

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DEL CRECIMIENTO MICROBIAL in vitro CON
DIFERENTES RELACIONES AMILOSA / AMILOPECTINA Y
ALMIDON / SACAROSA EN EL SUSTRATO ENERGETICO

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACION DE LA COMISION DEL PROGRAMA CONJUNTO
DE ESTUDIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRICOLAS Y RECURSOS NATURALES DE LA
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA Y EL CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE
INVESTIGACION Y ENSEÑANZA, PARA OPTAR AL GRADO DE:

Magister Scientiae

ROMULO RAFAEL OLIVO FILIPPE

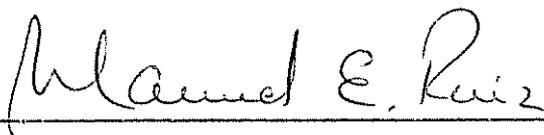
CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
TURRIALBA, COSTA RICA

1978.

Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la Comisión de Estudios de Posgrado del Programa Conjunto UCR-CATIE, como requisito parcial para optar el grado de

Magister Scientiae

JURADO:



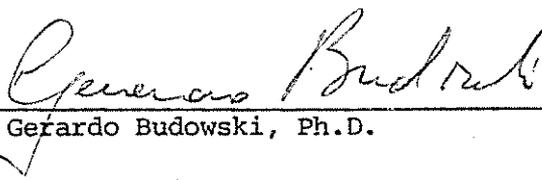
Manuel Ruíz, Ph.D.

Profesor Consejero



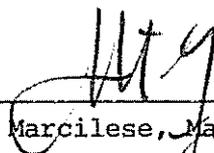
Héctor Muñoz, Ph.D.

Miembro del Comité



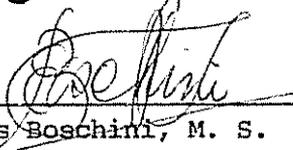
Gerardo Budowski, Ph.D.

Miembro del Comité



Néstor Marcilese, Mag. Sc.

Miembro del Comité



Carlos Boschini, M. S.

Miembro del Comité



Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado
en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Coordinador, Sistema de Estudios de Posgrado de
la Universidad de Costa Rica



Rómulo Rafael Olivo Filippé

Candidato

DEDICATORIA

A mi esposa María

A mi hijo Rómulo

A mis padres y hermanos

A Doña Marta

A mis amigos

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su sincero agradecimiento:

Al Dr. Manuel E. Ruíz, Consejero Principal, por su valiosa colaboración en la realización y revisión del presente trabajo;

Al Dr. Néstor Marcilese, miembro del comité, por su inestimable ayuda, sugerencias y observaciones al presente trabajo;

A los miembros del comité consejero: Dr. Héctor Muñoz, Dr. Gerardo Budowski e Ing. Carlos Boschini, por su colaboración y sugerencias;

Al Dr. Oliver Deaton y los Ings. Arnoldo Ruíz y Danilo Pezo, por las facilidades y orientaciones brindadas durante el desarrollo de mis estudios, por sus sugerencias y observaciones al presente trabajo y por su amistad durante la estadía en este Centro;

Al Programa de becas Gran Mariscal de Ayacucho del Gobierno de Venezuela, por su apoyo económico durante la realización de los estudios;

Al Centro Internacional para Investigación y Desarrollo (CIID-Canadá), por su apoyo en la realización del presente trabajo

A mi querida esposa por su constante apoyo moral;

A todas aquellas personas que física o moralmente colaboraron en la realización del presente trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en Valencia, Venezuela, el 27 de octubre de 1950.

Inició sus estudios de agronomía en la Universidad Central de Venezuela, concluyéndolos en la Universidad de Costa Rica, donde obtuvo el grado de Ingeniero Agrónomo en 1974.

En julio de 1976 ingresó al Programa de Postgrado del Convenio UCR-CATIE, donde obtuvo el grado de *Magister Scientiae* en noviembre de 1978.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Determinación del crecimiento microbial ...	3
2.2 Factores que afectan el crecimiento microbial	6
2.3 Efecto del nitrógeno sobre el crecimiento microbial	7
2.4 Efecto de la sacarosa y del almidón sobre la actividad ruminal	8
2.4.1 Sacarosa	8
2.4.2 Almidón	10
2.5 Influencia de la actividad microbial en el aporte de nutrientes para los ru- miantes	11
2.5.1 Glucosa	12
2.5.2 Aminoácidos	14
3. MATERIALES Y METODOS	18
3.1 De los animales	18
3.2 Del procedimiento de laboratorio	18
3.3 Diseño estadístico, parámetros y medición y análisis de la información	21
4. RESULTADOS Y DISCUSION	24
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
6. RESUMEN	37
6a. SUMMARY	39
7. LITERATURA CITADA	41
8. APENDICE	53

LISTA DE CUADROS

TEXTO

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página</u>
1	Resumen de los análisis de variancia para fósforo incorporado (P_i) por el material microbial, nitrógeno incorporado (N_i) por el material microbial y aumentos en la materia seca microbial (MS_m)	24

APENDICE

1A	Valores observados de fósforo incorporado, mg por ml de solución ruminal	54
2A	Valores observados de nitrógeno incorporado, en mg por ml de solución ruminal	55
3A	Valores observados de incremento de materia seca, en mg por ml de solución ruminal	56

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura No.</u>		<u>Página</u>
1	Efecto de diferentes relaciones almidón/ sacarosa (X_1) y amilosa/amilopectina (X_2) sobre la incorporación de fósforo P (Y_1) por los microorganismos del rumen, según la ecuación 1	26
2	Efecto de diferentes relaciones almidón/ sacarosa (X_1) y amilosa/amilopectina (X_2) sobre la incorporación de nitrógeno (Y_2) por los microorganismos del rumen, según la ecuación 2	28
3	Efecto de diferentes relaciones almidón/ sacarosa (X_1) y de amilosa/amilopectina (X_2) sobre el incremento en la materia seca mi- crobial del contenido microbial, según la ecuación 3	33

1. INTRODUCCION

Las tasas de crecimiento y la producción de la microflora y microfauna ruminal son determinantes del comportamiento animal, ya que los microorganismos del rumen, a través de su actividad sintetizadora, representan la fuente más importante de proteína especialmente cuando el rumiante recibe una alimentación que contiene altos niveles de nitrógeno no proteico y bajos niveles (o ausencia) de proteína. Además, desde el punto de vista de la nutrición energética, los microorganismos ruminales permiten que el rumiante base su alimentación en materiales fibrosos no competitivos con la nutrición humana.

Por otro lado, bajos índices de crecimiento microbiano afectan negativamente la fermentación total de los alimentos que llegan al rumen al reducir la velocidad de fermentación de los mismos. Esto trae como consecuencia una disminución en la velocidad de paso de la ingesta a través del rumen lo cual reduce el consumo de alimentos, y redunda en una menor productividad animal.

Se ha determinado que no sólo la concentración energética total, sino también el tipo de fuente energética (celulosa, almidón o azúcares) afecta el comportamiento de los microorganismos. Esto adquiere particular importancia en el caso en que el animal dependa en gran parte de la síntesis de proteína microbial a partir de nitrógeno no proteico. Además en el trópico, existe la posibilidad de modificar significativamente la fermentación ruminal utilizando variadas fuentes energéticas, abundantes en el medio, como la raíz de yuca y malanga (almidones) y melaza (azúcares).

En consecuencia de lo anterior, es evidente la importancia de identificar los factores que afectan las tasas de crecimiento de los microorganismos del rumen y de buscar los métodos para maximizar éstas. Por lo tanto, utilizando las técnicas de incorporación de fósforo, incorporación de nitrógeno y aumentos en materia seca, se ha planteado el presente experimento cuyos objetivos son:

1. Evaluar el efecto que tiene la relación almidón/sacarosa sobre la producción de materia microbial en el rumen.
2. Determinar en qué medida se ve afectado el crecimiento neto microbial al variar la relación amilosa/amilopectina de los almidones.

2. REVISION DE LITERATURA

Los rumiantes satisfacen sus requerimientos de aminoácidos a partir de la proteína aportada por la ración y por los microorganismos ruminales, mediante la digestión de éstos en el tracto digestivo posterior al rumen. Estos microorganismos tienen la capacidad de degradar la proteína consumida por el rumiante y utilizar algunos de los productos de esta degradación en la síntesis de su propia proteína; pueden también utilizar nitrógeno no proteico y así convertir proteína dietaria de poco valor biológico en proteína de alto valor para el hospedero (18, 89).

Así, es importante conocer el grado de síntesis de materia microbial bajo un determinado régimen alimenticio a los efectos de obtener una mayor eficiencia en la producción animal.

2.1 Determinación del crecimiento microbial

La relación existente entre la cantidad de materia sintetizada por los microorganismos ruminales y la cantidad de materia orgánica presente en el alimento que es fermentado, no es aún clara. El estudio de estas relaciones, por medio de técnicas *in vivo*, involucra el uso de marcadores, como el ácido 2,6 diaminopimelico (45, 63, 112), ácidos nucleicos (84) y azufre marcado (121) para el cálculo de la contribución del material microbial al total del flujo de la digesta ruminal. Sin embargo, estas técnicas son dificultosas y los cálculos del flujo de la digesta y del aporte microbial son susceptibles a considerable error experimental (48).

El ácido 2,6 diaminopimélico en las bacterias, y el ácido 2-aminoetilfosfónico de los protozoarios son aminoácidos característicos de los microorganismos del rumen (64) y están ausentes en la proteína de origen dietario (45, 63, 112). Sin embargo, la variación en el contenido microbial de estos aminoácidos (122) y lo complicado de sus determinaciones dificultan la utilización de éstos en la medición del crecimiento microbial.

Otro método utilizado se basa en el hecho de que el total del nitrógeno de los ácidos nucleicos y el nitrógeno total microbial son proporcionales (84), no existiendo influencia de los ácidos nucleicos dietarios, ya que éstos son rápidamente degradados en el rumen. El ADN está asociado con el número de microorganismos presentes, mientras que el ARN está estrechamente relacionado con la síntesis de proteína. No obstante lo anterior, Maaløe y Kjeldgaard (81) y Allison (3) indican variaciones en la proporción de los ácidos nucleicos en función de la tasa de crecimiento microbial y dado que estos contienen diferentes cantidades de nitrógeno (3), ponen en duda la validez de este método para la determinación del crecimiento microbial.

La determinación del crecimiento microbial *in vitro* se realiza por técnicas más fáciles y en forma más directa, a través de la cuantificación del sustrato fermentado o incorporado. Frecuentemente, la determinación de la materia microbial se basa en la adición al medio extracelular de algún radioisótopo incorporable a los constituyentes microbiales, realizándose luego mediciones del cambio en su concentración en el medio extracelular, en el material microbial o en ambos, seguido de

la medición de la radioactividad y de la cantidad del elemento incorporado por los cambios en concentración.

Se han realizado mediciones utilizando ^{35}S (122) o ^{15}N (4) para marcar los sulfitos, sulfatos y amonio que intervienen en la síntesis de los aminoácidos microbiales. Sin embargo, la exactitud de estos métodos no es confiable debido, entre otras razones, a que:

a. Una considerable cantidad del nitrógeno y del azufre microbial puede provenir de la incorporación directa de péptidos extracelulares y/o aminoácidos (5, 94, 120).

b. La determinación del azufre marcado está sujeta a dificultades técnicas (52, 94, 122), y la relación azufre/nitrógeno en la materia microbial es muy baja, variando entre 0,046 (22) y 0,081 (121).

Actualmente se acepta que todo el fósforo microbial se origina del "pool" extracelular de fosfato, ya que los compuestos fosforilados tales como los nucleótidos no pueden penetrar las paredes microbiales (Kepes citado por Van Nevel y Demeyer (119)).

Los ácidos nucléicos contienen la mayor cantidad del fósforo microbial y Smith (113) indica que el valor de la relación N de ácidos nucléicos/N total es constante y con un valor aproximado de 0,19.

Van Nevel y Demeyer (119, 120), al utilizar fósforo marcado en la medición del crecimiento microbial *in vitro*, concluyen que todo el fósforo incorporado en los microorganismos del rumen, provenía del "pool" extracelular, y que es el precursor inorgánico marcado que mejor se comporta en este tipo de trabajos ya que presenta menos dificultades técnicas en su determinación y cálculos.

2.2 Factores que afectan el crecimiento microbial

Las bacterias y los protozoarios son los causantes de la fermentación que ocurre en el tracto digestivo. Por la relación existente entre el tamaño del rumen y del ciego de un rumiante, se estima que por lo menos un 95 por ciento de la fermentación se lleva a cabo en el rumen (77).

El contenido ruminal de un animal adulto bajo condiciones normales de alimentación, posee cerca de 10^{11} bacterias por ml y aproximadamente 10^6 protozoarios/ml (75). Según el mismo autor, los principales factores que afectan el crecimiento microbial son:

- a. El tipo y la cantidad de alimento consumido
- b. La salivación y rumia
- c. El mezclado periódico de los alimentos debido a las contracciones ruminales
- d. Difusión o secreción de sustancias en el rumen
- e. Absorción de compuestos en el rumen
- f. Pasaje de material alimenticio del rumen a las partes posteriores del tracto digestivo

Dadas las condiciones anaeróbicas predominantes en el rumen, la síntesis de proteína microbial estará limitada por la disponibilidad de energía (44, 59). Esto ocurre por que los microorganismos anaeróbicos son capaces de metabolizar los alimentos hasta ácidos grasos volátiles, lo que representa del 10 al 20 por ciento de la eficiencia de los microorganismos aeróbicos.

2.3 Efecto del nitrógeno sobre el crecimiento microbial

Los microorganismos del rumen requieren de nitrógeno en forma de amonio y de aminoácidos para su desarrollo (2, 25, 26, 59, 67) y se indica que del total de nitrógeno microbiano el 61 y el 39 por ciento son de origen amoniacal y de aminoácidos, respectivamente (4, 44).

La adición de proteína o urea a raciones basadas en forrajes de baja calidad resultan en un incremento en la síntesis de proteína microbial (6, 7, 58, 82). Este incremento se ve disminuido al aumentar la calidad de la ración, sobre todo en los casos en que se utiliza urea (6, 58).

Maeng et al (82) al comparar, en experimentos *in vitro*, diferentes combinaciones de nitrógeno proteico y no proteico obtuvieron las mayores tasas de crecimiento microbial cuando la proporción era 25 por ciento de nitrógeno proveniente de aminoácidos y el 75 por ciento de nitrógeno de urea; la utilización de 100 por ciento de cualquiera de las fuentes produjo disminuciones significativas ($P = 0,01$) en comparación con cualquier combinación de ellas.

Allen y Miller (2) en experimentos *in vitro* encontraron que la máxima producción neta microbial se obtiene cuando la dieta suple una cantidad de nitrógeno fermentable igual a la cantidad de nitrógeno microbial que sale del rumen; lo anterior no implica que los microorganismos usen el 100 por ciento del nitrógeno dietario sino que el reciclaje de nitrógeno es suficiente para igualar las pérdidas de amonio en el rumen.

Según varios autores (44, 55, 100) los principales factores que

influyen en la conversión del nitrógeno dietario a N microbial son:

- a. Tiempo de permanencia de las partículas de alimento en el rumen. A mayor permanencia mayor conversión.
- b. Resistencia de los compuestos nitrogenados dietarios a la desaminación. A mayor resistencia menor conversión.
- c. Disponibilidad de nitrógeno.
- d. Nivel y fuente de energía disponible para la fermentación ruminal.
- e. Relación carbono/nitrógeno
- f. Presencia de factores de crecimiento (vitaminas) y otros nutrientes.
- g. Composición de la población microbial.

2.4 Efecto de la sacarosa y del almidón sobre la actividad ruminal

2.4.1 Sacarosa

La adición de sacarosa o melaza a la ración o directamente al rumen tienen el mismo efecto sobre la actividad ruminal (80, 98). La tasa de fermentación de la sacarosa es la más rápida comparada con otros carbohidratos y se indican valores de desaparición de 22 por ciento en una hora (31).

La inclusión de melaza en la ración resulta en los siguientes cambios a nivel ruminal:

- a) Aumento en la producción de metano (31), con la consecuente pérdida de energía;
- b) aumentos en la concentración molar de butirato

y acetato, disminución lineal de la concentración del propionato y disminución en el pH (28, 69, 70), y c) aumento en la población de protozoarios (42).

Al comparar dietas que suministran sacarosa como sustrato energético con aquellas que aportan almidón, los cambios en la producción animal son notorios. Se indicó que con el uso de melaza se reduce la eficiencia de utilización de la energía (28, 80, 98, 105, 111), disminuye el consumo de materia seca y energía (28, 111), disminuye la ganancia de peso (111) y la producción de leche (69, 80, 98, 105), en comparación con dietas que incluyen almidón. Esto se puede deber a que la adición de melaza disminuye la digestibilidad de la ración (80, 98). Clark et al. (29) proponen como posible causa un desbalance en los metabolitos cetónicos y glucogénicos, debido a cambios en la fermentación inducidos por las mieles. Otros investigadores (93) indican que el valor productivo de energía de la digestión de la sacarosa es cerca del 16 por ciento menor que los valores obtenidos con almidón y celulosa.

Otra explicación a este fenómeno es que los microorganismos asociados con la fermentación butírica, inducida por el uso de sacarosa en la ración, son menos eficientes en la transformación del sustrato energético a proteína microbial que los asociados con la fermentación propiónica (53, 65, 66, 99, 127). También se indica que en presencia de azúcares solubles la actividad de las polisacaridasas ruminales se inhibe (117). Lo anterior podría explicar el mecanismo por el cual la digestibilidad de la fibra se reduce al alimentar con dietas que contienen azúcares solubles (15).

2.4.2 Almidón

La utilización de alimentos cuyo principal sustrato energético es el almidón, produce una elevación en la concentración molar del ácido propiónico en el rumen (15, 60, 61, 105, 108, 109, 123), mejora la eficiencia de conversión de alimentos (105, 112), aumenta el tenor proteico del contenido ruminal, debido a un aumento en la síntesis de proteína microbiana (43, 44, 89, 94), aumenta la concentración de microorganismos en material ruminal (44, 94), aumenta hasta cierto grado la digestibilidad de la celulosa (15), disminuye la producción de metano (31, 61, 108, 109), disminuyen las pérdidas del nitrógeno dietario en forma de amonio (44, 67, 109), aumenta la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos (12), aumentan los contenidos de carbohidratos y lípidos del material ruminal y de los microorganismos (12, 30, 86, 108, 109), y disminuye en cierto grado la población de protozoarios debido a una declinación en el pH (42, 105).

Mills et al. (89) explican que la acción del almidón se debe a una hidrólisis más lenta que la de los azúcares solubles lo que permite un suministro más continuo de energía y de estructuras carbonadas para la síntesis microbiana.

También se ha demostrado en experimentos *in vitro* que el almidón es la fuente energética que promueve más eficientemente la transformación de urea a proteína microbiana (15, 51, 67, 89).

En condiciones normales de alimentación la síntesis microbiana ocurre más lentamente que la hidrólisis de la urea en el rumen y, por lo tanto, se produce una gran pérdida de nitrógeno como amonio (36).

Con la adición de almidón a la ración se produce en el rumen una disminución en la actividad de la ureasa (105) resultando en concentraciones ruminales de amonio más bajas y más acordes con la capacidad de síntesis de los microorganismos lo cual, aunado a un suministro más constante de energía y de estructuras carbonadas, resulta en una síntesis más eficiente de proteína microbial.

También se ha notado un efecto beneficioso del almidón sobre el epitelio ruminal. Ruíz y Molina (107) encontraron un incremento notable en la actividad de las enzimas respiratorias (succínico y láctico deshidrogenasa, NAD citocromo reductasa y adenosina trifosfatasa) en el tejido ruminal, cuando se alimentaron los animales con granos en vez de melaza. Lo anterior refleja que existe un incremento en la actividad metabólica de dicho tejido y, consecuentemente, en su capacidad absorptiva.

En experimentos *in vivo* la inclusión de almidón, o de alimentos que lo contengan, han producido aumentos en el consumo y eficiencia de utilización de la energía (29, 105, 111); lo que se traduce en una mayor ganancia de peso (111) y en una mayor producción de leche (105).

2.5 Influencia de la actividad microbial en el aporte de nutrientes para los rumiantes

Los rumiantes se benefician de la actividad de los microorganismos del rumen por las siguientes vías: a) por la fermentación de la celulosa y otros componentes estructurales de la planta con la producción de sustratos rápidamente metabolizables, b) por la síntesis de aminoácidos

esenciales, lo que a veces ocurre a partir de nitrógeno no proteico haciendo al animal menos dependiente de la calidad de la proteína del alimento, c) por la síntesis de vitaminas, especialmente las del complejo B.

Además, la fermentación ruminal tiene un considerable efecto sobre los procesos metabólicos del animal y las funciones de los microorganismos están íntimamente asociados con ciertos desórdenes metabólicos en los rumiantes (24).

Varios autores (31, 42, 70, 75, 83, 89, 93, 112) han demostrado que existe una relación directa entre la tasa de fermentación y la concentración de microorganismos en el rumen. Así, cualquier alteración que disminuya la población microbiana, producirá una disminución en la tasa de fermentación ruminal y, por lo tanto, en la disponibilidad de energía para el animal.

También se indican correlaciones positivas y significativas entre la actividad de la masa microbiana y el paso al duodeno de polímeros con enlaces glucosídicos (66, 85) y el nivel de glucosa en el jugo ruminal (59, 117).

2.5.1 Glucosa

Estudios con ovejas adultas alimentadas con forraje, han demostrado que las tasas de entrada de glucosa al "pool" sanguíneo son similares a la de animales monogástricos en estado post-absortivo (9, 19, 71), y que las tasas de entrada de glucosa basadas en esos resultados, son de 100 g glucosa/animal/día. Leng (74) demostró altos requerimientos de glucosa, hasta 1,5 kg/día, en vacas produciendo 30 kg de leche/día.

Basados en las cantidades de azúcares reductores que entran en el abomaso, se estima que la contribución de los carbohidratos bacteriales a los requerimientos de glucosa es muy baja (50). De allí que el resto de la glucosa requerida por el animal deberá ser formada por gluconeogénesis a partir de precursores o absorbida directamente como tal en el intestino delgado.

Annison (8) y Leng y Annison (76) han demostrado que de los principales ácidos grasos volátiles producidos en el rumen, sólo el propiónico es glucogénico, y se ha estimado que sólo la mitad de la glucosa que se encuentra en el torrente sanguíneo es sintetizada a partir del propionato producido (78).

Lo anterior sugiere que los aminoácidos podrían ser una fuente importante de glucosa. Tal posibilidad ha sido demostrada por Hoogenraad et al. (57), quienes al alimentar ovejas con preparaciones ricas en proteína pero bajas en carbohidratos, encontraron que los aminoácidos de la proteína dietaria eran utilizados en la síntesis de glucosa. Ford y Reilly (47), al inyectar una mezcla de aminoácidos marcados, determinaron que entre 10 y 17 por ciento de la glucosa fue derivada de los aminoácidos plasmáticos; también, Hunter y Millson (62) trabajando con vacas lecheras encontraron que cerca del 12 por ciento de la lactosa fue sintetizada a partir de aminoácidos.

Krebs (citado por Hoogenraad et al. (57)) determinó que por gluconeogénesis es posible sintetizar de 50 a 60 g de glucosa/100 g proteína.

2.5.2 Aminoácidos

Según Preston (99), los rumiantes tienen dos tipos de requerimientos de nitrógeno: uno para satisfacer las necesidades de los microorganismos del rumen y otro de proteína o aminoácidos esenciales protegidos (no degradables en el rumen) para cubrir la diferencia entre los requerimientos y los suplidos por los microbios.

El concepto de que la escasez de uno o más aminoácidos pueden limitar la productividad de los rumiantes se hace visible al considerar el balance de nitrógeno, la producción de lana y las respuestas en producción de leche que se han obtenido con la administración post-ruminal de aminoácidos y proteína (23, 32, 33, 34, 39, 40, 46, 102, 103, 104, 118, 126) y por las alteraciones en los perfiles de los aminoácidos plasmáticos asociados con la alimentación con urea (33, 34, 95, 96).

En ovejas, dado el alto contenido de aminoácidos azufrados en la lana, el uso de éstos en infusiones post-ruminales produjo notables incrementos en la producción de lana y en la retención de nitrógeno (102, 103, 104), encontrándose en estos mismos trabajos que niveles excesivos de aminoácidos sulfurados tienen efectos detrimentales.

En bovinos se han obtenido incrementos en la ganancia de peso al utilizar metionina (27) y lisina (39, 40), aunque otros autores (35) indican que la metionina no es un aminoácido limitante. Al realizar estudios con vacas lactantes se han obtenido aumentos significativos en la producción de leche y ganancia de peso al infundir metionina o caseína en el abomaso (23, 114).

Weller et al. (125) observaron que entre el 80 y 90 por ciento del nitrógeno que se encuentra en el omaso era de origen microbial y que de éste alrededor del 70 por ciento era de origen bacterial. Este resultado demuestra que la principal fuente de aminoácidos disponible para los rumiantes proviene de los microorganismos. Así mismo, se ha observado que existe una relación directa entre la cantidad de nitrógeno que sale del rumen y la retención de nitrógeno (6) y la producción de leche (23, 114).

El contenido de nitrógeno de las bacterias es de aproximadamente 10,5 por ciento de peso seco (60) y el de los protozoarios de 6,8 por ciento (91); de estos valores, el 86 y el 75 por ciento provienen de aminoácidos, para bacterias y protozoarios, respectivamente (124).

MacNaught et al. (87, 88) al alimentar ratas con preparaciones secas de bacterias ruminales encontraron valores de 74, 81 y 60 para la digestibilidad verdadera, valor biológico y utilización neta de la proteína, respectivamente. En el caso de preparaciones de protozoarios los valores fueron de 90, 80 y 73 para los mismos parámetros. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (17, 18, 21, 79), encontrándose casos en los que se indica que el valor biológico de la proteína microbial es igual al de la caseína en la alimentación de ratas (62, 79, 124) y superior al de la harina de soya en la alimentación de aves (1).

La digestibilidad de la proteína microbial en el intestino delgado de novillos jóvenes tiene un valor promedio de 81,5 por ciento (110).

Hoogenraad y Hird (56) encontraron que el contenido de proteína y de lípidos de las bacterias ruminales representa entre 50 y 70 por ciento de la materia seca microbial.

De los aminoácidos esenciales para el rumiante (20, 41), se ha demostrado que la proteína microbial es potencialmente deficiente en histidina, cistina, leucina, arginina y lisina (17, 100).

Bergen et al. (16) en estudios *in vitro* demostraron que la disponibilidad de los aminoácidos y la digestibilidad de los mismos variaba según la especie de microorganismo, y así, *Ruminococcus flavefaciens* contenía solo 2,5 por ciento de aminoácidos libres mientras que *Butirivibrio fibrisolvens* dio un valor de 52,6 por ciento. Lo que indica que aún cuando tengan la misma composición en lo referente a la proporción de aminoácidos (101, 124) no tienen el mismo valor como fuente de aminoácidos para el hospedero.

Además, se indica que la composición de la mezcla de aminoácidos presentes en el intestino puede influenciar marcadamente la tasa de absorción y la proporción de aminoácidos absorbidos (97); esto ocurriría pues el rumiante posee una absorción selectiva de aminoácidos esenciales en el duodeno (100).

También se ha demostrado que las lipasas de los microorganismos ruminales son indispensables en la digestión de los lípidos ingeridos en los alimentos (38) y que las bacterias del rumen son una rica fuente de ácidos grasos de cadena ramificada y de aldehidos (68).

En conclusión, cualquier factor que influya sobre el crecimiento

de los microorganismos del rumen tendrá una influencia directa y determinante sobre la disponibilidad de aminoácidos y de glucosa y sus precursores para el animal y, consecuentemente, sus comportamiento productivo.

3. MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en la Finca Experimental Ganadera y en los laboratorios de Nutrición Animal y Suelos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica.

La medición de la radioactividad se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, en San José.

3.1 De los animales

Se utilizaron como donantes de licor ruminal tres novillos encastados Romo Sinuano de un peso promedio de 150 kg, con fístula permanente al rumen, los cuales fueron alimentados con pasto *ad libitum* y se les suministraron diariamente una mezcla suplementaria de 1 kg de melaza, 0,5 kg de harina de yuca y 0,3 kg de harina de carne y hueso. La razón de esta dieta fue el promover el establecimiento de una población microbiana ruminal adaptada a los sustratos a utilizar en el estudio *in vitro*.

Las muestras se tomaron luego de mantener al animal 24 horas en ayuno, con el fin de que toda la proteína proveniente del alimento hubiera desaparecido del rumen (119).

3.2 Del procedimiento de laboratorio

El material ruminal se filtró a través de dos capas de lana de

vidrio y se usaron 40 ml de jugo ruminal los cuales fueron transferidos anaeróbicamente, mediante gaseo con CO_2 , a tubos de incubación que contenían:

- 110 mg de caseína
- 100 mg de urea
- 10 mg de celulosa
- 10 ml de una solución buffer y macrominerales
(bicarbonato de amonio 4 g/l, bicarbonato de sodio 35 g/l y sulfato de magnesio 1 g/l)
- 1 ml de solución micromineral (cloruro de calcio anhídrido 13,2 g/l, cloruro de manganeso anhídrido 10 g/l, cloruro de cobalto anhídrido 1 g/l y cloruro de hierro anhídrido 8 g/l)
- 0,5 ml de $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4^*$

Además, se agregó a los tubos de incubación 1 g de sustrato energético de acuerdo a las diferentes proporciones de almidón/sacarosa y amilosa/amilopectina en estudio, las cuales se detallan en la siguiente sección.

El procedimiento seguido se basó en la metodología propuesta por Van Nevel y Demeyer (119) y se describe a continuación.

* Actividad específica 200 mCi/m mol (Amersham, Inglaterra)

Por un lado, se tenían tubos de incubación denominados "blancos" los cuales contenían 40 ml de licor ruminal, 2 ml de ácido clorhídrico 6 N y 0,5 ml de $H_3^{32}PO_4$. Cuyo propósito fue de servir de estimador de P extracelular y la masa microbiana inicial.

La incubación se hizo durante seis horas, a 39°C, bajo condiciones anaeróbicas. La fermentación fue detenida mediante la adición de 2 ml de ácido clorhídrico 6 N.

Después de la acidificación, el material contenido en los tubos de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 22.000 g y 5°C.

En el líquido sobrenadante se determinó nitrógeno total (micro-Kjeldahl) y fósforo inorgánico (13). En los "blancos" se estimó la actividad específica del "pool" extracelular (AE) mediante la relación entre los mg de fósforo presentes y las cuentas por minuto obtenidas al medir la radioactividad.

El "Pellet" del centrifugado fue lavado cinco veces con 15 ml de una solución de cloruro de sodio (8,5 g/l) para eliminar la radioactividad extracelular.

El "Pellet" final se rehomogenizó con agua utilizando un agitador eléctrico y la suspensión final se diluyó a un volumen final de 50 ml (solución "A"). De esta solución se tomaron 5 ml y se digirieron con 5 ml de una solución de ácido perclórico (700 g/l) hasta la desaparición del color y luego se diluyó con agua a un volumen de 25 ml (solución "B").

En muestras duplicadas de 10 ml de la solución "B" se determinó la radioactividad incorporada (RI), en cuentas por minuto, con un contador

Geiger Muller* y un escalímetro SR-5*.

Para el cálculo del fósforo incorporado en la masa microbial (Pi) se utilizó la siguiente relación:

$$P_i = \frac{RI}{AE}$$

donde:

Pi = es la cantidad de fósforo incorporado por los microorganismos, mg

RI = es la cantidad de radioactividad incorporada, corregida por los blancos, medida en cuentas por minuto

AE = es la actividad específica del "pool" de fosfato extracelular, cuentas/minuto/mg fósforo.

Para la determinación de la materia seca se transfirieron muestras duplicadas de la solución "A" a discos de aluminio previamente tarados y se secaron por 24 horas a 105°C. En la misma solución se analizó el contenido de nitrógeno total (micro-Kjeldahl) y de fósforo total (13).

3.3 Diseño estadístico, parámetros y medición y análisis de la información

Se usó un arreglo factorial 5 x 4 en un diseño irrestricto al azar con tres repeticiones por tratamiento.

* Enterprises Ltd. Reading, England.

Los factores y niveles considerados en el estudio fueron:

<u>FACTORES</u>	<u>NIVELES</u>
Relación amilosa/amilopectina	100/0, 75/25, 50/50 25/75, 0/100
Relación almidón/sacarosa	10/90, 20/80, 30/70 50/50

La influencia de las variables enunciadas sobre el crecimiento microbial se evaluó mediante la medición de los siguientes parámetros:

1. Incorporación de fósforo, estimada mediante la incorporación de fósforo radioactivo (^{32}P), expresado en mg netos/ml licor ruminal
2. Incorporación de nitrógeno por los microorganismos del rumen, expresado en mg netos/ml licor ruminal
3. Materia seca ruminal sintetizada, expresado en mg netos/ml de licor ruminal.

Con base en el diseño propuesto, el análisis estadístico de la información se hizo de acuerdo al siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijk} = M + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = variable dependiente

M = media general

- A_i = efecto de la relación amilosa/amilopectina "i",
 $i = 1, 2, 3, 4, 5$
- B_j = efecto de la relación sacarosa/almidón "j",
 $j = 1, 2, 3, 4$
- $(AB)_{ij}$ = efecto de la interacción entre la relación amilosa/
 amilopectina "i" y la relación sacarosa/almidón "j"
- E_{ijk} = error experimental, $k = 1, 2, \dots, 20$

Además del análisis discriminatorio, se realizaron análisis de tendencias con el propósito de establecer relaciones funcionales entre las variables independientes y los parámetros seleccionados.

Para efectos del análisis de regresión se transformaron los valores de las relaciones de las variables independientes quedando de la siguiente manera:

1. Relación almidón sacarosa

$$10/90 == 0,1111$$

$$20/80 == 0,25$$

$$30/70 == 0,4286$$

$$50/50 == 1$$

2. Relación amilosa/amilopectina

$$100/0 == 100$$

$$75/25 == 3$$

$$50/50 == 1$$

$$25/75 == 0,3333$$

$$0/100 == 0,0000001$$

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a la presencia de turbidez, lo cual dificulta la medición de la radioactividad, se eliminó una muestra en los tratamientos II, III, VI, VII, IX, X, XII, XIV, XVI, XVII y XX quedando estos con dos observaciones como se observa en el Cuadro 1A del Apéndice.

En el Cuadro 1 se muestra un resumen de los análisis de variancia realizados.

Cuadro 1. Resumen de los análisis de variancia para fósforo incorporado (P_i) por el material microbial, nitrógeno incorporado (N_i) por el material microbial y aumentos en la materia seca microbial (MS_m).

FV	GL	CM		
		$^{32}P_i$	N_i	MS_m
Tratamientos	19	0,00019*	0,0093*	1,093*
Relación amilosa/amilopectina (A)	4	0,00046*	0,0245*	3,023*
Relación sacarosa/almidón (B)	3	0,00035*	0,0162*	1,577*
Interacción (A x B)	12	0,00006*	0,0025*	0,33*
Error	29	0,00001	0,00006	0,01
TOTAL	48			

* ($P \leq 0,01$)

El cuadro indica que existe influencia significativa de los tratamientos y sus interacciones sobre los parámetros medidos. Consecuentemente, se realizó un análisis de tendencias para determinar las relaciones entre las variables dependientes y las independientes.

Los resultados de esta investigación se muestran a continuación en una serie de figuras, basados en los resultados que aparecen en los Cuadros A1, A2 y A3 del Apéndice.

Los análisis de variancia mostraron que el efecto de la interacción fue significativa en los tres parámetros que se muestran en el Cuadro 1. Sin embargo, al probar los modelos de regresión, el coeficiente de regresión para la interacción lineal no fue significativo, lo que hace suponer que la significancia encontrada para la interacción en el análisis de variancia sea debida a efectos de mayor orden los cuales son difíciles de interpretar.

En la Figura 1 se observa que a medida que se aumenta la proporción de almidón en el sustrato energético se incrementa, hasta cierto punto la incorporación de fósforo por ml de solución ruminal, indicando lo anterior que existe una mayor captación de fósforo por parte de la masa microbial. Esto puede deberse al aumento en la síntesis de proteína microbial y a un aumento en la concentración de microorganismos del rumen, promovido por el uso de almidón, lo que iría acompañado de un aumento en los requerimientos de fósforo por parte de los mismos. Si es que en realidad la presencia de almidón estimuló un mayor crecimiento microbial, además de observarse un aumento en la incorporación de P, también debería notarse un aumento concomitante en la incorporación de N.

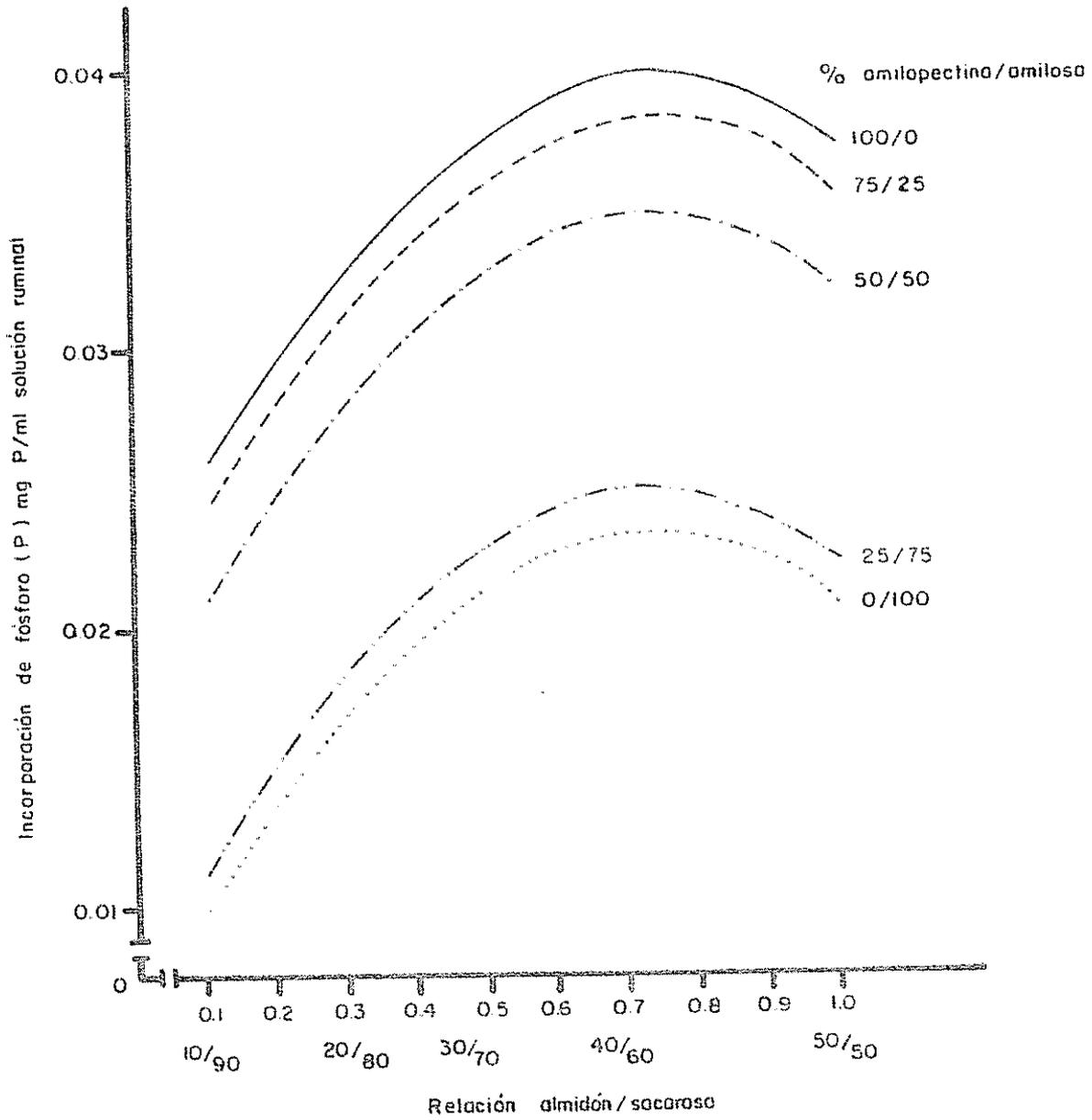


Fig. 1 Efecto de diferentes relaciones almidón/sacarosa (X_1) y amilosa/amilopeptina (X_2) sobre la incorporación de fósforo por los microorganismos del rumen, según la función :

$$Y_1 = 0.021062 + 0.050404X_1 - 0.004962X_2 - 0.03433X_1^2 + 0.000048X_2^2$$

($R^2 = 0.70$, $P \leq 0.01$)

Precisamente esto se confirma en la Figura 2, donde se observan los efectos de las relaciones almidón/sacarosa y amilosa/amilopectina sobre la síntesis de proteína microbial. Al aumentar la proporción de almidón se obtuvieron incrementos en las cantidades de nitrógeno microbial incorporado indicando lo anterior que hasta cierto punto la adición de almidón produce mayores incrementos en la síntesis de proteína microbial que la utilización de sacarosa. Lo anterior concuerda con lo obtenido por varios autores (53, 65, 66, 99, 123) quienes indican que estos aumentos se producen dado que los microorganismos asociados con la fermentación propionica son más eficientes que los asociados con la fermentación butírica, en la transformación del sustrato energético en proteína microbial.

Es bien sabido que en la serie de reacciones involucradas en la síntesis de proteína por parte de los microorganismos el factor limitante es el ATP requerido para la activación de los aminoácidos y posiblemente también para la formación y mantenimiento del sitio activo de la enzima de transferencia para la formación del nuevo enlace peptídico. Lehninger (73) indica que en la síntesis de proteínas se puede requerir hasta un 90 por ciento de energía biosintética celular, influenciado esto notablemente por las tasas de crecimiento. Por esta razón, la síntesis de proteínas es quizás el proceso biosintético más elaborado y complejo que tiene lugar en los organismos vivos.

Dada la hidrólisis más lenta de los almidones en comparación con los azúcares solubles (31, 49, 61, 99), estos proveen los microorganismos del rumen de una fuente más continua de energía, permitiéndoles

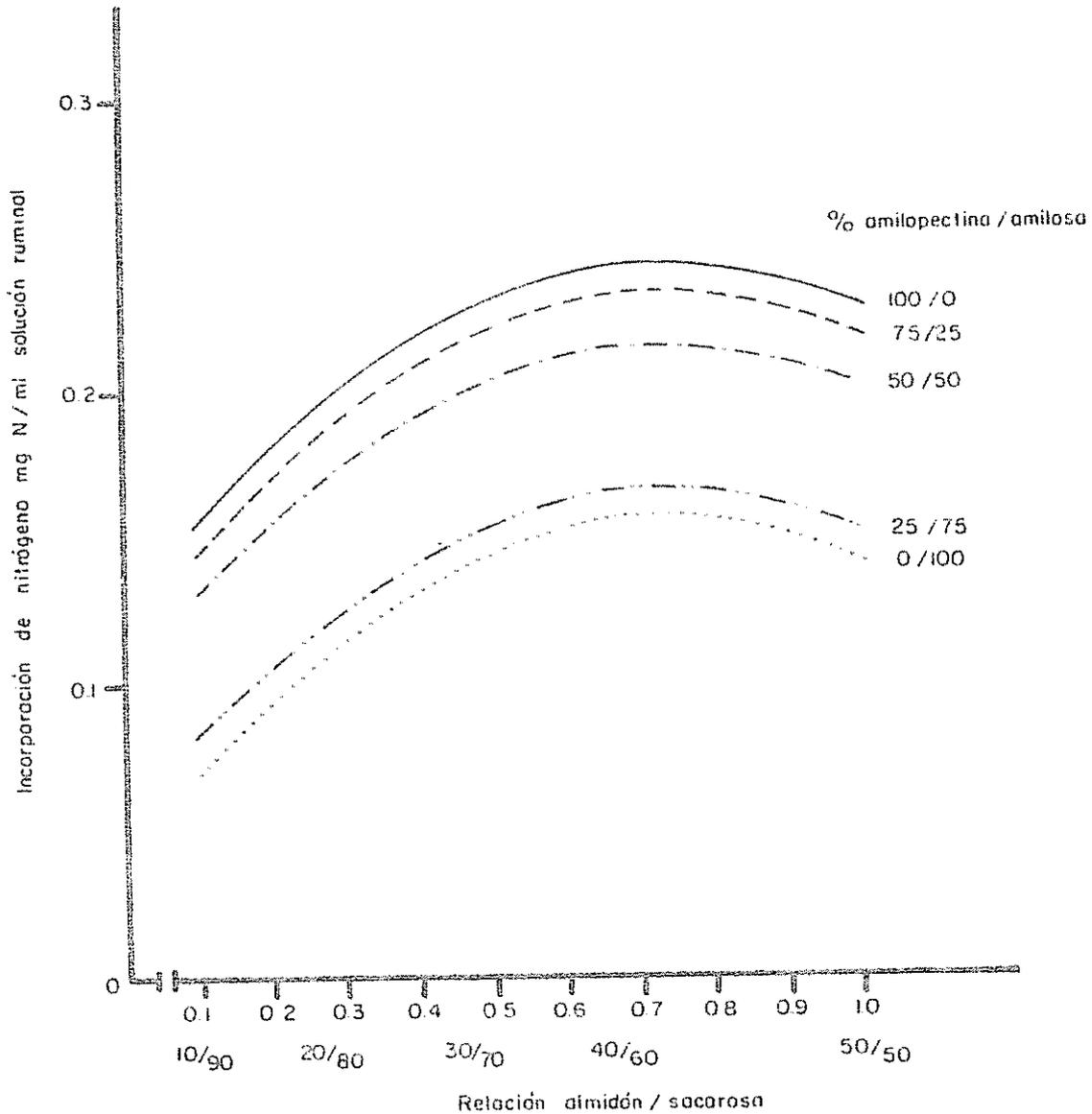


Fig. 2 Efecto de diferentes relaciones almidón/sacarosa (X_1) y amilosa/amilopeptina (X_2) sobre la incorporación de nitrógeno (Y_2) por los microorganismos del rumen, según la función :

$$Y_2 = 0.121567 + 0.319659X_1 - 0.02524X_2 - 0.213932X_1^2 + 0.000244X_2^2$$

$$(R^2 = 0.59, P \leq 0.01)$$

así realizar una síntesis más eficiente de proteína microbial. Así, se indica que la sacarosa es el carbohidrato más rápidamente fermentado en el rumen (31, 115, 116) desapareciendo entre el 80 y 100 por ciento en dos horas, produciendo, por lo tanto, la liberación de energía en forma más rápida de la que pueda ser utilizada por los microorganismos.

Sin embargo, es necesario recordar también, en este punto, que tanto la urea como la caseína que se usaron en el medio nutritivo, se caracterizan por una rápida tasa de hidrólisis. Esto indicaría la necesidad de contar con una fuente de carbohidratos muy solubles, tal como la sacarosa, para impedir que la energía sea un factor limitante en la utilización del amonio.

Lo que se acaba de discutir, a su vez explicaría por que con un exceso de almidón, existe una tendencia a disminuir tanto la incorporación de P como de N. Es decir, que se podría suponer que esta menor eficiencia fue causada por una desigualdad entre la rápida producción de amonio en los primeros minutos de incubación y la disponibilidad de energía rápidamente fermentable.

De las mismas Figuras 1 y 2 se desprende que al aumentar la cantidad de amilopectina, aumenta la incorporación de fósforo y nitrógeno del medio al material microbial lo que implica un aumento en la síntesis de proteína por parte de los microorganismos. Lo anterior podría deberse al hecho de que la amilopectina, por formar soluciones más estables con el agua que la amilosa (31), se encontraba distribuída más uniformemente en el medio y por lo tanto más asequible al ataque microbiano. Esto implicaría, también, que las posibilidades de que la amilosa escape

a la degradación en el rumen, son mayores en relación a la amilopectina.

Como una nota adicional se puede mencionar que la principal reserva energética de los protozoarios es la amilopectina (59, 91). Si es que este hecho tiene o no alguna relación causa-efecto con los resultados obtenidos escapa al dominio del autor.

La acción de la relación amilosa/amilopectina en los almidones sobre los microorganismos del rumen no había sido estudiada antes. Sin embargo, es de esperar que al ser la amilopectina una molécula más compleja y ramificada que la amilosa y de poseer dos tipos de enlaces glucosídicos distintos (α -1,4 y α -1,6) harán que su fermentación por parte de los microorganismos sea más lenta que la de la amilosa, ya que se requerirían dos tipos de enzimas para su hidrólisis. Esto podría actuar como un regulador en la liberación de la energía de la molécula de amilopectina y, por lo tanto, sería más gradual y continuo el aporte de energía para los microorganismos permitiendo que se transforme más eficientemente en proteína microbial. De hecho, Harrow y Mazur (49) indican que para hidrolizar los polisacáridos de cadena ramificada (amilopectina, glucógeno) hacen falta dos enzimas que son: una fosforilasa, que rompe los enlaces α -1-4 entre las unidades de glucosa produciendo glucosa 1-fosfato; sin embargo, esta fosforólisis se detiene cuando la enzima llega a un enlace α -1-6. La segunda enzima es una amilo 1-6 glucosidasa que separa las uniones glucosídicas α -1-6 permitiendo que la fosforilasa continúe su acción.

En el caso de las amilasas α o β estas tienen distinto modo de acción. Las primeras actúan sobre la amilasa y la amilopectina del

almidón, produciendo cadenas más cortas (dextrinas), las cuales, a su vez, se hidrolizan a maltosa. La β -amilasa ejerce su acción principalmente sobre la amilasa con producción de maltosa; también lo hace sobre la amilopectina, pero solamente un 50 por ciento de esta se transforma en maltosa quedando la otra mitad en forma de dextrina especial, la cual ya no se transforma. En conclusión, la α amilasa desdobra los enlaces glucosídicos dentro y fuera de los puntos de ramificación, en tanto que la β lo hace solamente en el exterior de dichos puntos.

Lo anterior indica que la habilidad de la población microbial para fermentar el almidón dependerá de la presencia de las enzimas adecuadas. Nasr (92) demostró que el licor de rumen contenía apreciables cantidades de una α -amilasa la cual es presumiblemente de origen microbial ya que esta no ha sido detectada en la saliva del rumiante. Hobson y McPherson (54) y Bailey y Robertson (11) han aislado amilasas y dextrinasas extracelulares de las bacterias del rumen; Bailey (10) aisló amilasas intracelulares en *Streptococcus bovis*. Con respecto a los protozoarios, Mould y Thomas (90) demostraron que los géneros de *Isotricha* y *Dasitricha* producen α -amilasas. La presencia de maltasas o isomaltasas en el licor del rumen ha sido demostrada por varios autores (11, 54, 92).

Existe alguna evidencia de interacción fermentativa entre diferentes fuentes de carbohidratos. Así, se indica que los niveles de azúcares en el medio ruminal controlan la hidrólisis de almidón a maltosa y glucosa, siendo inhibitorio a altos niveles (Coleman citado por Church (37)).

De lo anterior se puede concluir que la complejidad de la molécula de amilopectina, con relación a la de amilosa, y el hecho de que el nivel de azúcar en el medio controle la hidrólisis de estos compuestos, harían aun más lento el desdoblamiento de la molécula siendo así liberada la energía en una forma más gradual y, por lo tanto, más acorde con la capacidad biosintética de los microorganismos ruminales, promoviendo de esta manera una mayor síntesis microbial.

Además, se ha demostrado que existe una gran diferencia entre la fermentación de los polímeros y la de sus monómeros componentes (115) y que, compuestos muy relacionados químicamente presentan patrones de fermentación diferentes (115). Consecuentemente se podría esperar que las variaciones en la fermentación entre la amilosa y la amilopectina explicarían en parte las diferentes tasas de crecimiento microbial que se obtienen al utilizar uno u otro (o sus combinaciones) como sustrato energético.

La Figura 3, donde se observan los cambios netos en materia seca microbial, solo confirma y da apoyo a lo ya discutido hasta este punto en base a las Figuras 1 y 2. Los incrementos en la materia seca microbial son reflejo de los aumentos en la concentración de los microorganismos del rumen (48, 94) y ésta a su vez, es consecuencia de mayor actividad en la síntesis de proteína microbial. La uniformidad en el comportamiento de los tres parámetros seleccionados se manifiestan en la similitud de sus tendencias observadas y en el hecho de que los puntos máximos de las curvas se encuentran a valores de X_1 muy similares

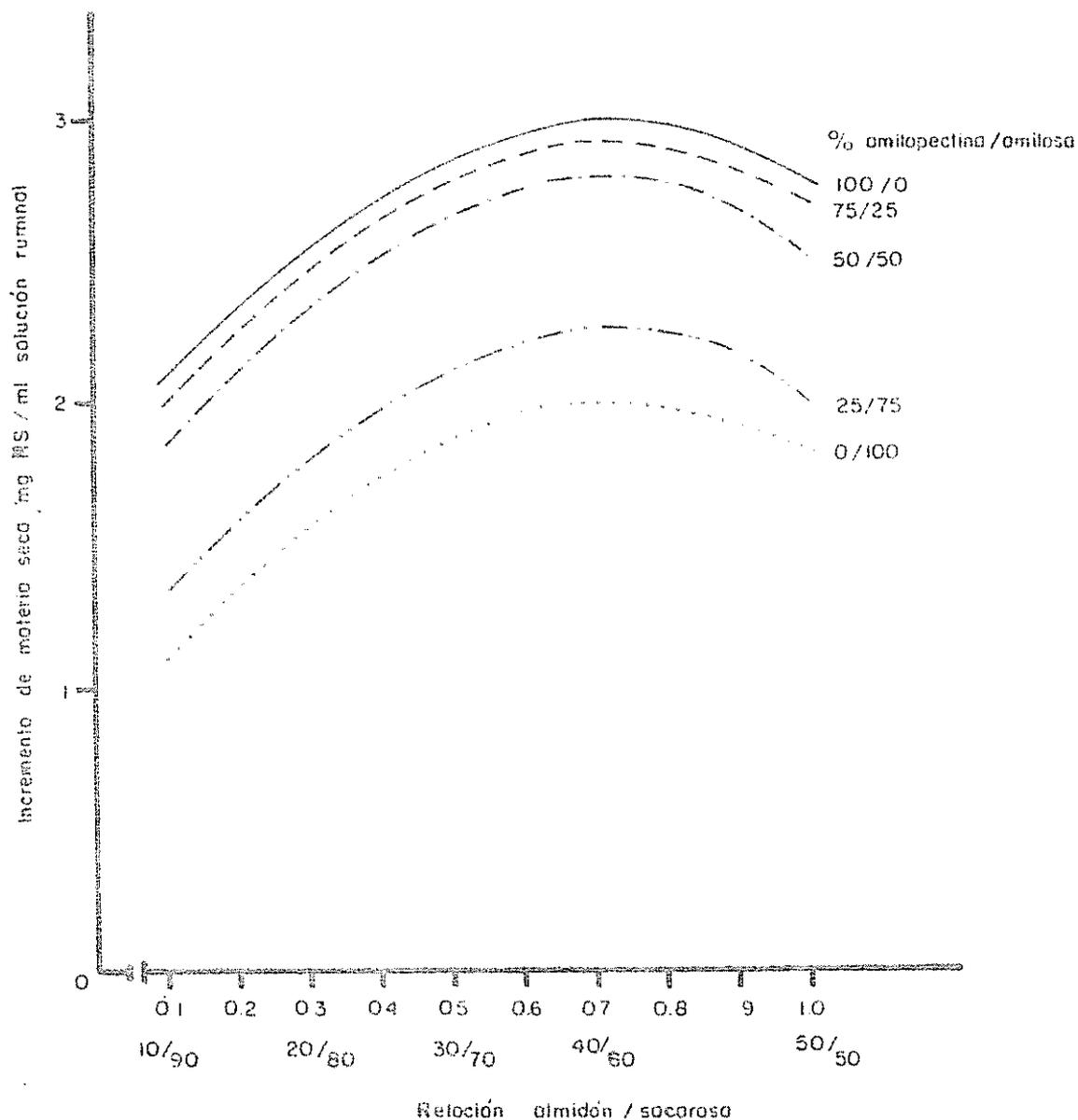


Fig.3 Efecto de diferentes relaciones almidón/sacarosa (X_1) y de amilosa/amilopectina (X_2) sobre el incremento de la materia seca microbial del contenido microbial según la función :

$$Y_3 = 1.755562 + 3.324283X_1 - 0.253698X_2 - 2.261545X_1^2 + 0.002438X_2^2$$

($R^2 = 0.57$, $P \leq 0.01$)

($X_1 = 0,73$ para Y_1 max., $X_1 = 0,747$ para Y_2 max. y $X_1 = 0,734$ para Y_3 max.). Estos valores de X_1 corresponden a las proporciones de almidón sacarosa de 42,3/57,7, 42,8/57,2 y 42,4/57,6, para fósforo incorporado, nitrógeno incorporado y materia seca microbiana neta, respectivamente.

En el presente trabajo los mayores índices de crecimiento microbiano se obtuvieron cuando el porcentaje de sustitución de la energía de la sacarosa por almidón fue de 42 por ciento (Figs. 1, 2 y 3). Lo anterior se relaciona estrechamente con lo obtenido en experimentos *in vivo* por Ruíz y Ruíz (106), quienes encontraron que los valores máximos de retención de nitrógeno se produjeron al sustituir un 40 por ciento de la energía metabolizable total por energía metabolizable proveniente de banano.

En el caso de animales en pastoreo, en iguales condiciones que los donantes del licor ruminal, se esperaría que las mayores ganancias de peso se obtendrían al usar una relación 40/60 de almidón/sacarosa. Lazarte (72) al suplementar en pastoreo con diferentes niveles de harina de yuca a vacas lecheras, encontró que comparada a la producción a base de pastoreo más 3 kg de melaza/vaca/día existía un aumento del 14 por ciento en la producción diaria al suministrar 400 g de harina de yuca/animal/día. Sin embargo, aumentos por encima de este nivel disminuyeron la producción.

Este comportamiento podría explicarse en función de la tendencia cuadrática de los incrementos netos del material microbiano obtenidos en el presente trabajo (Fig. 3). La razón de esto podría atribuirse a una disminución en la síntesis de materia microbiana debido a una

acidificación del contenido ruminal producida al usar altos niveles de almidón en la ración (29); teniendo como consecuencia una disminución en la capacidad fermentativa de los microorganismos y, por lo tanto, disminuyendo la eficiencia de la utilización de la energía.

También es importante hacer notar que en el presente trabajo los mayores valores observados, para los tres parámetros medidos (Cuadros 1A, 2A y 3A del Apéndice), se obtuvieron con la relación amilosa/amilopectina ²⁵/75, la cual es muy similar a la relación existente en la harina de yuca (49), con lo cual fueron adaptados los animales para el presente trabajo y como se hizo notar previamente, fue el alimento suplementario en el trabajo de Lazarte (72).

Los relativamente bajos valores de predicción obtenidos, manifiestan que en este tipo de estudios es necesario ejercer el máximo cuidado en las operaciones de muestreo, adición de sustratos, preparación de inóculos y análisis químico. Sin embargo, dada la similitud en las tendencias de las respuestas en cuanto a P incorporado, N incorporado y masa microbial, pareciera que este tipo de estudio es válido y, decididamente, económico para lograr primeras aproximaciones sobre el comportamiento animal ante manipulaciones nutricionales. A pesar de la similitud de tendencias en los tres parámetros medidos, los valores de R^2 justificarían la técnica de incorporación de P, confirmando así evaluaciones comparativas de varios investigadores citados en la revisión de literatura.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que:

1. La utilización de almidón en sustitución de azúcares solubles produce una mayor síntesis de material microbial.
2. La amilopectina es una fuente más eficiente en promover el crecimiento microbial que la amilosa.
3. La evaluación del crecimiento microbial con la técnica de incorporación de fósforo es más confiable que las técnicas de incorporación de N y aumentos en materia seca.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar el mismo trabajo variando las relaciones proteína verdadera-nitrógeno no proteico.
2. Evaluar mediante experimentos *IN VIVO* los resultados obtenidos en el presente trabajo y realizar la medición de la tasa de pesaje de almidón del rumen al tracto posterior.

6. RESUMEN

El presente trabajo se realizó en la Finca Experimental Ganadera, en los laboratorios de Nutrición Animal y Suelos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica, y en el laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, San José. Los objetivos fueron: evaluar el efecto que tiene la relación almidón/sacarosa, en el sustrato energético, sobre la producción de materia microbiana ruminal *in vitro* y determinar en qué medida se ve afectado el crecimiento microbiano al variar la relación amilosa/amilopectina en la porción amilica.

Se utilizaron como animales donantes de licor ruminal tres novillos, con fístula permanente al rumen, los cuales se alimentaron con pasto *ad libitum* y una mezcla suplementaria de 1 kg de melaza, 0,5 kg de harina de yuca y 0,3 kg de harina de carne. Las muestras se tomaron luego de mantener al animal 24 horas en ayuno. Después de filtrarlas a través de dos capas de lana de vidrio, éstas fueron transferidas anaeróticamente a tubos de incubación que contenían: 110 mg de caseína, 100 mg de urea, 10 mg de celulosa, 10 ml de solución buffer y macromineral, 1 ml de solución micromineral y 0,5 ml de $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4^*$. Además, se les agregó 1 g de sustrato energético de acuerdo a las diferentes proporciones de almidón/sacarosa y amilosa/amilopectina en estudio.

Se usó un arreglo factorial 5 x 4 en un diseño irrestricto al

* Actividad específica 200 mCi/mmd

azar con tres repeticiones por tratamiento. Los factores y niveles considerados fueron: X_1 = relación almidón/sacarosa $^{10}/_{90}$, $^{20}/_{80}$, $^{30}/_{70}$, y $^{50}/_{50}$; X_2 = relación amilosa/amilopectina $^{100}/_{0}$, $^{75}/_{25}$, $^{50}/_{50}$, $^{25}/_{75}$, $^0/_{100}$. La influencia de estas variables sobre el crecimiento microbial se evaluó mediante la medición de los siguientes parámetros: a) incorporación de fósforo (Y_1), mg por ml de licor ruminal; b) incorporación de nitrógeno por los microorganismos (Y_2), mg netos/ml de licor ruminal; c) materia seca ruminal sintetizada (Y_3), mg netos/ml licor ruminal.

La incorporación de fósforo se incrementó al aumentar la proporción de almidón en el medio y de amilopectina en el almidón según la función $Y_1 = 0,021 + 0,050 X_1 - 0,0050 X_2 - 0,034 X_1^2 + 0,00005 X_2^2$; ($R^2 = 0,70$ $P \leq 0,01$). La incorporación de nitrógeno y la síntesis de materia seca ruminal tuvieron respuestas similares y se describen en las siguientes funciones: $Y = 0,122 + 0,320 X_1 - 0,025 X_2 - 0,214 X_1^2 + 0,0024 X_2^2$; ($R^2 = 0,59$, $P \leq 0,01$); y $Y_3 = 1,76 + 3,32 X_1 - 0,25 X_2 - 2,26 X_1^2 + 0,0024 X_2^2$; ($R^2 = 0,57$, $P \leq 0,01$).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el uso de almidón en sustitución de azúcares solubles produce una mayor síntesis de material microbial y que la amilopectina es una fuente más eficiente en promover el crecimiento microbial que la amilosa. Esto sugeriría que fuentes ricas en almidón, del cual una alta proporción sea amilopectina, se podrían usar con mayor eficiencia en la producción animal que otras fuentes de almidón pobres en amilopectina o fuentes de azúcares o celulosa.

6a. SUMMARY

This study was carried out at the Livestock Experimental Station and the Animal Nutrition and Soils Laboratories of the Tropical Agricultural Research and Training Center (CATIE), in Turrialba, Costa Rica and in the laboratory of the Agricultural Research Center of the University of Costa Rica, San José. The objectives were: to evaluate the effect of the ratio starch/sucrose, in the energy substrate, on the microbial ruminal material *in vitro* and, to determine to what degree microbial growth was affected by varying the ratio amylose/amilopectin in the starch portion.

Three permanently fistulated steers were utilized as donors of rumen liquor. These steers were fed pasture *ad libitum* with a daily supplementation of 1 kg of molasses, 0.5 kg of cassava flour and 0.3 kg of meat meal. Samples were taken after a fasting period of 24 hours. The samples were filtered through two layers of glass wool, were then transferred anaerobically to incubation tubes containing: 110 mg of casein, 100 mg urea, 10 mg cellulose, 10 ml of a buffer solution and macrominerals, 1 ml of a microminerals, and 0,5 ml of $H_3^{32}PO_4^*$. In addition, 1 g of energy, substrate was added according to the different proportions of starch/sucrose and amylose/amilopectin being studied.

The design used was a 5 x 4 factorial randomized blocks with three replications per treatment. The factors and levels utilized were:

* Specific activity = 200 mCi/mmd

X_1 = ratio starch/sucrose, $^{10}/90$, $^{20}/80$, $^{30}/70$, and $^{50}/50$;

X_2 = ratio amylose/amylopectin $^{100}/0$, $^{75}/25$, $^{50}/50$, $^{25}/75$, $^0/100$.

The influence of these variables on microbial growth was evaluated by measuring the following parameters: a) incorporation of radioactive phosphorus (Y_1), mg per ml of rumen liquor; b) incorporation of nitrogen by microorganisms (Y_2), mg net/ml of rumen liquor; c) rumen dry matter synthesized (Y_3) mg net/ml rumen liquor.

The incorporation of radioactive phosphorous increased as the proportion of starch in the media increased. This function can be described as: $Y_1 = 0.021 + 0.05 X_1 - 0.005 X_2 - 0.034 X_1^2 + 0.00005 X_2^2$; ($R^2 = 0.70$ $P < 0.01$).

The incorporation of nitrogen and the synthesis of ruminal dry matter gave similar responses and were described by the following functions: $Y_2 = 0.122 + 0.32 X_1 - 0.025 X_2 - 0.214 X_1^2 + 0.00024 X_2^2$; ($R^2 = 0.59$, $P < 0.01$); and $Y_3 = 1.76 + 3.32 X_1 - 0.25 X_2 - 2.26 X_1^2 + 0.0024 X_2^2$ ($R^2 = 0.57$, $P < 0.01$).

The results obtained indicate that use of starch substituting for soluble sugars produce a greater microbial synthesis and that amylopectin is more effective than amylose in the promotion of microbial growth. This suggests that sources rich in starch, especially those that have a high proportion of amylopectin, can be used with greater efficiency in animal production than other sources of starch deficient in amylopectin or sources of sugars or cellulose.

7. LITERATURA CITADA

1. ABDO, K. M., KING, K. W. y ENGEL, R. W. Protein quality of rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 23(3):734-736. 1964.
2. ALLEN, S. A. y MILLER, E. L. Determination of nitrogen requirement for microbial growth from the effect of urea supplementation of a low N diet on abomasal N flow and N recycling in wethers and lambs. *British Journal of Nutrition* 36(3):353-368. 1976.
3. ALLISON, M. J. Nitrogen metabolism of ruminal microorganism. In A. T. Philipsen, ed. *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Oriel Press, Newcastle, England, 1970. pp. 456-473.
4. AL-RABBAT, M. F., BALDWIN, R. L. y WEIR, W. C. *In vitro* ¹⁵nitrogen-tracer technique for some kinetic measures of ruminal ammonia. *Journal of Dairy Science* 54(8):1150-1161. 1971.
5. _____, BALDWIN, R. L. y WEIR, W. C. Microbial growth dependence on ammonia nitrogen in the bovine rumen: A quantitative study. *Journal of Dairy Science* 54(8):1162-1172. 1971.
6. AMOS, H. E., EVANS, J. y BURDICK, D. Abomasal protein recovery and microbial protein synthesis in wethers fed high and low quality forage diets. *Journal of Animal Science* 42(4):970-976. 1976.
7. _____ y EVANS, J. Supplementary protein for low quality bermudagrass diets and microbial protein synthesis. *Journal of Animal Science* 43(4):861-868. 1976.
8. ANNISON, E. F., BROWN, R. E., LENG, R. A., LINDSAY, D. B. y WEST, L. E. Rates of entry and oxidation of acetate, glucose, D(-)-B-hidroxi-butirato, palmitato, oleato, estearato and rates of production and oxidation of propionato and butirato in fed and starved sheep. *Biochemical Journal* 104(1):135-147. 1967.
9. _____ y WHITE, R. R. Glucose utilization in sheep. *Biochemical Journal* 80(1):162-169. 1961.

10. BAILEY, R. W. The intracellular α -Galactosidase of a rumen strain of *Streptococcus bovis*. *Biochemical Journal* 86(1):509-514. 1963.
11. _____ y ROBERTSON, A. M. Carbohydrases of a rumen strain of *Lactobacillus bifidus*. 2. The intracellular α -1, 6-glucosidase (isomaltodextrinase). *Biochemical Journal* 82(1):272-277. 1962.
12. BALDWIN, R. L. Pathways of carbohydrate metabolism in the rumen. In R. W. Dougherty, ed. *Physiology of Digestion in the Ruminant*. Butterworths, Washington, 1965. pp. 346-359.
13. BATEMAN, J. V. Nutrición animal. Manual de métodos analíticos. Herrero, México, 1971. 469 p.
14. BEEVER, D. E., THOMPSON, D. J. y HARRISON, D. G. Energy and protein transformation in the rumen and the absorption of nutrients by sheep fed forage diets. Proc. 12th International Grassland Congress, Moscow, 3:56-62. 1974.
15. BELASCO, I. J. The role of carbohydrates in urea utilization, cellulose digestion and fatty acid formation. *Journal of Animal Science* 15(2):497-508. 1955.
16. BERGEN, W. G., PURSER, D. B. y CLINE, J. H. Enzymatic determinations of the protein quality of individual rumen bacteria. *Journal of Nutrition* 92(3):357-364. 1967.
17. _____, PURSER, D. B. y CLINE, J. H. Determination of limiting amino acid of rumen isolated microbial protein fed to rats. *Journal of Dairy Science* 51(10):1698-1700. 1968.
18. _____, PURSER, D. B. y CLINE, J. H. Effect of ration on the nutritive quality of rumen microbial protein. *Journal of Animal Science* 27(5):1497-1501. 1968.
19. BERGMAN, E. N. Quantitative aspects of glucose metabolism in pregnant and nonpregnant sheep. *American Journal of Physiology* 204(1):147-152. 1963.
20. BLACK, A. L., KLEIBER, M., SMITH, H. M. y STEWARD, D. N. Acetate as precursor of amino acids of casein in the dairy cow. *Biochimica et Biophysica Acta* 23(1):45-64. 1957.
21. BRID, P. R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. VI. The digestibility and utilization by sheep of ^{35}S from ^{35}S -labelled ruminal micro-organisms. *Australian Journal of Biological Science* 25(1):195-203. 1972.

22. BRID, P. R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. XII. Nitrogen and sulphur composition of animal bacteria. *Australian Journal of Biological Science* 26(6): 1429-1434. 1973.
23. BRODERICK, G. A., KOWALCZYK, T. y SATTER, L. D. Milk production response to supplementation with encapsulated methionine or casein per abomasum. *Journal of Dairy Science* 53(12):1714-1721. 1970.
24. BRYANT, M. P. Bacterial species of the rumen. *Bacteriological Review* 23(3):125-153. 1959.
25. _____ y ROBINSON, I. M. Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. *Applied Microbiology* 9(1):96-101. 1961.
26. _____ y ROBINSON, I. M. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *Journal of Bacteriology* 84(4):605-614. 1962.
27. BURROUGHS, W., TERNUS, G. S., TRENKLE, A. H., VETTER, R. L. y COOPER, C. C. Amino acid and proteins added to corn-urea rations. *Journal of Animal Science* 31(5):1037. 1970. (Abst.).
28. CLARK, J. Miel final como fuente de energía en dietas de poca fibra para la producción de leche. Efecto de la variación del nivel de forraje. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 6(1):19-33. 1972.
29. _____, GEERKEN, C. M., PRESTON, T. R. y ZAMORA, A. Mieles como fuente de energía en dietas bajas en fibra para la producción de leche. 3. Efecto de variar la relación mieles: grano en una dieta basal en fibra. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 7(2):159-171. 1973.
30. CZERKAWSKI, J. W. Chemical composition of microbial matter in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27(7):621-632. 1976.
31. _____ y BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. *British Journal of Nutrition* 23(4):925-937. 1969.

32. CHALMERS, M. I. y MARSHALL, B. M. Ruminal ammonia formation in relation to the utilization of ground nut meal and herring meal as protein sources for milk production. *Journal of Agricultural Science* 63(2):277-282. 1964.
33. CHALUPA, W. Problems in feeding urea to ruminants. *Journal of Animal Science* 27(1):207-219. 1968.
34. _____. Urea for ruminants. *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Cornell University, 1970. 64 p.
35. _____ y CHANDLER, J. E. Amino acid nutrition of ruminants. *In* International Atomic Energy Agency, ed. *Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants*. Viena, 1972. pp. 107-117.
36. _____, EVANS, J. L. y STILLIONS, M. C. Utilization of urea and corn gluten meal nitrogen. *Journal of Dairy Science* 46(6):640. 1963. (Abstr.).
37. CHURCH, D. C. Digestive physiology and nutrition of ruminants. 2nd. ed. D. C. Church, Corvallis, Oregon, 1975. 350 p.
38. DAWSON, R. M. C., HEMINGTON, N. y BAZLEWOOD, G. P. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *British Journal of Nutrition* 38(2):225-232. 1977.
39. DEVLIN, T. J. y WOODS, W. Nitrogen metabolism as influenced by lysine administration in and posterior to the rumen. *Journal of Animal Science* 23(4):872-873. 1964. (Abstr.).
40. _____. Nitrogen metabolism as influenced by lysine administration posterior to the rumen. *Journal of Animal Science* 24(3):878. 1965. (Abst.).
41. DOWNES, M. A. On the amino acids essential for the tissue of sheep. *Australian Journal of Biological Science* 14(2): 254-259. 1961.
42. EADIE, M. J., HYLDGAARD-JENSEN, J., MANN, S. O., REID, R. S. y WHITELAW, F. G. Observations on the microbiology and biochemistry of the rumen in cattle given different quantities of a pellet barley ration. *British Journal of Nutrition* 24(1):157-177. 1970.
43. _____ y MANN, S. O. Development of the rumen microbial population: High starch diets and instability. *In* A. T. Philipson, ed. *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Oriel Press, Newcastle, England, 1970. pp. 335-346.

44. EL-SAHZLY, K. y ABOU AKKADA, A. R. Techniques for studying protein synthesis by rumen micro-organism. In International Atomic Energy Agency, ed. Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants, Viena, 1972. pp. 47-56.
45. _____ y HUNGATE, R. E. Method for measuring diaminopimelic acid in total rumen contents and its application to the estimation of bacterial growth. Applied Microbiology 14(1): 27-30. 1966.
46. FONTENONT, J. P. Metabolismo y nutrición nitrogenados de los rumiantes. In D. C. Church, ed. Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes. Trad. por Francisco Castejón. Acribia, Zaragoza, España, 1974. v.2, pp. 211-241.
47. FORD, E. J. H. y REILLY, P. E. B. Amino acid utilization in the ruminant. Research in Veterinary Science 10(1):96-98. 1969.
48. HARRISON, D. G., BEEVER, D. E., THOMSON, D. J. y OSBOURN, D. F. The influence of diet upon the quality and types of amino acids entering and leaving the small intestine of sheep. Journal of Agricultural Science 81(3):391-401. 1973.
49. HARROW, B. y MAZUR, A. Textbook of biochemistry. 6th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1957. 565 p.
50. HEALD, P. J. The assessment of glucose-containing substances in rumen micro-organisms during a digestion cycle in sheep. British Journal of Nutrition 5(1):84-93. 1951.
51. HEIMER, L. G. y BARTLEY, E. E. Progress in the utilization of urea as protein replacer for ruminants. A review. Journal of Dairy Science 54(1):25-51. 1971.
52. HENDERICKS, H. K., DEMEYER, D. J. y VAN NEVEL, C. J. Problems in estimating microbial protein synthesis in the rumen. In International Atomic Energy Agency, ed. Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants. Viena, 1972. pp. 57-68.
53. HOBSON, I. P. The continuous culture of anaerobic bacteria. Journal of General Microbiology 47(1):53-62. 1967.
54. HOBSON, P. N. y McPHERSON, M. Amylases of *Clostridium butyricum* and a Streptococcus isolated from the rumen of sheep. Biochemical Journal 52(1):671-679. 1952.

55. HOGAN, J. P. y WESTON, R. H. The digestion of two diets differing in protein content but with similar capacities to sustain wool growth. *Australian Journal of Agricultural Research* 18(6):973-982. 1967.
56. HOOGENRAAD, N. J. y HIRD, F. J. R. The chemical composition of rumen bacteria and cell walls from rumen bacteria. *British Journal of Nutrition* 24(1):119-127. 1970.
57. _____, HIRD, F. J. R., WHITE, R. G. y LENG, R. A. Utilization of ^{14}C -labelled *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* by sheep. *British Journal of Nutrition* 24(1):129-144. 1970.
58. HUME, I. D. Synthesis of microbial protein in the rumen. III. The effect of dietary protein. *Australian Journal of Agricultural Research* 21(2):305-314. 1970.
59. HUNGATE, R. E. The rumen and its microbes. Academic Press, New York, 1966. 533 p.
60. _____. Quantitative aspects of the rumen fermentation. In R. W. Dougherty, ed. *Physiology of Digestion in the Ruminant*. Butterworth, Washington, D.C. 1965. pp. 311-321.
61. _____, MAH, R. A. y SIMESSEN, M. Rates of production of individual volatile fatty acids in the rumen of lactating cows. *Applied Microbiology* 9(6):554-561. 1961.
62. HUNTER, G. D. y MILLSON, G. C. Glugoneogenesis in the lactating cow. *Research in Veterinary Science* 5(1):1-6. 1964.
63. HUTTON, K., FAILEY, F. J. y ANNISON, E. F. Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as marker. *British Journal of Nutrition* 25(1):165-173. 1971.
64. IBRAHIM, E. A., INGLANS, J. R. y BRAGG, D. B. Separation and identification of amino acids present in rumen microorganisms. *Canadian Journal of Animal Science* 50(2):397-400. 1970.
65. ISHAQUE, M., THOMAS, P. C. y ROOK, J. A. I. Relationship between the pattern of ruminal fermentation and the flow of materials to the duodenum in sheep receiving a diet of barley, flaked maize and ground hay. *Proceedings of the Nutrition Society* 30(1):1A-2A. 1971. (Abstr.).

66. JACKSON, P., ROOK, J. A. F. y TOWERS, K. G. The physical form of barley grain and barley straw diet and metabolism in sheep. Proceedings of the Nutrition Society 30(1):1A. 1971. (Abstr.).
67. JOHNSON, B. C., HAMILTON, T. S., ROBINSON, W. B. y GAREY, J. C. On the mechanism of non-protein nitrogen utilization by ruminant. Journal of Animal Science 3(3):287-298. 1944.
68. KEENEY, M. Lipid metabolism in the rumen. In A. T. Philipson, ed. Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant. Oriel Press, Newcastle, England. 1970. pp. 489-503.
69. KELLOGG, D. W. y OWEN, F. G. Relation of ration sucrose level and content to lactation performance and rumen fermentation. Journal of Dairy Science 52(5):657-662. 1969.
70. _____ y OWEN, F. G. Alteration of *in vitro* rumen fermentation patterns with various levels of sucrose and cellulose. Journal of Dairy Science 52(9):1458-1460. 1969.
71. KRONFELD, D. S. y SIMESSEN, M. G. Glucose biokinetics in sheep. American Journal of Physiology 201(4):639-650. 1961.
72. LAZARTE, M. Efecto de la suplementación con yuca (*Manihot esculenta* Crantz) como fuente de almidón sobre la producción de leche de vacas en pastoreo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, UCR/CATIE, 1978. (En prensa).
73. LEHNINGER, A. L. Bioenergética. Trad. J. L. Cifuentes. Fondo Educativo Interamericano. Caracas, Venezuela, 1975. 242 p.
74. LENG, R. A. Glucose synthesis in ruminants. Advances in Veterinary Science 14:209-260. 1970.
75. _____. Salient features of the digestion of pastures by ruminants and other herbivores. In G. W. Butler y R. W. Bailey, eds. Chemistry and Biochemistry of Pastures. Academic Press, London. 1973. v.3, pp. 81-129.
76. _____ y ANNISON, E. F. Metabolism of acetate, propionate and butirate by sheep-liver slices. Biochemical Journal 86(2):319-327. 1963.
77. _____ y PRESTON, R. T. Caña de azúcar para la producción bovina: Limitaciones actuales, perspectivas y prioridades para la investigación. Producción Animal Tropical 1(1): 1-22. 1976.

78. LENG, R. A., STEEL, J. W. y LUICK, J. R. Contribution of propionate to glucose synthesis in sheep. *Biochemical Journal* 103(3):785-790. 1967.
79. LITTLE, C. O., MITCHELL, G. E. y POTTER, G. D. Dietary influence on ruminal fluids proteins. *Journal of Animal Science* 24(3): 893. 1965. (Abstr.).
80. LOFGREEN, G. P. y OTAGAKI, K. K. The net energy of blackstrap molasses for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 43(1):220-230. 1960.
81. MAALØE, E. O. y KJELDGAARD, N. O. Control of macromolecular synthesis. W. A. Benjamin, Inc., New York. 1966. 369 p.
82. MAENG, W. J., VAN NEVEL, C. J., BALDWIN, R. L. y MORRIS, J. G. Rumen microbial growth rates and yields: effects of amino acids and protein. *Journal of Dairy Science* 59(1):68-79. 1976.
83. MARTY, M., BENAVIDES, M. y PRESTON, T. R. Fermentación ruminal en los toros alimentados con sacarosa como fuente principal de carbohidratos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 8(2): 161-169. 1974.
84. McALLAN, A. B. y SMITH, R. H. Nucleic acids in bovine nutrition. 1. Determination in digesta and the fate of indigested nucleic acids in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society* 27(2):47A-48A. 1968. (Abstr.).
85. _____ y SMITH, R. H. Effect of dietary nitrogen source on carbohydrate metabolism in the rumen of the young steer. *British Journal of Nutrition* 36(3):511-522. 1976.
86. _____ y SMITH, R. H. Some effects of variation in carbohydrate and nitrogen intake on the chemical composition of mixed rumen bacteria from young steers. *British Journal of Nutrition* 37(1):55-65. 1977.
87. McNAUGHT, M. L., OWENS, E. C., HENRY, K. M. y KON, S. K. The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen. 8. The nutritive value of the protein preparations of dried rumen bacteria, rumen protozoa and brewer's yeast for rats. *Biochemical Journal* 56(1):151-156. 1954.
88. _____, SMITH, J. A. B., HENRY, K. M. y KON, S. K. The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen. 5. The isolation and nutritive value of a preparation of dried rumen bacteria. *Biochemical Journal* 46(1):32-36. 1950.

89. MILLS, R. C., BOOTH, A. N., BOHSTEDT, G. y HART, E. B. The utilization of urea by ruminants as influenced by the presence of starch in the ration. *Journal of Dairy Science* 25(11): 925-929. 1942.
90. MOULD, D. L. y THOMAS, G. J. The enzymatic degradation of starch by *Holotrich* protozoa from sheep rumen. *Biochemical Journal* 69(1):327-337. 1958.
91. NAGA, M. M. A. y EL-SHASLY, K. The metabolic characterization of the ciliate protozoon *Eudiplodinium medium* from the rumen of buffalo. *Journal of General Microbiology* 53(2):305-315. 1968.
92. NASR, H. Amylolytic activity in the rumen of the sheep. *Journal of Agricultural Science* 40(3):308-310. 1950.
93. NEHRING, K., SCHEIMAN, R., HOFFMAN, L., KLIPPEL, W. y JENTSOH, W. Utilization of the energy of cellulose and sucrose by cattle, sheep and pigs. In K. L. Blaxter, ed. *Energy Metabolism*. Academic Press, New York. 1965. 249 p.
94. NIKCOLIC, A., JOVANOVIC, J. M., DJORJEVIC, D. STOSIC, D., CMILJANIC, R. y BERBRADICA, D. Some effects of dietary composition on the utilization of urea in the bovine rumen. In International Atomic Energy Agency, ed. *Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants*, Viena, 1972. pp. 119-125.
95. OLTJEN, R. R. Effects of feeding ruminants non-protein nitrogen as the only nitrogen source. *Journal of Animal Science* 28(5):673-682. 1969.
96. _____ y PUTNAM, P. A. Plasma amino acids and nitrogen retention by steers fed purified diets containing urea or isolated soy protein. *Journal of Nutrition* 89(4):385-391. 1966.
97. ORTEN, A. V. Intestinal phase of amino acid nutrition. *Federation Proceedings* 22(5):1103-1113. 1963.
98. OWEN, F. G., KELLOGG, D. W. y HOWARD, W. T. Effect of molasses in normal and high grain rations on utilization of nutrients for lactation. *Journal of Dairy Science* 50(7):1120-1125. 1967.
99. PRESTON, T. R. Qualitative aspects of animal protein production from non-protein nitrogen. In International Atomic Energy Agency, ed. *Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants*. Viena, 1972. pp. 1-12.

100. PURSER, D. E. Nitrogen metabolism in the rumen: microorganisms as a source of protein for the ruminant animal. *Journal of Animal Science* 30(6):988-1001. 1970.
101. _____ y BUECHLER, S. M. Amino acid composition of rumen organisms. *Journal of Dairy Science* 49(1):81-84. 1966.
102. REIS, P. J. The growth and composition of wool. IV. The differential response of growth and of sulphur content of wool to the level of sulphur-containing amino acids given per abomasum. *Australian Journal of Biological Science* 20(4): 809-826. 1967.
103. _____ y SCHINCKEL, P. G. The growth and composition of wool. II. The effect of casein, gelatin, and sulphur-containing amino acids given per abomasum. *Australian Journal of Biological Science* 17(2):532-547. 1964.
104. ROBARDS, G. E. The wool growth of Merino sheep receiving an exponential pattern of methionine infusion to the abomasum. *Australian Journal of Agricultural Research* 22(2):261-270. 1971.
105. RODRIGUEZ, V. y PRESTON, R. T. El valor nutritivo de la miel final y el maíz con proteína verdadera o NNP para la producción de leche. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 3(2): 155-164. 1969.
106. RUIZ, A. y RUIZ, M. E. Utilización de la gallinaza en la alimentación de bovinos. III. Producción de carne en función de diversos niveles de gallinaza y almidón. *Turrialba (Costa Rica)* 28(): . (En prensa).
107. RUIZ, R. y MOLINA, J. R. Efecto de la dieta sobre el comportamiento histoquímico de algunas enzimas respiratorias de la ATPasa en el epitelio ruminal de bovinos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 10(3):283-290. 1976.
108. RYAN, R. K. Concentrations of glucose and low-molecular-weight acids in the rumen of sheep following the addition of large amounts of wheat to the rumen. *American Journal of Veterinary Research* 25(106):646-652. 1964.
109. _____. Concentration of glucose and low-molecular-weight acids in the rumen of sheep changed gradually from a hay to a hay-plus-grain diet. *American Journal of Veterinary Research* 25(106):653-659. 1964.

110. SALTER, D. y SMITH, R. H. Digestibilities of nitrogen compounds in rumen bacteria and other components of digesta in small intestine of young steers. *British Journal of Nutrition* 38(2):207-216. 1977.
111. SINGH, U. B. y SAWHNEY, P. C. Influence of different carbohydrates on growth and nutrient digestibility of rations containing urea in growing calves. *Indian Veterinary Journal* 44(3):236-241. 1967.
112. _____, VERMA, D. N., VARMA, A. y RANJHAN, S. K. The relationship between rumen bacterial growth, intake of dry matter, digestible organic matter and volatile fatty acid production in buffalo (*Bos bubalis*) calves. *British Journal of Nutrition* 38(3):335-340. 1977.
113. SMITH, R. H. Reviews of the progress of dairy science. Section G. General nitrogen metabolism and the rumen. *Journal of Dairy Research* 36(2):313-331. 1969.
114. STOOBS, T. H. y MINSON, D. J. Importance of post-ruminal protein for cows grazing tropical pastures. *Tropical Crops and Pastures*. CSIRO. Divisional Report 1975-1976. pp. 78-82.
115. SUTTON, J. D. The fermentation of soluble carbohydrates in rumen contents of cows fed diets containing a large proportion of hay. *British Journal of Nutrition* 22(4):689-712. 1968.
116. _____. The fermentation of soluble carbohydrates in rumen contents of cows given diets containing a large proportion of flaked maize. *British Journal of Nutrition* 23(3):567-583. 1969.
117. THOMPSON, J. K. Polysaccharide synthesis and degradation by rumen micro-organisms *in vitro*. *Journal of Agricultural Science* 76(3):423-432. 1971.
118. TUCKER, R. E. Nitrogen metabolism in lambs fed urea as the only nitrogen source. *Journal of Animal Science* 30(2):330. 1970. (Abstr.).
119. VAN NEVEL, C. J. y DEMEYER, D. I. Determination of rumen microbial growth *in vitro* from ³²P-labelled phosphate incorporation. *British Journal of Nutrition* 38(1):101-114. 1977.

120. VAN NEVEL, C. J., DEMEYER, D. I. y MAENG, W. J. Problems in estimating rumen microbial growth from phosphorus-32 incorporation. *In* International Atomic Energy Agency, ed. Nuclear Techniques in Animal Production and Health. Viena, 1976. pp. 309-317.
121. WALKER, K. J. Measurement *in vivo* of rumen microbial protein synthesis. Australian Journal of Agricultural Research 26(4):689-698. 1975.
122. WALKER, D. J. y WADER, C. J. Method for measuring microbial growth in rumen content. Applied Microbiology 16(8):1124-1131. 1968.
123. WALLNOFER, P., BALDWIN, R. L. y STAGNO, E. Conversion of C¹⁴-labelled substrates to volatile fatty acids by the rumen microbiota. Applied Microbiology 14(6):1004-1010. 1966.
124. WELLER, R. A. Amino acid composition of hydrolysates of microbial preparations from the rumen or sheep. Australian Journal of Biological Science 10(3):384-389. 1957.
125. _____, GRAY, F. V. y PILGRIN, A. F. Conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of sheep. British of Nutrition 12(1):421-428. 1958.
126. WRIGHT, P. L. Body weight gain and wool growth response to formaldehyde treated casein and sulphur amino acids. Journal of Animal Science 33(1):137-141. 1971.
127. ZAKI-EL-DIN, K. y EL-SHAZLY, K. Evaluation of a method of measuring fermentation rates and net growth of rumen microorganisms. Applied Microbiology 17(6):801-804. 1969.

8. A P E N D I C E

Cuadro 1A. Valores observados de fósforo incorporado, mg por ml de solución ruminal
(los números romanos indican el número de tratamiento).

		Relación almidón/sacarosa en la ración				
		10/90	20/80	30/70	50/50	
1	100/0	0,016	0,021	0,025	0,026	
		I 0,013	II 0,023	III 0,023	IV 0,024	
		0,015			0,027	
	75/25	0,018	0,013	0,018	0,023	
		V 0,018	VII 0,013	VII 0,021	0,024	
		0,014			0,022	
	50/50	0,017	0,019	0,031	0,026	
		IX 0,018	X 0,018	XI 0,031	0,028	
				0,033		
	25/75	0,021	0,032	0,047	0,040	
		XIII 0,020	XIV 0,030	XV 0,045	0,043	
		0,020		0,044		
0/100	0,026	0,031	0,029	0,035		
	XVII 0,031	XVIII 0,035	XIX 0,028	0,037		
		0,025	0,030			

Relación
amilosa/
amilopectina en
la
ración

Cuadro 2A. Valores observados de nitrógeno incorporado, en mg por ml de solución ruminal (los números romanos indican el número del tratamiento).

		Relación almidón/sacarosa en la ración			
		10/90	20/80	30/70	50/50
		0,078			0,134
100/0	I	0,063	0,104	0,147	0,140
		0,073	0,114	0,135	0,124
		0,107			0,155
75/25	V	0,113	0,077	0,115	0,162
		0,107	0,077	0,134	0,149
		0,112	0,121	0,200	0,194
50/50	IX	0,119	0,114	0,213	0,209
				0,213	
		0,152		0,322	0,244
25/75	XIII	0,145	0,243	0,308	0,263
		0,145	0,228	0,301	
		0,134	0,169	0,138	0,197
0/100	XVII	0,166	0,160	0,133	0,209
			0,160	0,143	
					XX

Cuadro 3A. Valores observados de incremento de materia seca, en mg por ml de solución ruminal (los números romanos indican el número de tratamiento).

		Relación almidón/sacarosa en la ración				
		10/90	20/80	30/70	50/50	
100/0		0,99			1,80	
	I	0,99	1,47	1,91	1,83	
		1,09	1,54	1,82	1,80	
75/25		1,60			1,98	
	V	1,73	1,70	1,79	2,09	
		1,51	1,61	1,60	1,89	
50/50		1,53			2,43	
	IX	1,60	1,91	2,55	2,60	
			1,92	2,59	2,60	
25/75		2,09			3,07	
	XIII	2,01	3,00	3,70	3,25	
		2,03	2,83	3,68		
0/100		1,86			2,53	
	XVII	2,31	2,27	1,73		
			2,21		2,68	
			2,24	1,84		