró el probiótico comercial (%). Se suministró el probiótico comercial *Bacillus subtilis* min 1X 10¹¹ UFC (2.2X10⁴ UFC/gr, PCI) y probiótico no comercial (PNC) a las concentraciones de 100, 66 y 33% para cada tratamiento, con tres repeticiones, directamente en el agua a cada animal y un control sin probiótico.

La preparación del PNC se realizó de acuerdo con la metodología de Kyan *et al*. (1999). Y tratamientos fueron: PNC, T1 100% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta. T2 66% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta. T3 33% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta. T4 testigo 0% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta; T5 mismo procedimiento para PCI.

La toma de muestras para la determinación de AGV's (cromatógrafo de gases (CG)), el conteo de microorganismos (cámara de Neubauer) se realizaron cada 6 h durante 48 h. El metano se infirió a partir de

la concentración de AGV's, mediante la aplicación de modelos matemáticos no lineales establecido por Moss *et al.* (2000).

Para el análisis de la información se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DECA). La información se analizó de manera lineal, utilizando para ello un análisis de medidas repetidas. Para llevar a cabo el análisis, se usó el programa estadístico SAS® y la prueba de comparación de medias usada fue la diferencia mínima significativa (LSD) ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los beneficios de implementar el uso de probióticos en los rumiantes según Chen *et al.* (2005), están relacionados con una mejor actividad del conjunto de enzimas microbianas en el rumen, las cuales favorecen los procesos fermentativos de la dieta fibrosa y un uso más eficiente de la energía generada. Por su parte, Ortiz-Rubio *et al.* (2009), en una evaluación con ovinos en desarrollo, informaron que la incorporación de un probiótico a base de bacterias lácticas en las dietas favoreció una mejor estabilización del pH y el NH_3 a nivel ruminal, con un incremento en los procesos fermentativos y mayores ganancias de peso vivo.

El efecto de respuesta a la dosis de PNC sobre perfiles AGV's de acético, propiónico y butírico, relación ácido acético/propiónico (A/P) y metano se muestran en el Cuadro 1. La suplementación con PNC aumentó la concentración total de AGV's, el acetato solo en el tratamiento de PNC 100% y PNC 33%, la del propionato en el tratamiento de PNC 33%, la concentración de butirato en los tres tratamientos, la concentración de la relación A/P fue mayor en los tratamientos PNC 100% y PNC 66% en comparación con el testigo, y la concentración de metano solo se vio favorecida con la disminución de los tratamientos PNC 100% y PNC 66% con respecto al testigo.

Cuadro 1. Determinación de ácidos grasos volátiles y metano (mM) producidos en los tratamientos.

Tratamientos Tiempo (hr)	0	6	12	18	24	30	36	48
Acético (mM)								
T1	31.31	24.30	39.70	49.53	31.23	34.60	43.85	66.45
T2	28.14	41.48	26.14	49.90	26.79	29.91	37.03	54.65
T3	28.78	34.86	25.03	45.12	25.76	34.96	25.93	65.78
T4	38.58	44.07	25.53	54.24	33.96	33.55	36.81	57.82
T5	32.98	71.13	31.02	55.95	43.55	31.90	45.34	58.90
T6	19.92	77.15	23.94	52.14	32.97	40.09	47.45	48.06
T7	39.59	59.20	34.47	53.64	40.80	45.65	40.34	53.64
Propionico (mM)								
T1	10.38	8.74	7.17	12.26	7.89	9.22	10.50	4.61
T2	11.27	10.23	7.71	10.44	6.19	8.67	8.59	4.69
T3	7.53	8.41	6.96	9.96	6.83	8.95	7.74	15.43
T4	3.75	5.67	9.34	7.36	10.79	10.01	2.07	6.66
T5	7.95	17.08	7.57	2.85	9.78	9.99	1.36	7.40
T6	6.10	17.55	5.95	2.85	6.97	9.88	1.36	11.14
T7	2.93	9.44	2.51	5.08	2.39	5.63	2.26	6.52
Butírico (mM)								
T1	0.35	0.24	0.66	0.44	0.35	0.23	0.26	0.39
T2	0.34	0.25	0.25	0.26	0.27	0.23	0.27	0.49
T3	0.39	0.22	0.32	0.31	0.32	0.35	0.31	0.53
T4	0.57	0.26	0.38	0.34	0.36	0.23	0.33	0.34
T5	0.40	0.59	0.31	0.28	0.45	0.31	0.34	0.35

T6	0.25	0.71	0.29	0.38	0.26	0.35	0.52	0.40
T7	0.39	0.33	0.52	0.27	0.28	0.36	0.39	0.32
Metano (mM)								
T1 PNC	20.18	15.20	16.16	34.46	21.70	23.57	30.58	28.79
T2 PNC	16.94	28.76	17.42	35.73	18.95	19.97	26.06	23.49
T3	19.91	24.29	17.04	32.06	17.73	24.18	17.29	46.25
T4	30.78	33.86	16.02	41.44	22.18	22.18	30.09	44.90
T5	23.20	49.77	21.69	45.69	31.00	20.89	37.74	45.36
T6	13.20	54.69	16.72	43.98	23.65	27.91	40.36	33.89
T7	31.96	44.30	28.04	42.31	33.20	35.31	33.02	41.45

Concentración de Metano (mmol/L); C_2 = Concentración de Ac. Acetato (mmol/L); C_3 = Concentración de Ac. Propionato (mmol/L); C_4 = Concentración de Ac. Butirico (mmol/L)) a la producción de valores más altos de metano, debido a que la ecuación resta los valores de propionico y es precisamente el PNC quien menos contribuye a la producción de metano, lo que se corrobora en Cuadro 2, con un valor numérico mayor y diferente ($P>0.05$), lo que en términos prácticos significa una menor producción de metano por el PNC. 004.

Para los AGV's de mantillo comercial (PCI) en los tiempos 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 h, se puede observar que la producción de ácido acético fue mayor en el tratamiento PCI 100% (58.9 mM) con respecto al testigo (57.8 mM), la menor producción se obtuvo en los tratamientos PCI 66% y 33%. La producción de ácido acético es de gran importancia en los rumiantes ya que estos emiten gas metano bajo condiciones anaeróbicas, participando diferentes tipos de bacterias. Éstas, degradan la celulosa ingerida a glucosa, que fermentan luego a ácido acético y reducen el dióxido de carbono formando metano en el proceso. Por lo que si todos los carbohidratos fuesen fermentados a ácido acético y no se produjera ácido propiónico la pérdida de energía podría llegar a ser del 33% (Carmona *et al.*, 2005).

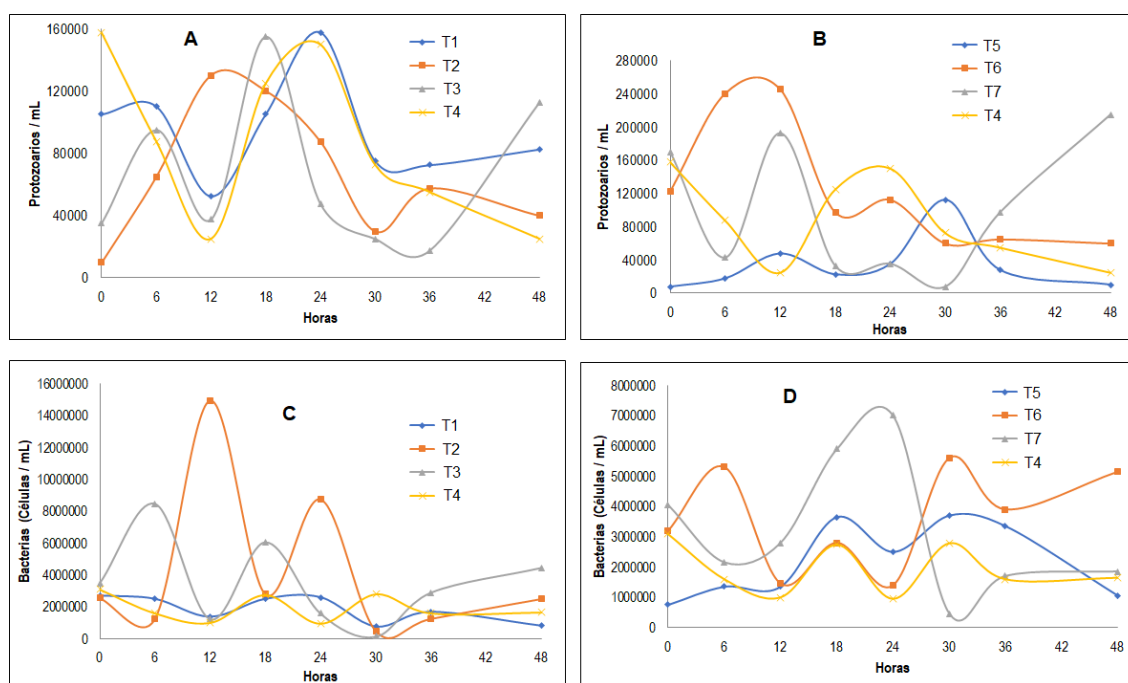
Castrillón *et al.* (1978) señalan que niveles altos de ácido propiónico se traduce en mayores ganancias de pesos de los animales. En el presente estudio se observan concentraciones bajas de ácido propiónico, los tratamientos PCI 100% y 66% presentaron concentraciones de 11.13 y 7.3 mM más elevadas que el testigo (6.6 mM), pero como se menciona se pueden considerar bajas ya que la relación entre ácido acético y propiónico para el testigo fue de 8.6 y para los tratamientos PCI 100%, 66% y 33% fueron de 7.9, 4.3 y 8.2 respectivamente, siendo el tratamiento PCI 66% el de mejor relación ya que según sugieren Carmona *et al.* (2005) la relación acético: propiónico puede variar entre 0.9 a 4 para que sea eficiente el sistema.

En el Cuadro 2 se puede observar la comparación general de ambos probióticos, destacando las diferencias ($P<0.05$) del ácido propionico y las emisiones de metano. Las implicaciones prácticas de estas diferencias están directamente relacionadas con la producción de metano, de acuerdo con la ecuación de Moss (2000), y observando los valores promedio obtenidos por ambos probióticos, el ácido acético, a pesar de no ser diferente ($P>0.05$), genera los valores más altos para el PCI; el Propiónico es de un valor numérico mayor y diferente ($P<0.05$) a favor de PNC, por último el Butirico es un valor más alto y diferente ($P>0.05$) para PCI, lo que lleva de acuerdo con la ecuación de Moss ($CH_4=0.45 C_2 -0.275 C_3 +0.4 C_4$). Donde: CH_4 = Concentración de Metano (mmol/L); C_2 = Concentración de Ac. Acetato (mmol/L); C_3 = Concentración de Ac. Propionato (mmol/L); C_4 = Concentración de Ac. Butirico (mmol/L)) a la producción de valores más altos de metano, debido a que la ecuación resta los valores de propionico y es precisamente el PNC quien menos contribuye a la producción de metano, lo que se corrobora en Cuadro 2, con un valor numérico mayor y diferente ($P>0.05$), lo que en términos prácticos significa una menor producción de metano por el PNC. 004.

Cuadro 2. Comparación de valores medios de AGVs y metano.

Variable	Trat	Media	Probabilidad
Acético	PCI	36.65	$p > 0.074$
	PNC	28.34	
Propiónico	PCI	27.59	$p > 0.035$
	PNC	37.40	
Butírico	PCI	36.03	$p > 0.129$
	PNC	28.96	
Metano	PCI	39.09	$p > 0.004$
	PNC	25.90	

En lo referente a la cuantificación de bacterias y protozoarios, los valores encontrados se muestran en la Figura 1. Observando que para protozoarios el tratamiento de PNC fue mayor en el T3 y T7 para PCI durante 48 hr. Mientras que, para las bacterias, los valores de bacterias en el líquido ruminal en el PNC fueron mayores en el T3 y para el tratamiento de PCI fue en el T6. Si se considera que las bacterias del rumen anaeróbico, los protozoos y los hongos degradan el material fibroso, esto permite a los rumiantes utilizar la fibra vegetal para su nutrición. Las bacterias son los microorganismos más numerosos y al igual que las anteriores, juegan un papel importante en la degradación biológica de la fibra dietética. Rodríguez *et al.* (2012) plantean que son muchas las bacterias y levaduras que se pueden usar de forma beneficiosa para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio; los microorganismos más usados son *Lactobacillus* sp., *Sreptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophyllus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los *Lactobacillus* crecen rápidamente en el intestino, son quizá los más conocidos, se trata de bacterias que pueden transformar la lactosa en ácido láctico, por lo que el aumento de ácido láctico disminuye el pH intestinal, lo cual afecta la supervivencia de microorganismos no benéficos para la flora ruminal, patógenos, entre otros (Muhammed y Jianhua, 2018).


Figura 1. A) Cuantificación de protozoarios PNC. B) Cuantificación de protozoarios PCI. C) Cuantificación de bacterias PNC. D) Cuantificación de bacterias PCI.

La permanencia y cantidad de los microorganismos ruminales son deseables en las primeras etapas de la fermentación ruminal, tal como se presenta en el PNC. El efecto de los probióticos parece estar relacionado con los mecanismos y procesos metabólicos llevados a cabo por los microorganismos ruminales, los cuales participan en la fermentación ruminal, formación de metano y producción de AGV's. Una mayor producción de propionato favorecida por la adición de probióticos reduce el hidrógeno libre en el rumen, haciéndolo menos disponible para las bacterias; en este estudio se evaluaron estas bacterias observando una reducción en la producción de metano haciendo que haya más energía disponible para el huésped.

CONCLUSIONES

Se concluye que el mejor tratamiento fue T3 de PNC comparándolo con el mejor tratamiento de PCI T6 asumiendo que el T3 es más económico que el T6. La producción de metano se reduce por el PNC. Con respecto a protozoarios y bacterias los mejores tratamientos fueron para PCN el T3 y para el tratamiento PCI el T7 para protozoarios y T6 para bacterias.

LITERATURA CITADA

- Arowolo, MA y J. He. 2018. Uso de probióticos y extractos botánicos para mejorar la producción de rumiantes en los trópicos: una revisión. *Nutrición animal*, 4(3), 241-249.
- Carmona, J., D. Bolívar & L. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 49-63.
- Chen, Y.J., K.S. Son, B.J. Min, J.H. Cho, O.S. Kwon and I.H. Kim. 2005. Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian Austral J Anim* 18: 1464-1468.
- Castañeda-Guillot, C. 2018. Probiotics: an update. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(2), 286-298.
- Castrillón, M.V., A.S. Shimada, & F.M. Calderón. 1978. Manipulación de la fermentación en ensilajes de caña de azúcar y su valor alimenticio para borregos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, (35), 48-55.
- Castro, M. 2005. Uso de aditivos en la alimentación de animales monogástricos *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 39. 451 p.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gutiérrez, T.R., V.M. Ramírez, S. León, J. Fontecha, L.M. Rodríguez & A. Escobar-Medina. 2014. Contenido de ácidos grasos en semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) cultivadas en cuatro estados de México. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(3), 199-207.
- Higa, T. 1991. Microorganismos efectivos: una biotecnología para la humanidad. En: *Actas de la primera conferencia internacional sobre agricultura natural de Kyusei*. Departamento de Agricultura de EE.UU., Washington, DC, EE.UU. pp. 8-14.
- Higa, T. y G.N. Wididana. 1991. El concepto y las teorías de los microorganismos efectivos. En: *Actas de la primera conferencia internacional sobre agricultura natural de Kyusei*. Departamento de Agricultura de EE. UU., Washington, DC, EE. UU. pp. 118-124.
- Itabashi, M. & K. Kawata. 2000. Carbon content effect on high-strain-rate tensile properties for carbon steels. *International Journal of Impact Engineering*, 24(2), 117-131.
- Kyan, T., M. Shintani, S. Kanda, M. Sakurai, H. Ohashi, A. Fujisawa and S. Pongdit. 1999. Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms. Atami (Japan), Asian Pacific Natural Agricultural Network.
- Maheswari, NU y R. Abirami. 2019. Una revisión sobre: Microorganismos efectivos y sus aplicaciones. *Revista asiática de investigación multidimensional (AJMR)*, 8(4) 121-129.
- Moss, A.R. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*. 49(3): 231-253. Doi: 10.1051/animres: 2000119

- Ortiz-Rubio, M.A.; M.A. Galina y M.J. Pineda. 2009. Effect of show nitrogen intake supplementation with and without a lactic probiotic on Pelibuey lamb growth. *Options méditerranéennes* 83:309-314.
- Partida-de la Peña, J.A., D. Braña-Varela, H. Jiménez-Severiano, F.G. Ríos-Rincón, G. Buendía-Rodríguez. 2013. Producción de carne ovina. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP. Libro No 5. pp. 4-5.
- Rodríguez, I., M. Salazar, E. Villalobos- 2012. E. *Lactobacillus* spp del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo. Perú. Vol. 32, No. 2.
- Sandoval-Castro, C.A. C.R. Belmar. 2003. Principios para la alimentación de rumiantes. No. SF 95. S36 2003.