



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN
EL TRÓPICO

PRODUCCIÓN DE UN ALIMENTO FERMENTADO EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE LA POLLINAZA Y VITAFERT

ADRIÁN RAÚL LÓPEZ CAMPOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2012

La presente tesis titulada: **Producción de un alimento fermentado en estado sólido a partir de la pulínaza y Vitafert** realizada por el alumno: **Adrián Raúl López Campos**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TROPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO 

DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ

ASESOR 

DRA. CONSUELO DEL C. BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR 

DR. EMILIO MANUEL ARANDA IBÁÑEZ

ASESOR 

**DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ
CARRERA**

H. Cárdenas, Tabasco, 7 de Diciembre 2012

PRODUCCIÓN DE UN ALIMENTO FERMENTADO EN ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE LA POLLINAZA Y VITAFERT

Adrián Raúl López Campos, MC

Colegio de Posgraduados 2012.

Con el objetivo de determinar el tiempo de fermentación en estado sólido (FES) anaerobio de una mezcla de pollinaza, melaza y Vitafert que actué sobre poblaciones de enterobacterias indeseables y mejore las características de indicadores nutricionales, se estudiaron ocho tiempos de FES (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 días), en un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. *Echerichia coli* desapareció en el día 10 de FES. El pH, contenido de bacterias aeróbicas, fibra detergente neutro (FDN), y hemicelulosa, fue menor, con el transcurso de la fermentación, los menores valores se encontraron a partir del día 25 de FES. El proceso de fermentación incrementó el contenido de proteína cruda (PC), proteína verdadera (PV), ácido láctico, amoníaco (NH₃), levaduras y la degradación *in situ* de la MS (DIMS), los mayores valores se presentaron a partir del día 25 de FES. La materia seca (MS) y fibra detergente ácido (FDA), se mantuvo estable durante la FES, mientras el contenido de lactobacilos fue mayor en el día 10 de fermentación para luego disminuir según avanzó el tiempo. Se concluye que el proceso FES de la mezcla de pollinaza, melaza y Vitafert, elimina *Echerichia coli*, disminuye el pH, contenido de bacterias aeróbicas y fracciones fibrosas (FDN), aumenta el contenido de PC, PV, ácido láctico, N-NH₃, levaduras, contenido celular y degradación *in situ* de la MS.

Palabras claves: fermentación en estado sólido, pollinaza, Vitafert.

PRODUCTION A FERMENTED FOOD IN SOLID STATE FROM THE POULTRY LITTER AND VITAFERT

Adrián Raúl López Campos, MC

Colegio de Posgraduados 2012.

In order to obtain a fermented food for cattle a mixture of poultry litter, molasses and Vitafert were studied in eight times (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 days) of solid estate fermentation (SSF) anaerobic in a completely randomized design with three replicates per treatment. *Escherichia coli* was removed on day 10 of SSF. The pH, aerobic bacteria count, neutral detergent fiber (NDF), and hemicellulose was lower, during the fermentation time, and the lowest value was found on day 25 of SSF. Lactic acid content, NH₃, yeast cell count and in situ degradation of matter dry were higher, pausing of fermentation, the highest value was found on day 25 of SSF. Dry matter (MD) and acid detergent fiber (ADF) remained stable through the SSF. The crude protein and true protein, increased as the days went by fermentation, the highest value was found on day 25 and content of lactobacilli was higher on day 10 of fermentation and decreased as the days went by fermentation. Conclusion the SSF anaerobic process remove *Echerichia coli*, lower the pH, aerobic bacteria, and fibrous fractions (NDF), and the lactic acid, and N-NH₃ concentration, and yeast cell content and in situ of MD.

Keywords: solid state fermentation, poultry litter, Vitafert.

DEDICATORIA

A Dios:

Por permitirme emprender este proyecto, por darme la fuerza necesaria en cada día para seguir adelante hasta culminar.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo, mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos, los quiero mucho.

A mis hermanos; Andrés y Adan, por estar conmigo y apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACyT-Gobierno del Estado de Tabasco, por el apoyo al proyecto “Intensificación en la producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos que protejan al medio ambiente”, Clave **TAB-2007-C09-74746**, del cual forma parte esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, por aceptarme y poder realizar mis estudios.

A mi **consejo Particular**:

A mi consejero el **Dr. Jesús Alberto ramos Juárez**, por darme la oportunidad y confianza de ser su tesista, además del gran apoyo para mi investigación.

A la **Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz**, por las facilidades prestadas para la realización de la investigación en el laboratorio de biología molecular, por su paciencia, conocimientos compartidos, pero sobre todo su amistad.

Al **Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez**, por su amistad, confianza y conocimiento transmitidos a lo largo de mi formación.

Al **Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera**, por su amistad y conocimiento transmitidos a lo largo de mi formación.

A toda la persona que de una u otra forma, fueron parte esencial en esta etapa:

Al **Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz** por su apoyo incondicional, acertados comentarios, por su confianza; pero sobre todo por su amistad.

Al **Dr. Arabel Elías Iglesias**, por sus acertados comentarios y apoyo incondicional.

Al Técnico de laboratorio de ciencia animal **José Luis Jiménez de Dios** por su apoyo y amistad

Al **MC Héctor Sánchez S.**, por sus experiencia transmitida y amistad.

Al **CP. Manuel Burelo Naranjo** por las facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II.OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL.	3
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.	3
2.3 HIPÓTESIS.	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Características de la producción bovina en el Trópico.	4
3.2 Los forrajes en la producción animal.	5
3.3 Pollinaza.	8
3.3.1 Producción e importancia de la pollinaza en la alimentación animal.	11
3.3.2 Problemática en el uso de la pollinaza.....	13
3.3.3 Normas de uso de la pollinaza.	15
3.3.4 Métodos de Manejo de la pollinaza.	16
3.4 Mecanismos de los ácidos orgánicos en microorganismos patógenos.....	18
3.5 Concepto de fermentación y respiración.....	19
3.6 Fermentación en estado sólido.	21
3.6.1 Ventajas y Desventajas de los procesos de FES.....	22
3.6.2 Desventajas de la FES.....	23
3.7 Factores que influyen en la fermentación en estado sólido.	24
3.7.1 Fuente de carbono y la relación carbono/nitrógeno	24
3.7.2 Contenido de Humedad del sustrato y actividad de agua (a_w).	24
3.7.3 Tamaño de partículas.....	25
3.7.4 Transferencia de masa y aeración.....	26
3.7.6 Potencial de hidrogeno (pH).....	27
3.8 Vitafert.	28
IV.MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Localización	29
4.2 Tratamientos estudiados.	30

4.3 Procedimiento experimental.	32
4.5 Preparación del Vitafert.....	33
4.6 Determinación de parámetros fermentativos:.....	34
4.6.1 pH.	34
4.6.2 Amoniaco.....	34
4.7 Determinación de parámetros bromatológicos.....	34
4.7.1 Materia seca (MS).	34
4.7.2 Proteína cruda (PC), materia seca (MS) y cenizas.....	34
4.7.3 Nitrógeno no proteínico (NNP x 6.25) y proteína verdadera (PV).....	34
4.7.4 Relación NNP-PV	35
4.7.5 Materia orgánica (MO).....	35
4.7.6 Fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA).....	35
4.7.7 Hemicelulosa.....	35
4.7.8 Contenido celular.....	35
4.7.9 Degradación <i>in situ</i> de la materia seca (DIMS).....	35
4.7.10 Degradación <i>in situ</i> de la materia orgánica (DIMO)	36
4.7.11 Cálculo del contenido de energía metabolizable (EM).....	37
4.8 Determinación de parámetros microbiológicos.	37
V. RESULTADOS.....	39
5.1 Parámetros fermentativos.....	39
5.2 Parámetros químicos.....	41
El valor más alto de MS se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (91.91 %). Al mezclar la pollinaza con los ingredientes indicados en el cuadro 4 para su fermentación, la MS disminuyó significativamente y se mantuvo entre 69.36 y 71.21% (Anexo 2)	41
5.3 Parámetros microbiológicos.	48
VI. DISCUSIÓN	51
VII. CONCLUSIONES.....	55
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	56
IX. ANEXOS.....	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Análisis proximal de 19 muestras de cama de pollo.	10
Cuadro 2.- Valor de pH y crecimiento de lactobacilos y levaduras (Log ufc/ml) en el Vitafert.	29
Cuadro 3.- Tratamientos estudiados.	31
Cuadro 4.- Componentes del alimento.	32
Cuadro 5.- Ingredientes usados para elaborar el Vitafert (%)	33

LISTA FIGURAS

Figura 1.- Ubicación geográfica del Colegio de Postgraduados campus Tabasco.	30
Figura 2.- Diluciones para realizar la siembra en cajas petrí y cuenta viable.	38
Figura 3 Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el pH.	40
Figura 4.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en la concentración de ácido láctico.	40
Figura 5.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de NH ₃	41
Figura 6.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de proteína cruda.	42
Figura 7.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de proteína verdadera.	43
Figura 8.- Efecto de los días de fermentación en la relación PV-PC.	43
Figura 9.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de FDN.	45
Figura 10.- Efecto de los días de fermentación en el contenido de FDA.	45
Figura 11.- Efecto de los días de fermentación en el contenido celular.	46
Figura 12.- Efecto de los días de fermentación en el contenido de hemicelulosa.	46
Figura 13.- Efecto de los días de fermentación en la DIMS.	47
Figura 14.- Efecto de los días de fermentación en el contenido de lactobacilos (Log ufc/g)	49
Figura 15.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido bacterias aeróbicas (Log ufc/g).	50
Figura 16.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de levaduras (Log ufc/g).	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el pH, ácido láctico y amoniacó.	67
Anexo 2.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en la materia seca, proteína cruda, proteína verdadera y relación PV-PC	68
Anexo 3.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en la fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, contenido celular, y hemicelulosa.	69
Anexo 4.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de cenizas, materia orgánica, DIMS y DIMO a 24 hrs.	70
Anexo 5.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de lactobacilos, bacterias aeróbicas, <i>Echerichia coli</i> y levaduras (Log ufc/ml).	71

I. INTRODUCCIÓN

En el sureste de México y particularmente en el Estado de Tabasco, el sistema de producción bovina de doble propósito (carne y leche) es ampliamente utilizado. El sistema se basa en el uso de los pastos y forrajes como principal fuente de alimento, con limitado suministro de suplementos y baja productividad por deficiencias nutricionales de los pastos y forrajes (De Dios 2003). La suplementación estratégica puede incrementar la eficiencia de utilización de los pastos y mejorar la producción de leche y la ganancia de peso por animal y por unidad de superficie.

La pollinaza, coproducto de la industria avícola, representa una fuente de proteínas y minerales en la alimentación de rumiantes. Sin embargo, la presencia de residuos químicos, medicamentos veterinarios, además, alta carga de microorganismos patógenos (*Echerichia. Coli Salmonella* y *Coccideas*) procedentes del tracto gastrointestinal de las aves, constituyen un riesgo potencial (Castellanos y Murguía, 2002), en producir enfermedades que pudieran afectar al ganado vacuno, ovejas e incluso al hombre. En la republica de Cuba en el 2003, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) junto con el Ministerio de Salud (MS), decretaron que las excretas de aves de engorda (pollinaza) u otras etapas de cría o desarrollo, solas o mezcladas con otros materiales deben ser tratadas con procesos físicos, químicos o biológicos o bien una combinación de ellos, para poder ser utilizada como fuente de proteína,

fertilizante, enmienda o mejorador de suelos, sustrato de cultivos agrícolas o en dietas de rumiantes.

Los procesos de fermentación en estado sólido (FES), recientemente han sido explorados para la producción de alimentos fermentados, alimentación animal, producción de etanol, enzimas incluyendo celulolíticas y lignolíticas, bioremediación de efluentes textiles y degradación de tintes (Nigan & Robinson 2004). Altas concentraciones de ácidos orgánicos, en especial ácido láctico, son derivados de los procesos fermentativos, producto final del proceso catabólico desarrollado por los lactobacilos (Van Winsen *et al*, 2001), estos ácidos inhiben las funciones celulares, y crecimiento de microorganismos, como los Enterobacteriaceae que no toleran grandes diferencias entre el pH interno de la célula y el externo, lo que en ocasiones puede provocar la muerte (García, *et al*, 2008; Elías y Herrera 2008 y 2010).

Arias (2010), a nivel de laboratorio fermentó aeróbicamente en estado sólido; pollinaza con melaza, minerales, y Vitafert, durante 24 horas. El pH de la pollinaza disminuyó, incrementó la proteína cruda y disminuyó las poblaciones de microorganismos. Sin embargo, el proceso reportado por Arias limita la producción de alimento a mayor escala. Por su parte los procesos de FES anaerobia, son una alternativa para la producción de alimentos fermentados a mayor escala, a partir de pollinaza, melaza y Vitafert.

II.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el tiempo de fermentación en estado sólido anaerobia de la mezcla de pollinaza, melaza y Vitafert que actué sobre poblaciones de enterobacterias y mejore las características de indicadores nutricionales.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Conocer las características nutricionales de la pollinaza fermentada en bolsas de nylon.
2. Disminuir la carga microbiana indeseable de la pollinaza mediante el proceso de fermentación anaeróbica.

2.3 HIPÓTESIS.

La fermentación anaeróbica en estado sólido de la pollinaza, disminuye el pH y la carga microbiana indeseable.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Características de la producción bovina en el Trópico.

El trópico húmedo tiene una superficie de 24 millones de hectáreas que constituye el 12 % del territorio nacional. Se localiza principalmente en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche y Quintana Roo (Enríquez 2001). Se caracteriza con tres épocas climatológicas; La época de lluvias, que abarca los últimos días de la primavera, todo el verano y el inicio del otoño, caracterizada por suficiente humedad, temperatura óptima y radiación solar conveniente para el crecimiento vegetal lo que resulta en abundancia de forraje. La época de nortes o lluvias, abarca los meses de otoño y todo el invierno y se caracteriza por alta humedad, temperaturas más bajas de lo normal y radiación solar insuficiente que impide el óptimo crecimiento del pasto. La época de secas, comprende los últimos días del invierno, la primavera y en ocasiones se extiende a parte del verano, se caracteriza por radiación y temperatura que pueden ser adecuadas, pero se carece de humedad, por lo que el crecimiento del pasto es restringido (Hernández 2002). Particularmente en las zonas bajas del estado de Tabasco durante esta época se presenta la mayor producción de forraje, debido a la humedad residual presente en los suelos; mientras que en la época de lluvias, se obtiene la menor disponibilidad debido que los potreros se encuentran inundados, lo que ocasiona estrés para el animal por la falta de áreas secas (De Dios 2003), y exceso de lodo.

En el trópico, predomina una gran variedad de razas cebuinas como son; Brahmán, Indobrasil, Gyr, Guzerat, Nelore, Zardo negro (Calderón y González, 2006), y sus cruzas con razas europeas (Lastra *et al*, 1998). Se caracterizan por la explotación del ganado en sistemas extensivos y por la ganadería de doble propósito (carne y leche) basada en pastos, con limitado uso de suplementos alimenticios (De Dios 2003).

El uso de pastos está basado principalmente en pastos nativos e introducidos. Según Enríquez *et al*, (1999), los pastos nativos principalmente son de los géneros *Axonopus* spp. y *Paspalum* spp., los cuales tienen bajo potencial de producción. También se explotan gramíneas introducidas de los géneros *Panicum*, *Cynodon*, *Digitaria*, *Pennisetum*, *Hyparrhenia* y *Cenchrus*, en años recientes, especies de *Brachiaria* y *Andropogon*., algunos productores utilizan leguminosas, las más comunes son la *Pueraria phaseoloides*, *Clitoria ternatea*, *Arachis pintoii*, *Centrosema pubescens*, *Gliricidia sepium* y *Leucaena leucocephala*, las cuales se explotan en asociación con gramíneas o en monocultivo como bancos de proteína.

3.2 Los forrajes en la producción animal.

En las zonas tropicales, la principal fuente de alimentación de los bovinos son los pastos. La importancia de los pastos en la producción de bovinos está relacionada con su bajo costo de producción (Santos *et al*, 2009). Según Ramírez *et al*, (2009), la producción animal en praderas es el resultado del proceso fotosintético que las plantas realizan para el crecimiento, desarrollo y

acumulación de biomasa, que deberá ser consumida por los animales, para ser convertida en producto animal.

Debido a las características de crecimiento y maduración rápida de los pastos tropicales, su calidad nutricional cambia rápidamente, al ocasionar la reducción en su contenido de nitrógeno soluble (proteína), y el aumento en pared celular lignificada a medida que el pasto madura (Juárez *et al*, 2011). La velocidad de crecimiento de los pastos está influenciada por diversos factores ambientales, tales como; temperatura, luz solar, disponibilidad de nitrógeno, humedad del suelo y precipitación (Ishizaky *et al*, 2003).

La calidad y periodicidad de la luz influyen en el desarrollo de las plantas, ya que estimulan o reprimen la germinación, la floración y otros fenómenos de la planta (Lemaire *et al*, 2000). La mayoría de las especies forrajeras tropicales se caracterizan por poseer cadenas de carbono C4, por lo tanto no se saturan con la máxima radiación solar. Esto indica que, a elevadas intensidades de radiación y por razones bioquímicas y anatómicas, fotosintetizan más por unidad de radiación absorbida, que las plantas de cadena de carbono C3, siendo superiores fotosintéticamente a altas temperaturas (Sage y Kubein, 2007). Estudios realizados por Wang *et al*. (2004) en *Agrostis estolonifera*, obtuvieron como resultado, que con un foto periodo de 8 a 16 h al día, se incrementa la densidad de los tallos, así como efectos sobre la tasa de elongación foliar, la velocidad de emisión de hojas, aparición de nuevos tallos y

producción de MS. Por otro lado, la reducción de horas luz que recibe una planta en días cortos, genera un menor espesor en sus hojas (Wu *et al*, 2004).

El rango de temperatura de los pastos tropicales es de 15 a 45°C donde se presentan mejor eficiencia fotosintética. Si la temperatura es mayor a los 45°C se reduce el crecimiento, debido a una disminución en la actividad fotosintética por inactivación enzimática y a un incremento en la demanda respiratoria, creando un balance hídrico negativo, que reduce la expansión celular y el crecimiento de la planta (Sage y Kbein 2007).

Los cambios provocados por los factores ambientales en los pastos tropicales, ocasiona excedentes de producción en épocas lluviosas y deficiencias durante las de norte y secas que afectan la producción animal (Cano *et al*, 2003) disminuyendo la producción bovina de leche y carne, al no satisfacer los requerimientos nutricionales (Ibáñez *et al*, 2006).

La suplementación estratégica en estas regiones, permite corregir las dietas desbalanceadas, aumentar la capacidad de carga e incrementar la eficiencia de utilización de los pastos en su máxima producción, así como mejorar la ganancia de peso por animal y por unidad de superficie y acortar los ciclos de crecimientos y engorda (Peruchena 2004).

3.3 Pollinaza.

En las granjas de pollos de engorda se define la pollinaza como “el material compuesto de heces, cama, orina, restos de alimento, mucosa intestinal descamada, secreciones glandulares, microorganismos de la biota intestinal, sales minerales, plumas, insectos, pigmentos, trazas de medicamentos, etc”. (UNA, 2011).

Este coproducto de la industria avícola es utilizado como insumo para la alimentación de rumiantes, además de ser posible su uso alternativo como fertilizante en cultivos vegetales. Representa una fuente reconocida de proteínas y minerales (Castellanos y Murguía, 2002), formada principalmente por nitrógeno amoniacal y ácido úrico como nitrógeno no proteínico (NNP), así como aminoácidos indispensables (arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y valina) o esenciales como la lisina y treonina; puesto que estos no pueden ser sintetizados por el animal, ni su población microbiana, por lo tanto debe ser suministrado en la dieta (Zinn *et al*, 1996).

El contenido de nutrientes de la pollinaza, está influenciado principalmente por el tipo de material utilizado como cama (Jacob *et al*, 1997). El efecto de disgregación que ejerce el material utilizado como cama. La contaminación con tierra al momento de retirarla, puede fluctuar el contenido de proteína cruda, cenizas y fibra. Valores de ceniza mayores al 28% pueden indicar

contaminación con tierra, lo que no se recomienda para alimentación animal, ya que altos contenidos deprimen el consumo, afectando la producción de los animales (Ríos *et al*, 2005). Entre los principales materiales que son utilizados como cama, son; la cascarilla de arroz, viruta o aserrín, paja molida de trigo, avena o sorgo, cascarilla de grano de café, papel en tiras o pliegos, etc., o bien casetas sin cama (UNA, 2011).

Otros factores que interviene en el contenido de nutrientes, son el tipo de piso de la galera, la densidad de ave/m², la temperatura y humedad de las granjas de producción del sistema de agua, los métodos de limpieza utilizados (Jacob *et al.*, 1997), el grosor de la cama, el intervalo de colección de la cama y edad de las aves (Ríos *et al*, 2005). De manera general el contenido de nutrientes de la pollinaza es variable en una misma granja, así como en las diferentes granjas de producción de aves en el país.

Morales *et al*, (2002), analizaron 19 muestras de cama de pollo obteniendo el siguiente resultado expresado en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Análisis proximal de 19 muestras de cama de pollo.

Parámetro	Media	Mínimo	Máximo
Materia seca	85.7	72.4	91.4
Ceniza	18.6	14.5	24.1
Materia orgánica	81.4	76.0	85.5
Proteína cruda	31.6	25.8	34.9
FDN ¹	28.9	19.6	34.2
Hemicelulosa	15.2	11.4	22.9
FDA ²	14.8	8.2	20.3

¹Fibra Detergente Neutro

²Fibra Detergente Acido

3.3.1 Producción e importancia de la pollinaza en la alimentación animal.

En el ámbito mundial la avicultura es una de las ramas de la producción animal de mayor importancia, contribuye a la satisfacción de las necesidades proteicas de la población, a través de dos vertientes básicas: la producción de carne y huevo (Piad, 2001). El incremento en la producción de aves, para satisfacer estas demandas, a su vez incrementa la producción de excretas.

Respecto a la producción de pollinaza, se estiman volúmenes 200 a 300 g de materia seca por Kg de alimento, o 700 a 800 g de materia seca por pollo producido, o bien, 550 g de materia seca por Kg de pollo y finalmente 9.6 ton de materia seca por cada 1000 Kg de carne (García, 2008), este último dato representaría un estimado de 1.2 millones de toneladas producidas anualmente por 1,461 millones de pollos. En México en el 2010 se produjeron 2.822 millones de toneladas de carne de pollo, el 90% de la producción se concentro en los siguientes estados y regiones de la República Mexicana: La Laguna, Veracruz, Querétaro, Jalisco, Aguascalientes, Nuevo León, Veracruz, Puebla, Chiapas y San Luis Potosí (UNA, 2008).

La pollinaza se considera una fuente de proteína de bajo costo, especialmente durante el invierno y los periodos de sequia, se estima que al utilizar la pollinaza como suplemento alimenticio se produce un ahorro de US \$ 0,04 por vaca por día en comparación con un regimiento de alimentación que incluye un suplemento de soja. Su costo por tonelada es menos de una décima parte del

rango para suplementos proteicos (Jordon *et al*, 2002), por ello algunos productores encuentran en la pollinaza un alimento alternativo para ganado, para tratar de compensar los incrementos de costos de grano. Por su parte, los productores avícolas encuentran que la pollinaza para usos como alimentación puede ser económicamente más ventajosa, los precios de venta pueden producir de un 30% a 300% más alta cuando se vende como fertilizante. No es de extrañar que los incentivos económicos impulsan el uso de pollinaza como alimento para el ganado (Roach *et al*, 2009).

Por otra parte, durante el proceso de síntesis de la proteína microbiana en el rumen, es necesario una relación propicia entre la cantidad de N-amoniaco (N-NH_3) y los compuestos energéticos que se encuentran en la dieta (cereales, melaza, almidón), como fuente energética para los microorganismos del rumen y así poder utilizar eficientemente el amoniaco en la síntesis de aminoácidos (Elías 1971; Elías y Herrera 2008 y 2010). Además, deben estar presentes ciertos minerales como fósforo, azufre, y sodio para que complementen la fermentación ruminal (Elías 1971; Araque 2001). Puesto que la pollinaza es una fuente de nitrógeno no proteico (NNP) y minerales, pudiera ser una opción para crear dicha relación, así mismo, por su costo y disponibilidad, la pollinaza presenta ser en el trópico una opción en la utilización como insumo en la alimentación animal.

3.3.2 Problemática en el uso de la pollinaza

Desde los años 60 la comunidad científica reconoció en las excretas de aves la característica de transmitir organismos patogénicos. Alexander *et al*, (1968) identificaron numerosas bacterias potencialmente patogénicas en la camas de pollo usadas para la alimentación animal, como; *Clostridium* spp., *Salmonella enterica*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Mycobacterium* spp. Estudios posteriores demostraron la presencia de una compleja de bacterias con gran potencial patogénico añadidas a las encontradas por Alexander, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas hydrophilia*, *Escherichia coli*, *Facklamia* spp., *Bordetella* spp. y *Enterococcus* spp., así mismo, las excretas de aves podrían actuar como una fuente para la transferencia de virus y hongos patógenos (Roach *et al*, 2009).

Las enfermedades que afectan a las aves pueden también afectar al ganado vacuno, cerdos, ovejas e incluso al hombre. Es por esto que la transmisión de estos organismos patógenos a otros animales y posiblemente al hombre constituye un riesgo de salud pública (Ríos *et al*, 2005). Sin embargo Alexander *et al*, (1968), concluyó que es muy difícil que existan enfermedades que puedan ser transmitidas al bovino mediante el consumo de excretas de de aves.

Por su parte, la industria avícola hace uso extenso de productos veterinarios (coccidiostatos, antibióticos y otros aditivos) que podrían alcanzar niveles

peligrosos en la pollinaza, ya sea en su forma original o en forma de algún compuesto metabolizado (Ríos *et al*, 2005). Según Roach *et al*, (2009) los antibióticos de uso veterinario por su naturaleza soluble en agua son pobremente absorbidos de 30 a 90%, los cuales se excretan conjuntamente. Los metabolitos frecuentemente eliminados, a menudo son bioactivos y se pueden transformar en el compuesto original después de la excreción.

Independiente, si un medicamento es aprobado para su uso en el ganado, la presencia de antibióticos o residuos de antibióticos en la pollinaza utilizada como alimento supone un riesgo de salud para el ganado. Un estudio realizado por Fontenot y Webb (1975), demostró la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los tejidos de la carne de ganado alimentados con pollinaza, donde se encontraron cuatro de cinco antibióticos que se administraron a las aves. Sin embargo, el uso de antibióticos en aves de corral ha cambiado desde mediados de 1970, cuando este estudio se completó (Roach *et al*, 2009).

Por otra parte, en los sistemas de producción avícola y los sistemas de producción bovina, donde la pollinaza se usa como insumo en la alimentación animal, la emisión de olores es un problema no menos importante. Los olores en su mayoría proveniente del N-amoniaco, subproducto natural de la degradación microbiana del ácido úrico de las heces. La conversión del nitrógeno de las heces en amonio varía en función de la temperatura, humedad y pH de las excretas y tasa de ventilación (Ríos *et al*, 2005). Se ha demostrado

que los olores aumentan con el contenido de humedad, de este modo, a mayor humedad de las excretas se incrementa la liberación de amonio y de olores (Lacey *et al.*, 2004; citado por Ríos *et al.*, 2005).

La presencia de elementos extraños como clavos, alambres, piedras entre otros, es común en la pollinaza debido a la naturaleza de estos sistemas de producción. Generalmente los animales son criados sobre un material que se usa como cama, colocado en el piso normalmente de tierra, lo que hace que durante su recolección de la pollinaza se retire también parte de esta tierra que usualmente presenta estos elementos extraños (Ríos *et al.*, 2005).

3.3.3 Normas de uso de la pollinaza.

En la república de Cuba en el 2003, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) junto con el Ministerio de Salud (MS), decretaron que las excretas de aves de engorda (pollinaza) u otras aves en etapas de cría o desarrollo, solas o mezcladas con otros materiales fueran tratados con procesos físicos, químicos o biológicos o bien una combinación de ellos para que pueda ser utilizada como fuente de proteína, fertilizante, enmienda o mejorador de suelos, como sustrato de cultivos agrícolas o en dietas de rumiantes.

3.3.4 Métodos de Manejo de la pollinaza.

El incremento de la avicultura y sus coproductos en los últimos años, ha originado la búsqueda de alternativas que permitan reducir la contaminación ambiental que las excretas de aves producen. Por su parte, Fontenot *et al*, (1999) mencionó que; cuando las excretas de aves se usan en la alimentación animal, es necesario procesarlas para destruir los microorganismos patógenos, mejorar las características de manejo y almacenamiento, a demás de mantener y realzar su palatabilidad.

El tamizado es una práctica dirigida principalmente para eliminar los cuerpos extraños (clavos, alambres, piedras, etc.), que perjudican no solo al animal, sino también a los equipos que utilicen para mezclar estas materias primas. Es recomendable acompañar esta práctica con el uso de un imán para realizar más eficientemente la extracción de los cuerpos extraños, sobre todo de menor tamaño que no son retenidos en el tamiz (Ríos *et al*, 2005).

El secado es un proceso dirigido principalmente a reducir la humedad, favorece su conservación, su manejo y reduce la posibilidad de diseminar enfermedades, así como dar valor agregado. Es posible eliminar totalmente la humedad de la pollinaza y esterilizarla aplicándole una temperatura de 150 °C durante tres horas. Sin embargó, diversos estudios han demostrado que el deshidratado de la pollinaza en estufa de aire forzado con temperaturas entre 60 y 120 °C disminuye su valor energético y proteínico (Castellanos *et al*, 2002). Esta pérdida puede ser evitada mediante la acidificación de la pollinaza, ya que el pH de la pollinaza es alrededor de 8, cuando esta se acidifica a un

valor igual o menor de 6, está pérdida por calor, se reduce (Surbrook *et al*, 1971).

El apilado es un proceso de fermentación anaerobia en el cual la pollinaza se apila y cubre para generar calor espontaneo mortal para los patógenos. Las recomendaciones de altura y el material de cubierta son muy variables (Roach *et al*, 2009). Algunos autores sugieren apilar a una altura de 1.5 metros, cuando se realiza de forma adecuada, la temperatura interna pueden superar los 55°C suficiente para inhibir el crecimiento de salmonella, este proceso es muy común debido a su simplicidad y factibilidad económica (Ríos *et al*, 2005).

El ensilado es un proceso de fermentación con múltiples etapas (aeróbicas y anaeróbicas) donde la pollinaza en ocasiones es combinada con material vegetativo, humedad, y algunas ocasiones con fuentes de carbohidratos para inducir la eliminación de patógenos vía acidificación. Las bacterias anaeróbicas, en la usencia de oxigeno y la presencia de carbohidratos (melaza) se multiplican muy rápido en toda la masa del silo (Roach *et al*, 2009). Dicho proceso ocasiona la producción de derivados de la fermentación donde se encuentran altas concentraciones de acido láctico y otros ácidos orgánicos, que son producto final del proceso catabólico desarrollado por los Lactobacilos (van Winsen *et al*, 2001), así como la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas que pueden tener efecto sobre baterías patógenas (Hazan *et al*, 2004).

3.4 Mecanismos de los ácidos orgánicos en microorganismos patógenos.

Los mecanismo antibacterial de los ácidos orgánicos no son completamente entendidos, su actividad puede en ocasiones depender del estatus fisiológico del organismo y las características fisicoquímicas del medio externo (Davisón, 2001, citado por Ricke 2003). La utilización de los carbohidratos disponibles y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas.

La actividad de los ácidos orgánicos en su fracción no disociada posee mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica, pudiendo atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Dichas moléculas pueden interferir en las funciones celulares, como puede ser la tras locación del sustrato y la fosforilación oxidativa. La disociación de los ácidos orgánicos provoca incremento de protones en el interior celular, cuando la concentración de estos protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante la bomba de protones, que reduce las reservas de energía de la célula y cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene lo que provoca el descenso del pH interno, que ocasiona la desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, lo que interfiere a la viabilidad (Requena *et al* 1995, citado por Vásquez *et al* 2009). Otros autores mencionan (Ricke 2003), que el expulsado del exceso de protones requiere de ATP celular, lo que puede colapsar la energía celular y con ello la muerte celular. Así

mismo otras actividades antimicrobianas de los ácidos orgánicos, incluyen la interferencia con el transporte de nutrientes, pérdidas por daño de la membrana citoplasmática, disrupción de la permeabilidad de la membrana al exterior, y su influencia en la síntesis macromolecular.

3.5 Concepto de fermentación y respiración

La fermentación es una de las biotecnologías aplicadas, más antiguas, de conservación de la energía. Las civilizaciones Sumeria y Babilónica (6000 años A.C.) ya conocían, de modo empírico, cómo elaborar cerveza y hacia el 4000 A.C. los egipcios sabían fabricar pan a partir del trigo (FAO 1998). La fermentación es la transformación de una sustancia orgánica (generalmente un carbohidrato) en otra utilizable mediante un proceso metabólico por la acción de enzimas. Estas enzimas pueden ser producidas por hongos, bacterias y levaduras, y provocar reacciones de oxidación-reducción, de las cuales el organismo productor deriva energía suficiente para su metabolismo. Las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se producen fuera del contacto con el aire, o aeróbica, que solo tiene lugar en presencia de oxígeno (Encarta 2000).

Los organismos anaeróbicos obtienen la mayor parte de la energía de las reacciones de oxidación-reducción en ausencia del oxígeno molecular; los electrones pasan desde un intermediario orgánico producido en la degradación del azúcar, el suministrador electrónico, hasta otro intermediario orgánico, que

actúa como aceptor electrónico. En estos procesos de fermentación anaeróbica, no se produce la oxidación neta del combustible. Los productos finales son los que caracterizan los tipos de fermentaciones y pueden ser alcohólica, láctica, butírica o acética (Jay 1994). Los organismos que emplean la fermentación como fuente de energía, se pueden dividir en dos clases: los anaeróbicos estrictos u obligados, que no emplean el oxígeno libre en absoluto y los anaeróbicos facultativos, que pueden vivir en ausencia o en presencia de oxígeno. Estos últimos, cuando viven anaeróbicamente, obtiene la energía de un proceso de fermentación y cuando viven aeróbicamente, continúan degradando su combustible mediante la ruta anaeróbica, pero después oxidan los productos de aquella a expensa del oxígeno molecular (Lehninger 1991).

Desde el punto de vista energético, las fermentaciones son muy poco rentables, ya que, a partir de una molécula de glucosa, sólo se obtienen 2 moléculas de ATP. Sin embargo, en la respiración se obtienen de 36 a 38 moléculas de ATP. La respiración se define como la oxidación de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular y el oxígeno actúa como el aceptor electrónico final (Lehninger, 1991).

La fermentación puede incrementar los niveles proteicos, mejorar el balance de aminoácidos y la digestibilidad de las materias primas empleadas (Pedraza *et al*, 1995; FAO, 1998). Los procesos fermentativos se pueden dividir en fermentación líquida o sumergida (FLS) y fermentación en estado sólido (FES).

La mayor diferencia entre estos dos procesos es la cantidad del sustrato. En la fermentación en estado líquido la cantidad de sustancia sólida, pocas veces llega a ser mayor de 50 g/L y en la FES el contenido de sólido varía entre 20 y 70% del peso total (Mitchell *et al*, 2002).

3.6 Fermentación en estado sólido.

La Fermentación en Estado Sólido ha sido definida como los procesos que ocurren en la ausencia o nula ausencia de agua libre. Estos procesos generalmente emplean material natural como fuente de carbón o energía. La FES solo emplea materiales inertes como matriz sólida, la cual requiere de la suplementación de una solución nutritiva que contenga nutrientes como fuente de carbón (Pandey & Sumitra 2006). Por su parte, Julián y Ramos (2007), definen la FES como el proceso en el cual se desarrollan microorganismos en materiales sólidos húmedos, con la inclusión de materiales naturales o sintéticos que actúan como soporte, y que están impregnados en una solución que contiene las sustancias nutritivas.

Recientemente, los procesos de FES han sido explorados para la producción de alimentos fermentados, alimentación animal (Elías y Herrera 2008 y 2010), producción de etanol como combustible, producción de enzimas incluyendo celulolíticas y ligninolíticas, se han aplicado para la bioremedación de efluentes textiles y degradación de tintes. Así mismo se han llevado a cabo en una

variedad de residuos agrícolas como paja de trigo, cáscaras de arroz, y mazorcas de maíz, donde ha recibido gran interés (Nigan & Robinson 2004).

3.6.1 Ventajas y Desventajas de los procesos de FES.

Los procesos de FES presentan ciertas ventajas, de los cuales, Pérez et al, (2003) destaca;

1. Simplicidad de los medios de cultivo, ya que generalmente un único sustrato proporciona casi todos los nutrientes necesarios.
2. Mayor simplicidad en los fermentadores.
3. Mayores facilidades para la aplicación y obtención del inóculo, pudiendo usar esporas directamente en algunos procesos.
4. Facilidad y factibilidad de escalado de los procesos.
5. Reducido o nulo uso de disolventes para la extracción de productos.
6. Reducido riesgo de contaminaciones bacterianas, menos aptas para soportar la baja actividad de agua que caracteriza a estos sistemas.
7. Posibilidad de trabajo en condiciones no asépticas.
8. Bajos requerimientos energéticos, en ocasiones no es preciso esterilizar, airear ni agitar.
9. Ambientes similar al de los hábitats naturales de los microorganismos.
10. Elevada aeración del sistema, lo que hace a esta modalidad de cultivo, adecuada a aquellos procesos que impliquen un metabolismo oxidativo intenso.
11. Reducido volumen de efluentes.

12. Los productos obtenidos por FES tienen ligeras propiedades (por ejemplo; termo tolerancia) que los productos producidos por FLS (Pastrana 1996).

3.6.2 Desventajas de la FES.

Pérez *et al* (2003), menciona como desventajas;

1. Frecuente necesidad de pre tratamiento de los sustratos (molienda, pre hidrolisis parcial).
2. Dificultad para mantener los niveles óptimos de humedad durante la fermentación.
3. Ausencia de métodos analíticos simples para determinar el crecimiento microbiano.
4. Dificultad para la agitación en procesos que así lo requieran.
5. Frecuente necesidad de inoculó voluminoso.
6. Escasez de diseños y desarrollos de ingeniería para la construcción de fermentadores.

Así mismo Pastrana (1996) menciona como desventajas;

7. La selección de microorganismos, solo algunos microorganismos pueden crecer a bajos niveles de humedad.
8. La naturaleza del sustrato sólido, ocasiona problemas en los procesos de monitoreo de parámetros (pH, humedad, etc.).
9. Dificultad para remover el calor metabólico generado durante el crecimiento de los microorganismos.
10. Dificultad de aeración, por la concentración de sólidos.

11. El tiempo de cultivo es más largo que los procesos de FLS.

3.7 Factores que influyen en la fermentación en estado sólido.

En los diferentes cultivos, existen variables que influyen en el proceso, condicionan el éxito de la fermentación:

3.7.1 Fuente de carbono y la relación carbono/nitrógeno

El tipo, carbono natural y nitrógeno, son los factores de mayor importancia. La fuente de carbono representa la fuente de energía que puede estar disponible para el crecimiento de los microorganismos y puede ser un monosacárido simple o un polisacárido complejo. La selección de la fuente de carbono está en función de los microorganismos a emplear y el producto a obtener. El nitrógeno es un factor importante que determina el crecimiento de los microorganismos y desempeña un importante papel en el cambio de pH en el sustrato durante la fermentación (Pastrana 1996, Elías y Herrera 2008 y 2010).

3.7.2 Contenido de Humedad del sustrato y actividad de agua (a_w).

Los requerimientos de agua de los microorganismos se definen en términos de actividad de agua (a_w), en lugar de contenido de agua del sustrato sólido. La a_w es la relación entre la presión de vapor de agua en un sistema y la presión de vapor de agua pura. Desde un punto de vista microbiológico la a_w es la habilidad o acceso al agua para el crecimiento de los microorganismos (Pérez *et al*, 2003).

El contenido de humedad es un factor crítico en los procesos de SSF puesto que esta variable influye en el crecimiento, biosíntesis y secreción de diferentes metabolitos. Generalmente, el contenido de humedad del sustrato oscila entre 30 y 75% (Pérez *et al*, 2003). Ningam & Robinson (2004) mencionan que típicamente es de entre 40 y 90%. Bajos contenidos de humedad ocasionan reducción en la solubilidad de nutrientes del sustrato, bajo nivel de inflamación, alta tensión de agua (Pérez *et al*, 2003), así como la esporulación de microorganismos (Pastrana, 1996). Por otro lado, los mayores niveles de humedad pueden provocar una reducción en el rendimiento enzimático, debido al impedimento estérico del crecimiento de la cepa productora por reducción de la porosidad (espacios entre partículas) de la matriz sólida, lo que interfiere en la transferencia de oxígeno (Pérez *et al*, 2003), así como el incremento en la formación de micelio aéreo (Pastrana 1996).

La producción de metabolitos son consecuencia en mayor o menor medida, de la acción que ejercen las enzimas sobre la estabilidad, actividad y especificidad, tanto intra como extracelulares. Así, mientras que la estabilidad frente a la desnaturalización térmica se ve incrementada a bajos niveles a_w , la especificidad y actividad enzimática pueden verse deterioradas al dificultarse el contacto de la enzima con el sustrato (Rao *et al*, 1993; Pastrana 1996).

3.7.3 Tamaño de partículas

Los sustratos sólidos que permite el crecimiento en la interface sólido-gas. Las partículas más pequeñas de sustrato proporcionan superficie más grande para

el ataque microbiano, lo que pudiera producir dificultades en la aireación y la respiración al limitar la disponibilidad de espacio entre partículas. Las partículas más grandes proporcionan una mejor aireación y oportunidades de respiración, pero proporcionan menos área de superficie. En bioprocesos de optimización, en ocasiones puede ser necesario usar un tamaño de partículas promedio (mezcla de rango) para maximizar la rentabilidad (Pandey & Sumitra, 2006). Por su parte Pastrana., 1996, menciona que la proporción de espacio hueco es, a su vez, función de geometría de las partículas del sustrato, debe representar al menos un 30% del volumen total de la masa de fermentación.

3.7.4 Transferencia de masa y aeración

En la FES, los procesos de transferencia de masa relacionados con gases y nutrientes de difusión son fuertemente influenciados por la estructura física de la matriz y la fase líquida del sistema (Pérez *et al*, 2003).

Raghavarao *et al*, (2003) describen dos tipos de fenómenos de transferencia de masa; la escala micro trata la transferencia de masa dentro y fuera del microorganismo y la macro escala incluye más factores: el flujo de aire a granel dentro y fuera del biorreactor, convección natural, la difusión y conducción a través del sustrato, los materiales del biorreactor, el molido, daño del microorganismo y la integridad de las partículas de sustrato. La aeración es esencial para dos funciones: suministrar oxígeno a los microorganismos aeróbicos y remover el CO₂, el calor de vapor de agua y componentes volátiles, producto del metabolismo (Pérez *et al*, 2003).

3.7.5 Temperatura

El incremento de la temperatura en FES es consecuencia de la de la actividad metabólica y su insuficiente remoción. Afecta directamente la germinación de esporas, crecimiento y formación de productos. Esta se encuentra en relación con el tipo de microorganismo, la porosidad, diámetro de las partículas, y la profundidad del sustrato (Pérez *et al*, 2003). Muchos de los microorganismos usados en la FES son mesófilos y su temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 40 °C y un máximo inferior a 50 °C (Mitchell *et al*, 2002).

3.7.6 Potencial de hidrogeno (pH)

Cada microorganismo posee un rango de pH óptimo para crecer. El crecimiento microbiano puede causar marcado cambio en el pH del sustrato, debido a la producción de ácido por la oxidación incompleta del sustrato o cuando el ión amonio es atrapado como amoníaco, por lo cual libera un protón al medio, causando una rápida disminución del pH. Por otro lado, la liberación de amonio por la desaminación de la urea u otras aminas puede incrementar el pH. La magnitud del cambio de pH, dependerá de la actividad metabólica de los microorganismos y de la capacidad amortiguadora del sustrato (Mitchell *et al*, 2002).

El pH es uno de los problemas no resueltos en los procesos de FES, debido a la heterogeneidad característica del proceso. Un intento para superar la variación de pH durante los procesos de FES es el de formular sustratos en que se considere la capacidad amortiguadora de los diferentes componentes

empleados, o por el uso de tampón formulados con componentes que no tengan influencia letal en la actividad biológica (Elías y Herrera 2008 y 2010). En general, se ha observado que el crecimiento de los hongos tiene un rango de pH entre 3.5 y 6, el de las levaduras entre 4.5 y 7, y el de las bacterias ligeramente mayor que los hongos (Elías y Herrera 2008 y 2010). Sin embargo, esto no es una regla, ya que algunos Lactobacilos y otras bacterias, pueden crecer a pH 2 (Pandey *et al*, 2001).

3.8 Vitafert.

El Vitafert, es un producto biológico de color oscuro, olor agradable, obtenido como resultado de la fermentación en estado líquido, compuesto de bacterias lácticas y levaduras capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta como láctico, acético, propionico, succínico y piruvico, vitaminas y enzimas. El Vitafert es un activador de la fermentación que estimula la producción de ácidos orgánicos, disminuye el pH, incrementa y estabiliza la proteína, aumenta la digestibilidad de la materia seca y disminuye las fracciones de la pared celular de las materias alimentarias que se someten a su acción (Elías y Herrera 2008).

Por su parte, Hernández Cadena (2010) al estudiar tiempo de fermentación y niveles melaza y Vitafert, encontró que el pH, se estabilizó al tercer día de fermentación y los mayores niveles de lactobacilos y levaduras, lo encontró al adicionar 15% de melaza (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Valor de pH y crecimiento de lactobacilos y levaduras (Log ufc/ml) en el Vitafert.

Días de fermentación	Variables		
	pH	Lactobacilos (Log ufc/ml)	Levaduras (ufc/ml)
0	5.35	4.74 x 10 ⁴	5.92 x 10 ⁴
1	5.46	5.28 x 10 ⁵	4.43 x 10 ⁵
2	4.34	5.76 x 10 ⁵	3.65 x 10 ⁶
3	4.10	9.29 x 10 ⁹	-
6	3.95	9.36 x 10 ⁹	-
9	3.87	9.15 x 10 ⁹	-
15	3.81	8.93 x 10 ⁹	-
30	3.86	8.75 x 10 ⁵	-

Log= logaritmo; *ufc= unidades formadoras de colonias.

IV.MATERIALES Y MÉTODOS

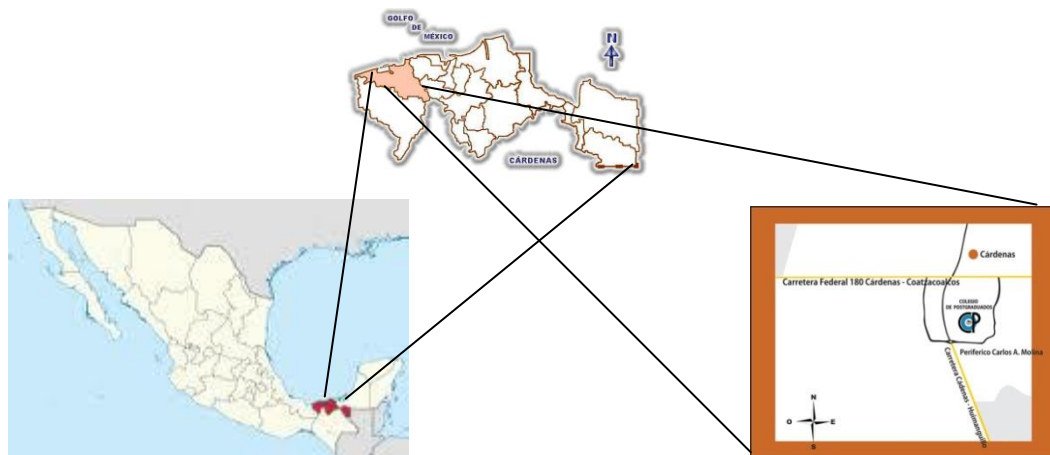
4.1 Localización

La elaboración del alimento se realizó en el rancho Don Walter propiedad del CP. Manuel Burelo Naranjo, ubicado en el Ejido once de febrero segunda sección, perteneciente al municipio de Cunduacán, Tabasco.

Los análisis bromatológicos, de fermentación y microbiológicos se realizaron en los laboratorios del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, ubicado en Km. 3.5 periférico Carlos A. Molina s/n, Carretera Cárdenas – Huimanguillo en el municipio de Cárdenas, Tabasco.

El Campus Tabasco está situado a 18°00´ latitud Norte y 93°30´ de longitud Oeste, con una altura de 9 msnm. El clima de esta región es de tipo Am (f) w (i) y de acuerdo a la clasificación de Koppen, modificado por (García, 1998). La precipitación promedio anual es de 2163 mm y la temperatura media anual es de 25.9°C, la humedad relativa promedio es de 80 % con una máxima de 90 % y una mínima de 65 % (Nájera, 1990)

Figura 1.- Ubicación geográfica del Colegio de Postgraduados campus Tabasco.



4.2 Tratamientos estudiados.

Los tratamientos estudiados (cuadro 3) fueron los tiempo de fermentación (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 días). Se utilizó un diseño completamente al azar, con 3 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 3.- Tratamientos estudiados.

Tratamiento	Días de Fermentación
T1	Día 0
T2	Día 5
T3	Día 10
T4	Día 15
T5	Día 20
T6	Día 25
T7	Día 30
T8	Día 40

Para el análisis estadístico de la media de los datos, se aplicó la prueba de Tukey (1980), los datos se analizaron mediante el software R 2.10.1 (2009), para lo cual se utilizó el siguiente modelo:

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

Donde:

Y_{ij} = variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento.

μ = Media general.

τ_i = El efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio.

4.3 Procedimiento experimental.

Para la elaboración del alimento, se mezcló pollinaza procedente de Mérida, Yucatán, melaza, Vitafert, minerales y sulfato de magnesio en una mezcladora estacionaria de cinta de acuerdo al cuadro 4. Se embolsó 30 kg en bolsas de nylon negra calibre 8, con la precaución de eliminar el aire, posteriormente, se introdujo en costales de rafia para su protección y se dejó fermentar anaeróbicamente, según el tratamiento (tiempo de fermentación). Cada costal representó una unidad experimental.

Para el tiempo de fermentación 0, la muestra se tomó inmediatamente, después del mezclado. Para los tiempos de fermentación restante (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 días), los costales se vaciaron en una plancha de concreto y se tomó 10 submuestras en zigzag formando una muestra compuesta de aproximadamente 1000 g por unidad experimental, las cuales se usaron para los análisis microbiológicos, fermentativos y bromatológicos.

Cuadro 4.- Componentes del alimento.

Ingrediente	% inclusión
Pollinaza	77.1
Melaza	10
Vitafert	12
Minerales	0.5
Sulfato de magnesio	0.4

4.5 Preparación del Vitafert.

El Vitafert (inoculó de levaduras y lactobacilos) se elaboro, según la metodología descrita por Elías y Herrera (2008) y se empleo la fórmula del cuadro 5. Al inicio, se preparó 20 litros en dos cubetas de plástico, se mezclaron los ingredientes sólidos (pasta de soya, pulido de arroz, sales minerales, sulfato de amonio y urea) después se le adicionó melaza y agua. A cada cubeta se les agregó medio litro de yogurt natural marca Yoplait como inóculo de lactobacilos, se agitó cada 2 horas durante 1 minuto y se dejó fermentar en estado liquido por 72 horas con agitación de la mezcla y solución liquida cada 2 horas. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento para la elaboración de 100 litros de Vitafert y se le adicionó los 20 litros de Vitafert de las cubetas como inoculó.

Cuadro 5.- Ingredientes usados para elaborar el Vitafert (%)

Ingredientes	% inclusión base húmedo
Pasta de soya	4
Pulido de arroz	4
Melaza	15
Sulfato de magnesio	0.3
Urea	0.4
Minerales	0.5
Agua	75.8

4.6 Determinación de parámetros fermentativos:

4.6.1 pH.

Se determinó según Conway, (1957).

4.6.2 Amoníaco.

Se utilizó la técnica descrita por Mc Culloough, (1967).

4.6.3 Acido láctico. Para su determinación se utilizó la técnica descrita por SIGMA, (1990).

4.7 Determinación de parámetros bromatológicos.

4.7.1 Materia seca (MS).

La determinación de MS, se realizó según (AOAC, 2000), se obtuvieron 1000 g de muestra se introdujeron en una estufa a una temperatura de 62°C hasta peso constante.

4.7.2 Proteína cruda (PC), materia seca (MS) y cenizas.

La PC, MS y cenizas, se determinaron según la AOAC (2000).

4.7.3 Nitrógeno no proteínico (NNP x 6.25) y proteína verdadera (PV)

El NNP se determinó mediante la técnica descrita por Bernstein (1983). La proteína verdadera se obtuvo por diferencia, al restar de la Proteína Cruda (PC) el valor del nitrógeno no proteínico (NNP).

4.7.4 Relación NNP-PV

Se obtuvo al dividir la PV/PB*100

4.7.5 Materia orgánica (MO).

Se obtuvo al restar al 100 % de muestra la MS el resultado del porcentaje de ceniza.

4.7.6 Fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA).

El fraccionamiento de FDN y FDA se determinaron según Van Soes *et al*, (1991).

4.7.7 Hemicelulosa

Se realizó por diferencia de FDN-FDA.

4.7.8 Contenido celular

Se realizó por diferencia de 100-FDN.

4.7.9 Degradación *in situ* de la materia seca (DIMS)

Para determinar la degradación *in situ* de la materia seca (DIMS), se pesaron 6 g de muestras molidas en malla de 1mm y se colocaron en bolsas de poliseda (10x20 cm), según tratamiento, de acuerdo a la metodología descrita por Ørskov *et al* (1980). Se incubaron en dos toros canulados en rumen, con un peso vivo promedio de 729 ±29 kg, en horario de 24 h, de cada toro se tomó una repetición. El lavado se efectuó de forma manual, al colocar las bolsas en cubetas de plástico (una por animal) y agregar agua hasta que el efluente de la bolsa se tornó claro. Posteriormente, fueron colocadas en una estufa de aire

forzado a 60°C, una vez secas, se pesaron y por diferencia de peso, se determinó la DIMS, mediante la siguiente fórmula:

$$(PI-PF/PI)*100$$

Donde:

PI: peso inicial de la muestra (g)

PF: peso fina de la muestra (g)

4.7.10 Degradación *in situ* de la materia orgánica (DIMO)

Para calcular la DIMO, a los residuales de las bolsas (24 h) utilizadas en la determinación de la DIMS, se le determinó el contenido de cenizas y de MO de acuerdo a la AOAC (2000). El peso inicial usado en la determinación de la DIMS se multiplicó por el porcentaje de MO inicial (muestras sin incubar) y se dividió entre 100 para obtener los gramos iniciales de MO. El peso residual obtenido de la DIMS se multiplicó por el porcentaje de MO residual y se dividió entre 100 para obtener los gramos residuales de MO. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{ DIMO} = \frac{\text{gMOI} - \text{gMOR}}{\text{gMOI}} \times 100$$

Donde:

gMOI= gramos de la MO inicial

gMOR= gramos de la MO residual

4.7.11 Cálculo del contenido de energía metabolizable (EM)

Para determinar EM se aplicó la fórmula propuesta por ARC (1980):

$$EM = (DMO \times 3.616) / 100$$

4.8 Determinación de parámetros microbiológicos.

El método de cuenta viable de dilución seriada (figura 7) consistió en realizar la siembra de las muestras, obtenidas en cajas petri esterilizadas y con el medio específico para el crecimiento de bacterias. Para la realización de la técnica, se suspendió 10 g de muestra, extraída de las bolsas previamente, de acuerdo al tiempo de fermentación, se colocó en 90 ml de agua destilada, se mezclaron con un agitador orbital marca VMR DS-500 E, durante 20 minutos, de esta dilución, se tomó 1 ml y se adicionó a un tubo de dilución que contenía 9 ml de agua destilada (10^{-1}), nuevamente se agitó por unos segundos y se repitió el proceso en diferentes diluciones, hasta llegar a la dilución objetivo para cada microorganismo. Se tomaron 3 diluciones para cada medio de cultivo, para las cuales se tomó 0.1 ml para sembrar en cajas petri con tres repeticiones de cada dilución. Los medios selectivos que se usaron fueron para *Lactobacilos* (agar Rogosa, 1951), en bacterias aeróbicas Agar cuenta estándar (Buchbinder *et al* 1953) agar McConkey (*Echerichia coli*), y hongos y levaduras (agar Dextrosa y Papa).

Las placas con agar MRS se incubaron a 28°C durante 48 h, para PDA y ACE se incubaron a 37°C durante 72 h. El recuento de organismos unicelulares, se realizó de manera manual y visual para cada caja petri; se observó, contra luz,

las células viables separadas espacialmente unas de otras por dispersión sobre un medio de agar, lo que origina en cada una el crecimiento de colonias independientes y macroscópicamente visibles.

Por lo tanto, si se preparan diluciones apropiadas de una población bacteriana y se siembra en un medio conveniente, puede calcularse el número de células viables al contar el número de colonias que se desarrollan después de la incubación de las placas y al multiplicar dicho valor por el factor de dilución (Madigan, 2000).

Fórmula para determinar el número de unidades formadoras de colonias

$$\text{Número de UFC/gr ml muestra} = \text{UFC}/(\text{placa}) * d * 1/V = \text{UFC}/\text{gr}$$

Ejemplo: $35 * 10^4 * 1 / 0.1 = 35 \text{ UFC}/\text{gr} * 10^4 * 10 = \underline{35 \times 10^5 \text{ UFC}/\text{gr}}$

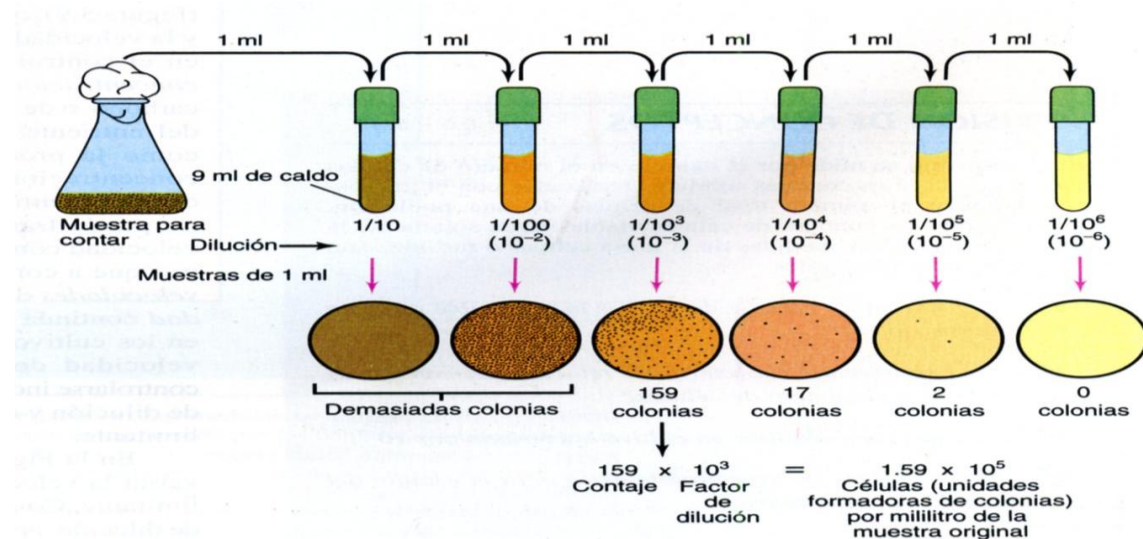


Figura 2.- Diluciones para realizar la siembra en cajas petrí y cuenta viable.

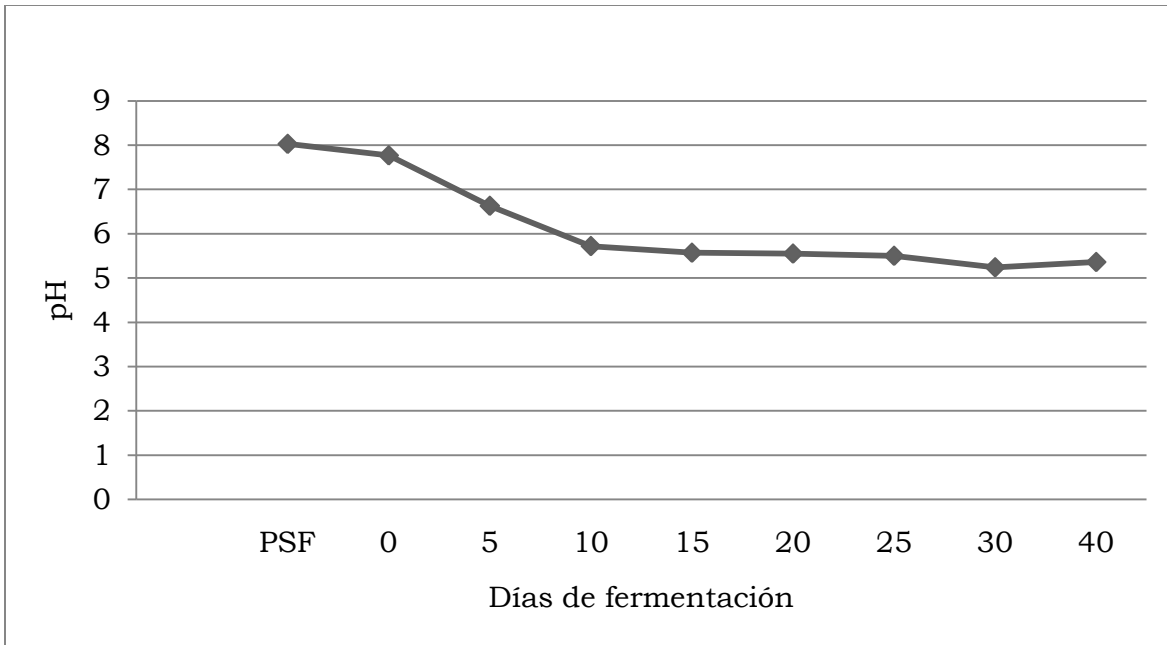
V. RESULTADOS

5.1 Parámetros fermentativos

El valor más alto de pH se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (8.03). Al momento de la mezcla de la pollinaza (día 0), el pH disminuyó significativamente a 7.77 y conforme transcurrieron los días de fermentación, el pH disminuyó linealmente hasta el día 15, se mantuvo en el día 20, posteriormente disminuyó linealmente hasta el día 30, donde se presentó el valor más bajo (5.24), en el día 40, se incrementó ligeramente (Figura 2, Anexo1).

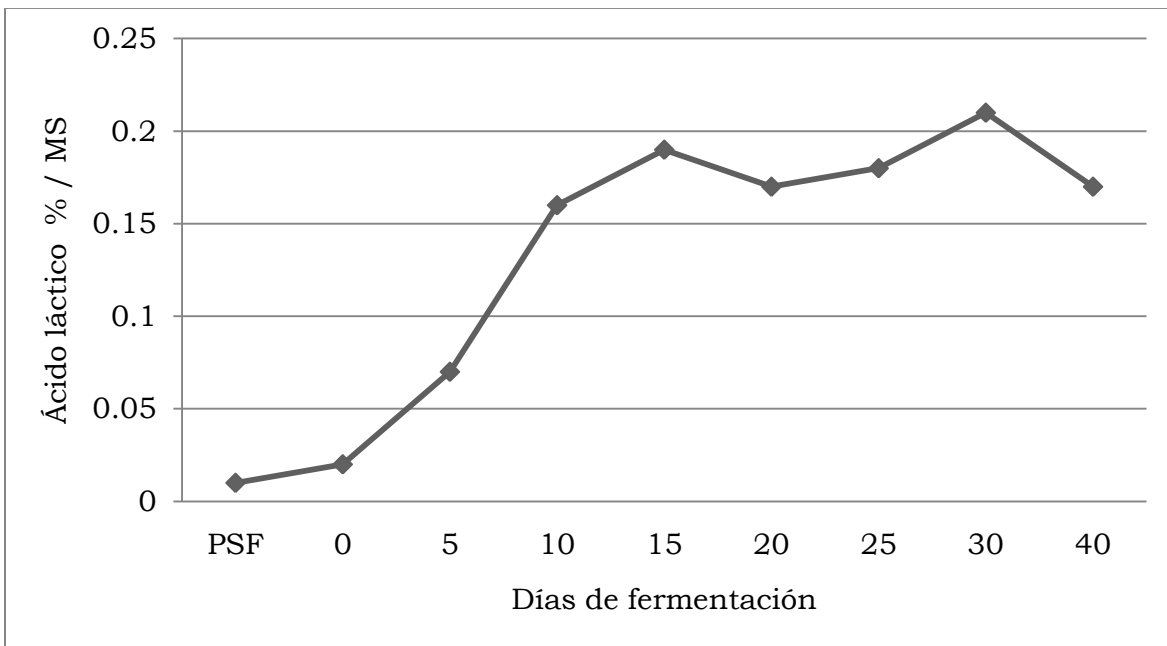
Con respecto, al contenido de ácido láctico, la menor concentración se presentó en la pollinaza sola sin fermentar (0.01), la concentración aumentó al momento de mezclar la pollinaza con los ingredientes para la fermentación (día 0). Al aumentar los días de fermentación, el contenido de ácido láctico incrementó linealmente hasta el día 15. Posterior en los días 20 y 25 disminuyó ligeramente. En el día 30 se observó el valor más alto de ácido láctico (Figura 3, Anexo 1).

Por otra parte, en cuanto al contenido de N- NH_3 , el valor más bajo se encontró en el día 0 de fermentación (0.44), conforme transcurrieron los días de fermentación (días 5, 10 y 15) se observó incremento lineal, posteriormente disminuyó en los días 20 y 25. En los días 30 y 40 de fermentación se encontraron las mayores concentraciones de amoníaco (0.69 y 0.72 %, respetivamente) sin diferencias estadísticas entre ellos (Figura 4, Anexo 1).



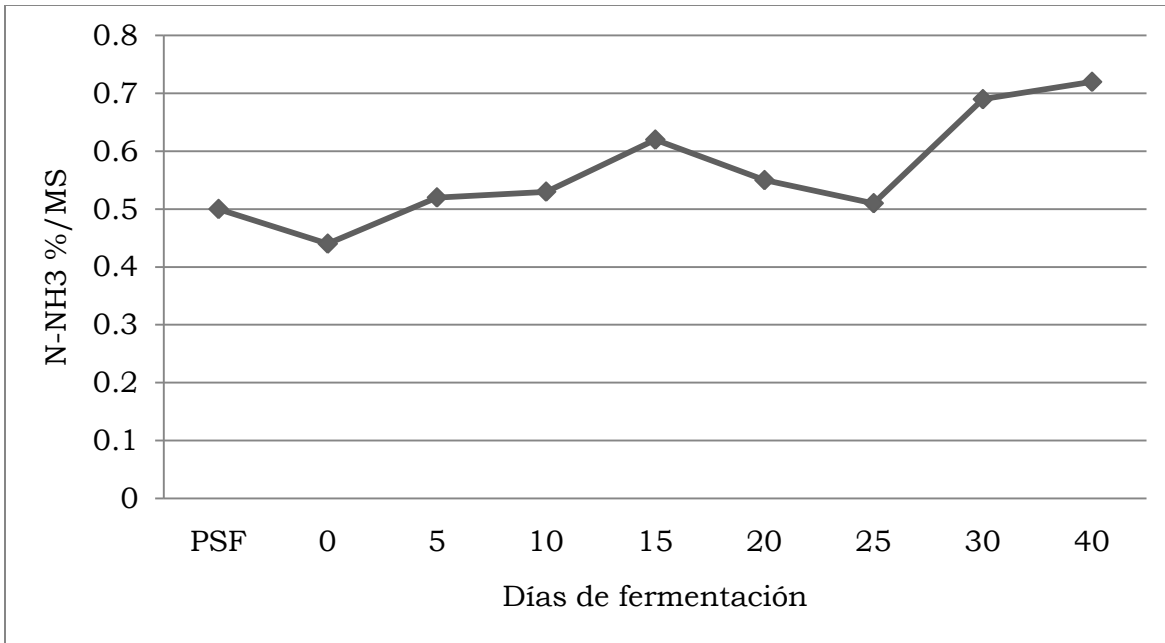
PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 3 Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el pH.



PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 4.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en la concentración de ácido láctico.



PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 5.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de NH_3 .

5.2 Parámetros químicos.

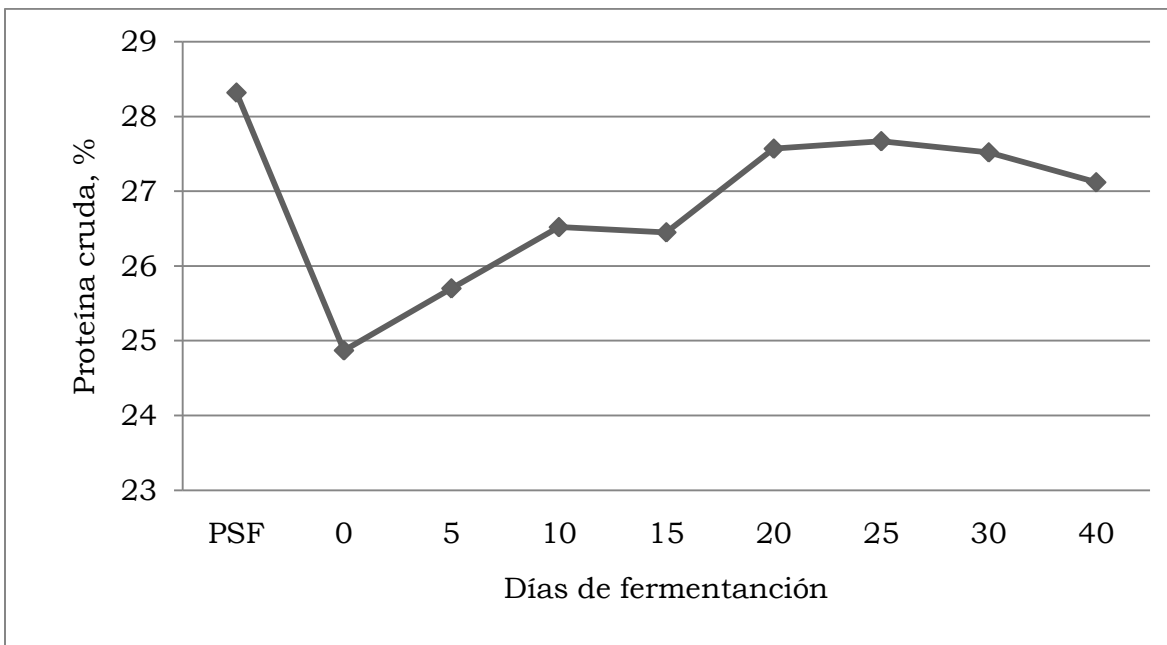
El valor más alto de MS se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (91.91 %). Al mezclar la pollinaza con los ingredientes indicados en el cuadro 4 para su fermentación, la MS disminuyó significativamente y se mantuvo entre 69.36 y 71.21% (Anexo 2)

El mayor valor de PC se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (28.32 %). Al momento de mezclar la pollinaza con los ingredientes usados para la fermentación, hubo una disgregación de la proteína y esta disminuyó significativamente, sin embargo, a partir del día 25 de fermentación el

contenido de PC se incrementó a valores similares a la pollinaza sola sin fermentar (Figura 5, Anexo 2).

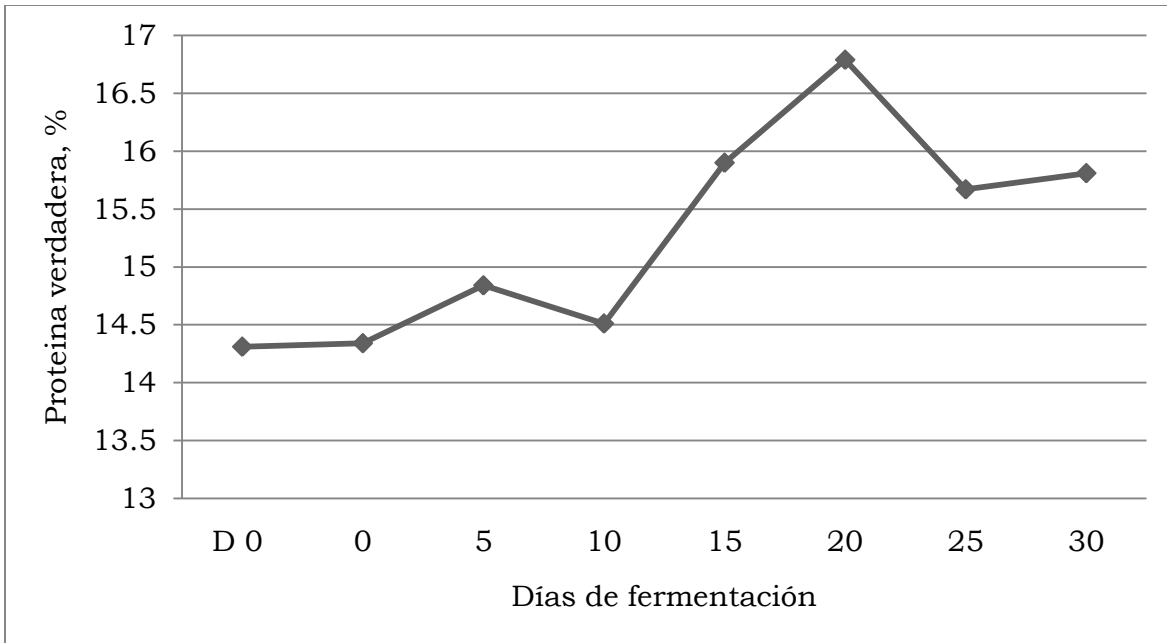
Con relación a la PV, los mayores valores se obtuvieron a partir del día 20 de fermentación (Figura 6, anexo 2).

Así mismo, para la razón de PV- PC, los mayores valores se obtuvieron a partir del día 20 de fermentación (Figura 7, Anexo 2).



PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 6.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de proteína cruda.



PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 7.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de proteína verdadera.

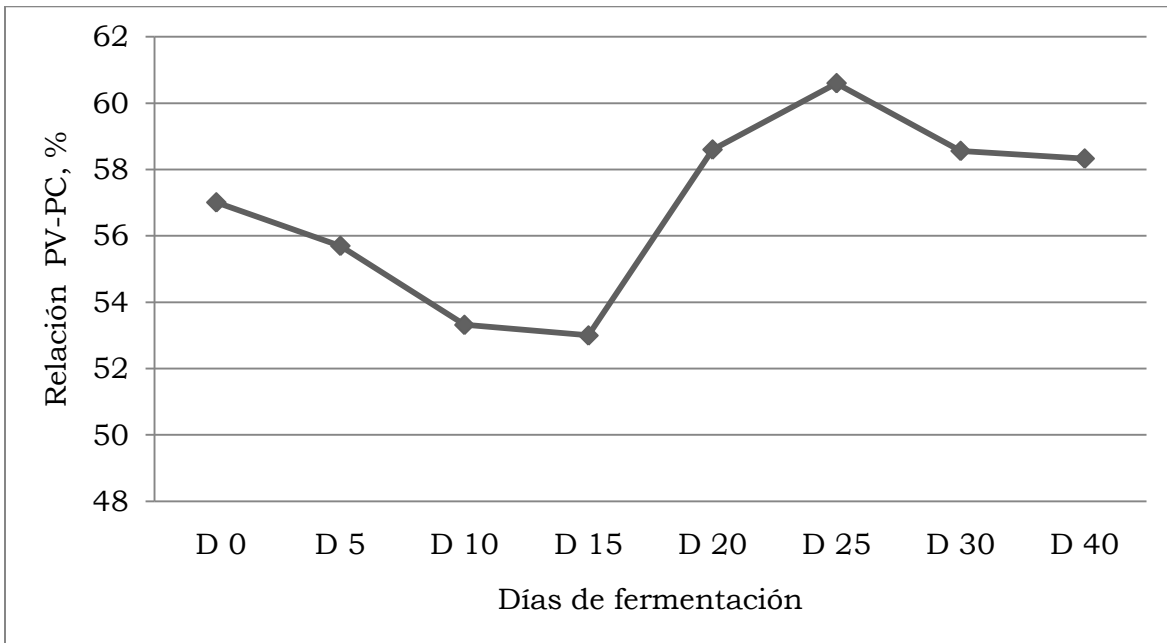


Figura 8.- Efecto de los días de fermentación en la relación PV-PC.

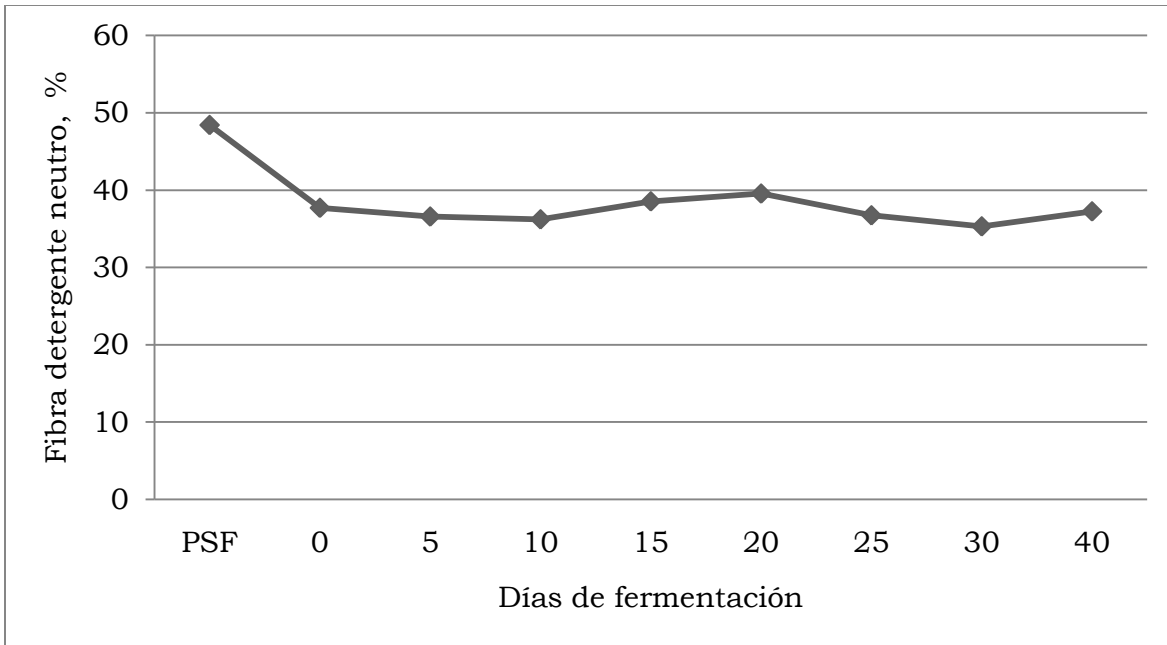
Referente al contenido de FDN, el valor más alto se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (48.44 %). Al momento de mezclar la pollinaza con los

ingredientes usados en la fermentación (día 0), el contenido de FDN disminuyó significativamente por un efecto de disgregación de la FDN, el menor valor se encontró en el día 30 de fermentación (Figura 8, Anexo 3).

Así mismo, el valor más alto de FDA se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (21.34). Esta también disminuyó significativamente al momento de mezclar los ingredientes para la fermentación por un efecto de disgregación de la FDA, su valor se mantuvo entre 17.08 y 19.68% (Figura 9, Anexo 3).

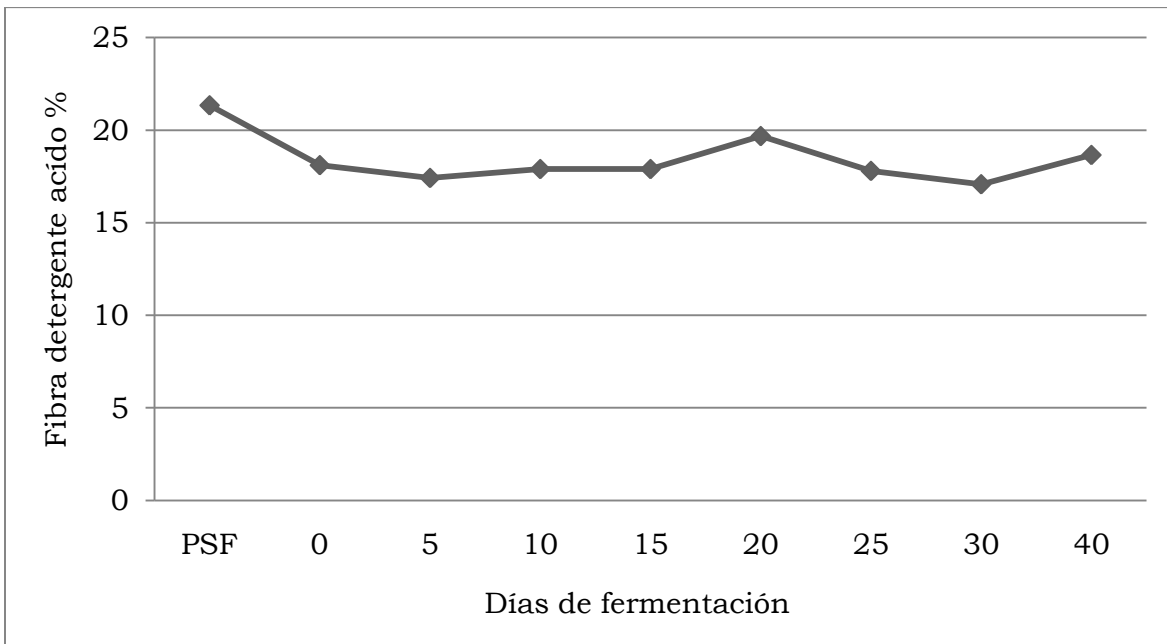
El contenido celular fue menor en la pollinaza sola sin fermentar (51.55). Al mezclar la pollinaza con los ingredientes para la fermentación, esta variable se incrementó significativamente, los mayores valores se encontró en los días 25 y 30 de fermentación (Figura 10, Anexo 3).

En relación al contenido de hemicelulosa, el valor más alto se encontró en la pollinaza sola sin fermentar (26.61 %), disminuyó significativamente al momento de mezclar la pollinaza con los ingredientes usados en la fermentación (día 0), los menores valores se encontraron en los días 5, 10, 25, 30 y 40 de fermentación (Figura 11, Anexo 3).



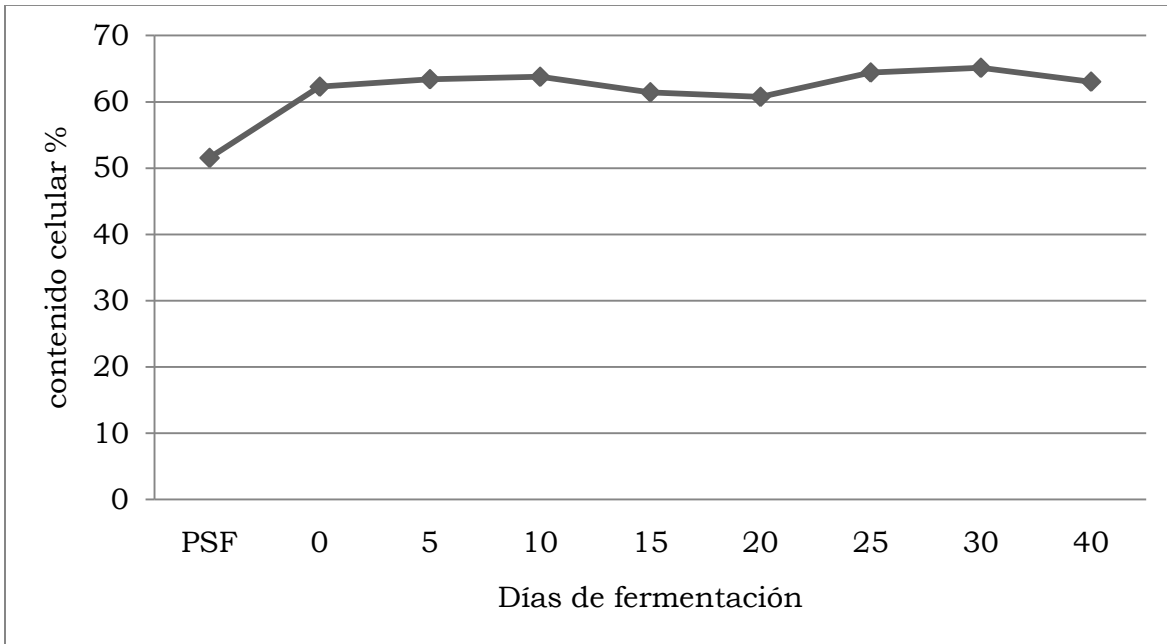
PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 9.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de FDN.



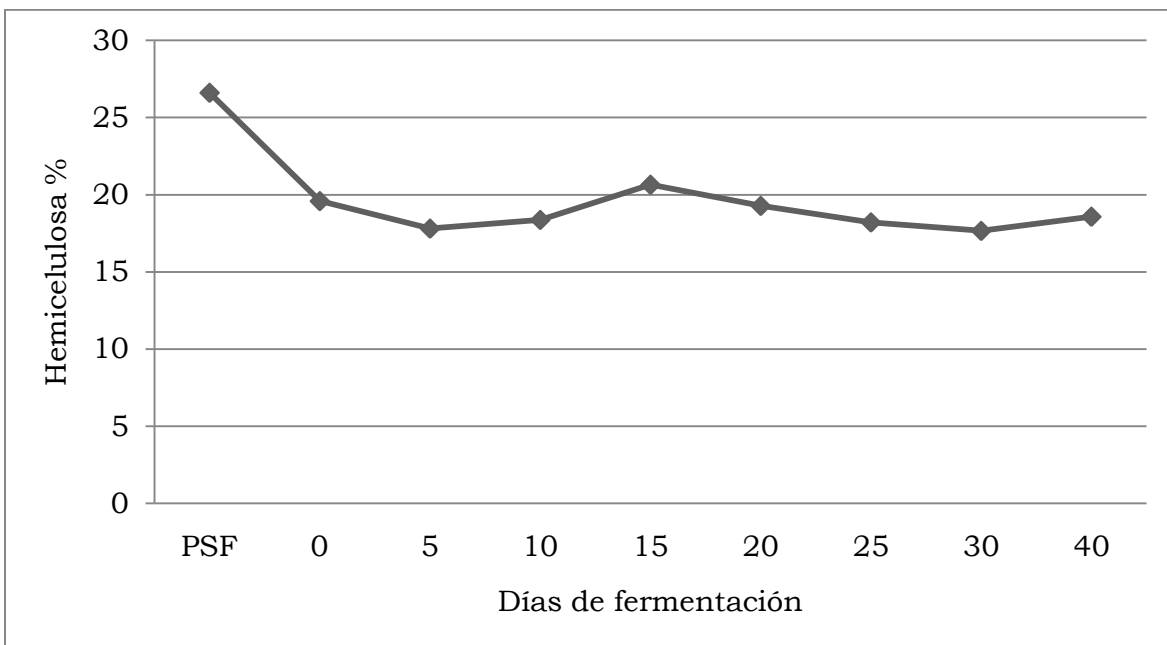
PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 10.- Efecto de los días de fermentación en el contenido de FDA.



PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 11.- Efecto de los días de fermentación en el contenido celular.



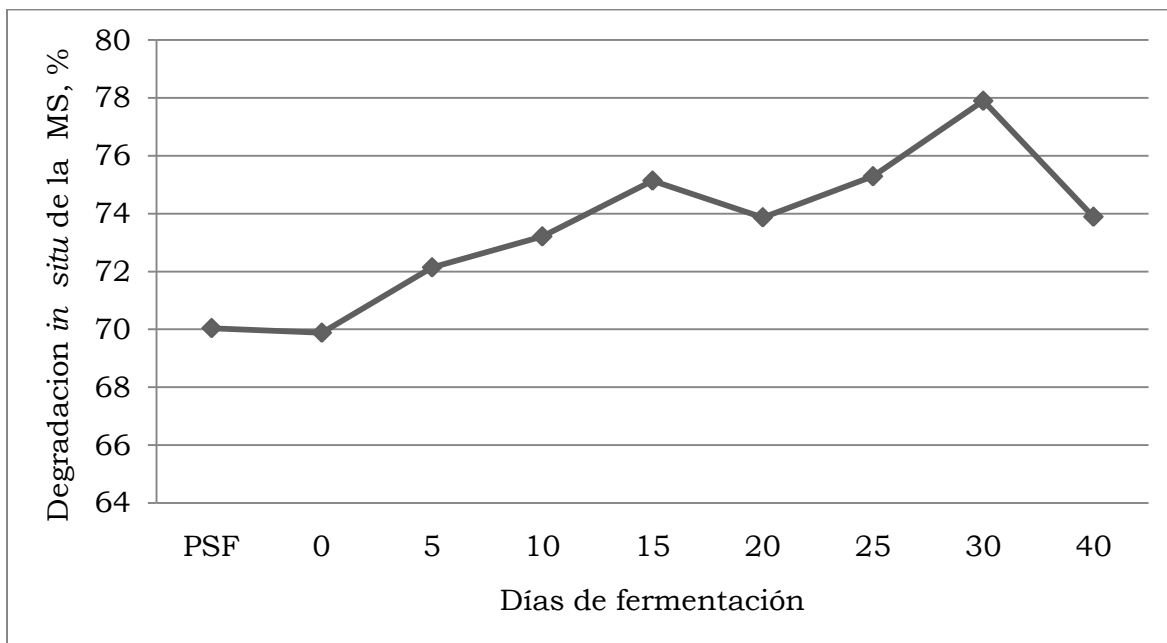
PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 12.- Efecto de los días de fermentación en el contenido de hemicelulosa.

Con relación a las diferencias estadísticas encontradas en el contenido de ceniza, y MO en la mezcla, biológicamente no son importantes (Anexo 4).

En cuanto a la degradabilidad *in situ* de la materia seca (DIMS), los valores más bajos se presentaron en la pollinaza sin fermentar y en el día 0 de fermentación (70.04 y 69.88 %). Conforme transcurrieron los días de fermentación (día 5, 10 y 15), se incrementó la DIMS. Posteriormente en el día 20 disminuyó. Por el contrario, en los días 25 y 30 la DIMS aumentó. En el día 30 se encontró el valor más alto de DIMS (77.90) (Figura 12, Anexo 4).

Con relación a las diferencias estadísticas encontradas en la degradación *in situ* de la materia orgánica (DIMO) en los alimentos, biológicamente no son importantes (Anexo 4).



PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 13.- Efecto de los días de fermentación en la DIMS.

5.3 Parámetros microbiológicos.

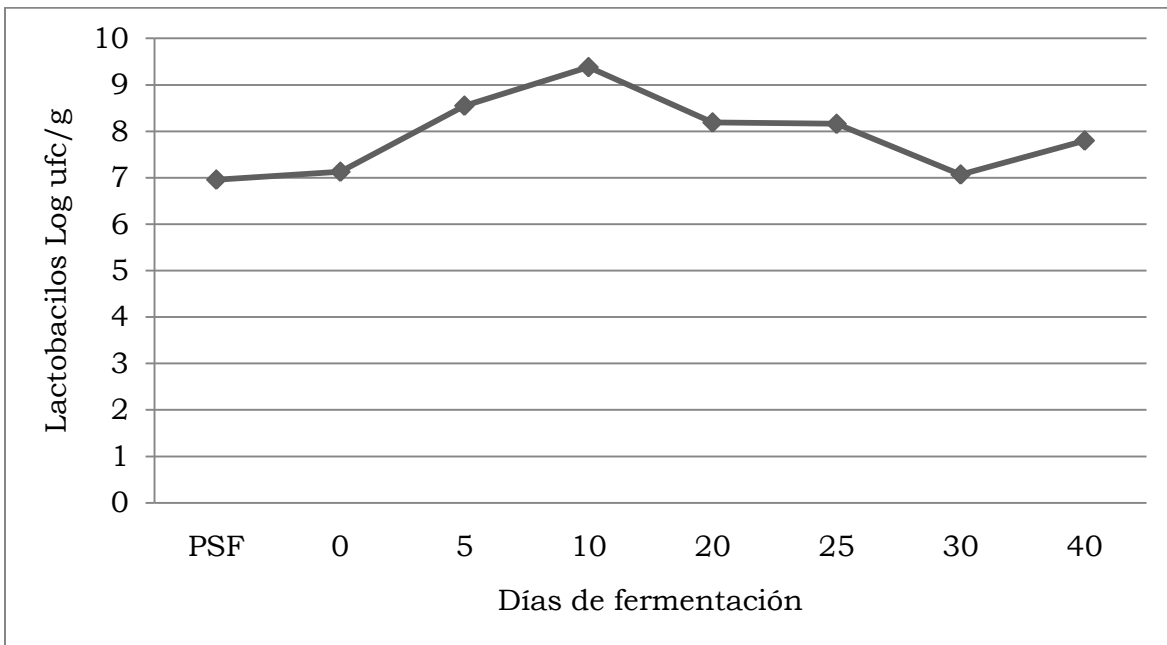
Con respecto, al contenido de lactobacilos, la menor concentración se presentó en la pollinaza sin fermentar (6.96 Log ufc/g), incrementó al mezclar la pollinaza con los ingredientes para su fermentación (día 0). A partir de este día se observó incremento lineal hasta el día 10, donde se encontró el valor más alto de lactobacilos (9.38 Log ufc/g). Posteriormente, presentó disminución lineal, conforme transcurrieron los días de fermentación (20, 25, y 30 días). (Figura 13, Anexo 5).

En cuanto, a las bacterias aeróbicas, en la pollinaza sin fermentar el contenido fue de; 7.64 Log ufc/g. Posteriormente, el contenido aumentó al mezclar la pollinaza con los ingredientes para la fermentación (días 0), del mismo modo, se observó aumento en el día 5 de fermentación, en este día se encontró el valor más alto de bacterias aeróbicas (9.01 Log ufc/g), a partir del día 5 de fermentación, el contenido disminuyó. En el día 30 de fermentación se presentó el menor contenido de bacterias aeróbicas (6.47 Log ufc/g) (Figura 14, Anexo 5).

Con relación al contenido de *Echerichia coli*, la pollinaza sola sin fermentar presentó 1.33 Log ufc/g, aumentó el día 0 de fermentación al mezclar la pollinaza con los ingredientes para la fermentación, en este día se encontró el valor más alto (3.18), disminuyó en el día 5 (1.92). No se encontró crecimiento en el día 10 y en el transcurso de la fermentación (Anexo 5).

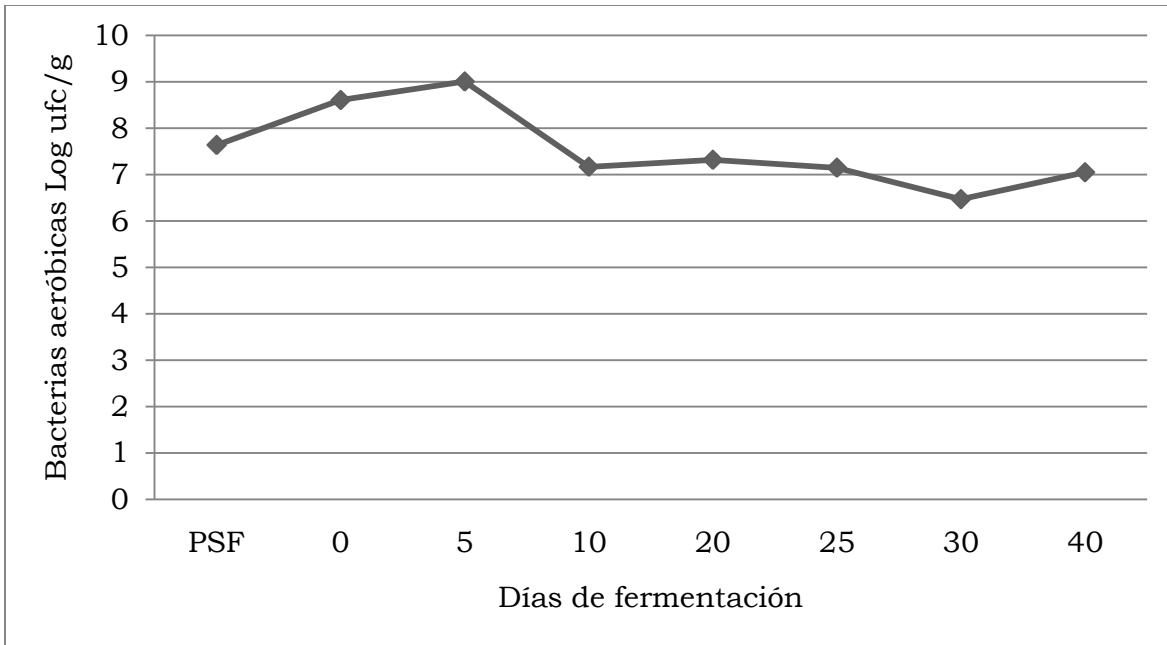
Por su parte, en el contenido Levaduras, se observó que la pollinaza sin fermentar tuvo 6.84 Log ufc/g. para luego disminuir al momento de mezclar la

pollinaza con los ingredientes de la fermentación (día 0). Posteriormente, según transcurrieron los días de fermentación (5,10, 20, y 30 días), se incremento y el valor más alto se encontró en el día 30 de fermentación (7.47 Log ufc/mg). En el día 40 el contenido de levaduras disminuyó, donde se encontró el menor contenido de levaduras (6.35 Log ufc/g) (figura 15, Anexo 5).



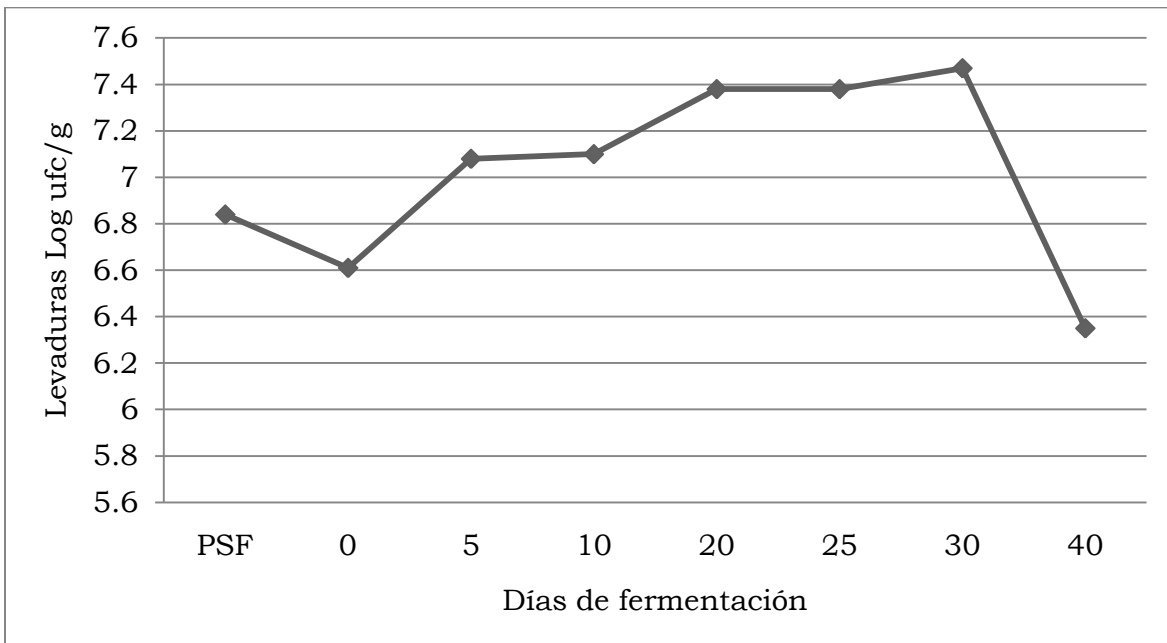
PSF: Pollinaza sola sin fermentar

Figura 14.- Efecto de los días de fermentación en el contenido de lactobacilos (Log ufc/g).



PSF: Pollinaza sola sin fermenta.

Figura 15.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido bacterias aeróbicas (Log ufc/g).



PSF: Pollinaza sola sin fermenta.

Figura 16.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de levaduras (Log ufc/g).

VI. DISCUSIÓN

La disminución del pH al momento de mezclar la pollinaza con la melaza y Vitafert (día 0), puede estar relacionado a las altas concentraciones de ácidos orgánicos contenidos en el Vitafert (Elías y Herrera, 2001) lo que contribuyó en su descenso. La disminución del pH durante el proceso de FES está relacionado a la capacidad de producción y acumulación de ácidos orgánicos de cadena corta en especial de ácido láctico por los lactobacilos, como producto de la utilización de los nutrientes, en especial de carbohidratos fácilmente fermentables disponibles en la mezcla, además del aumento en humedad que se detectó al mezclar la pollinaza con la melaza y Vitafert, lo que pudo beneficiar el crecimiento de microorganismos, observado, fundamentalmente en mayor población en el día 5 y 10 posteriores al mezclado, que corresponde a la correlación encontrada en el contenido de ácido láctico y disminución de pH ($Y = -13.734 + 7.9529X$; $R^2 = 0.96^{***}$). Por su parte, la eliminación de *Echerichia coli.*, y disminución significativa en el contenido de bacterias aerobias en ese periodo, pudiera ser por la capacidad de acción de los ácidos orgánicos al penetrar en su forma molecular a través de la paredes externas de la célula, disociarse internamente y desnaturalizar las proteínas que forman el complejo enzimático, además es posible que se produzca gasto de energía para expulsar los ácidos, que provoca agotamiento de energía, que pudiera resultar en muerte celular (Hazan *et al.* 2004).

En nuestro estudio el contenido de lactobacilos disminuyó con el transcurso de la fermentación, lo que pudiera ser atribuido al agotamiento de los carbohidratos fácilmente fermentables y acumulación de metabolitos en el sistema, usados por los lactobacilos y microorganismo aeróbicos, por lo tanto el agotamiento de los nutrientes pudo limitar el constante crecimiento de lactobacilos durante la fermentación. Sin embargo, el contenido de ácido láctico con el transcurso de la fermentación aumentó, lo que pudiera estar relacionado con la acumulación del ácido producido por los lactobacilos presentes. Por otro lado, el contenido de bacterias aeróbicas disminuyó con el transcurso de la fermentación, esto corresponde a la correlación encontrada en el contenido de ácido láctico y disminución de bacterias aerobias ($Y = -8.45575 + 8.5991X$; $R^2 = 0.61^{***}$).

Referente al contenido de MS, el valor más alto se encontró en la pollinaza sin fermentar (91.91%), dicho valor corresponde al máximo reportado por Morales *et al*, (2002), donde analizaron 19 muestras de cama de pollo. La MS disminuyó al mezclar la pollinaza con los ingredientes para la fermentación ya que el Vitafert es un fermentado líquido que contiene 18.23% de MS, además, corresponde a la capacidad absorbente de la pollinaza, reportado por Gutiérrez *et al*, (2003), en un estudio del porcentaje de inclusión de pollinaza en un ensilado de cascara de piña y pollinaza. En nuestro estudio, la MS tuvo poca variación a pesar de que Mitchell *et al*. (2002), mencionan que durante la FES los azúcares son oxidados por los microorganismos presentes en el sistema

durante sus procesos metabólicos para síntesis celular, con producción de CO₂ y agua, como productos finales, parte del agua producida durante la oxidación de las moléculas, pudiera evaporarse por el calor metabólico que se genera durante el proceso de FES, sin embargo, en nuestro estudio la FES se realizó en bolsas de nylon, lo que pudo impedir la evaporación del agua. En el día 40 se encontró el menor valor, contrario a lo reportado por Calderón *et al*, (2005), donde el contenido de MS disminuyó significativamente en camas inoculadas con Vitafert a los 15 y 30 días de fermentación.

Con respecto al contenido de PC, la disminución de pH por concentración de ácido láctico, pudo influir en el aumento de PC con el transcurso de la fermentación, ya que pH bajo puede ocasionar que el N-NH₃ volátil presente en la pollinaza se transforme a NH₄ el cual no es volátil, almacenándose en forma de PC en el sistema. Similar resultado reportó Arias (2010), al adicionar a pollinaza 3 niveles de Vitafert (0, 5.5, y 11%) y 3 niveles de melaza (8,16, y 24%); donde el pH disminuyó y el contenido de proteína cruda aumentó a las 24 horas de fermentación, por el contrario Castellanos *et al*, (2000), al someter pollinaza a deshidratado en estufa, el valor proteínico disminuyó, probablemente debido a la volatilización del NH₃ de la pollinaza.

El incremento en PV durante el proceso de FES, pudiera estar relacionado con la acumulación de microorganismos benéficos que activan e incrementan el contenido de proteína verdadera, por su parte Pandey *et al*, (2001), menciona

que la proteína celular puede ser una vía indirecta de medir el crecimiento microbiano durante el proceso de FES.

Con respecto a la disminución de la FDN pudiera atribuirse a la dispersión de la misma al mezclarse con la melaza y el Vitafert y al ataque de la fracción fibrosa que ejercen algunos grupos microbianos (celulolíticos y lignolíticos), los cuales son capaces de degradar lignina y la celulosa hasta azúcares tan simples como la glucosa, lo que pudiera explicar la menor concentración de la FDN durante el transcurso de la fermentación, debiéndose, además, al mayor tiempo de exposición de las fracciones fibrosas a las enzimas celulolíticos y lignolíticos y acción de los ácidos presentes producto de los microorganismos, lo que a su vez, ocasionó el aumento en la DIMS con el transcurso de la fermentación. Los resultados en la FDN corresponde a los encontrados por Calderón *et al*, (2005), en pollinaza de cascarilla de café inoculada con Vitafert, la mayor disminución se presentó en el día 30 de fermentación.

VII. CONCLUSIONES

1. Los días de fermentación disminuyen el pH, bacterias aeróbicas, (FDN), y hemicelulosa.
2. La FES anaeróbica de la mezcla de pollinaza, melaza y Vitafert elimina *Echerichia coli*.
3. El pH está influenciado por la concentración de ácido láctico.
4. La concentración de ácido láctico, N-NH₃, levaduras, contenido celular y degradación *in situ* de la materia seca, incremento con el tiempo de FES.
5. En el día 25 se encontraron los mejores indicadores nutricionales de la mezcla.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, D. C., Carriere, J. A. J., & McKay K. A. 1968. Bacteriological studies of poultry litter fed to livestock. The Canadian Veterinary Journal 9(6):127-131.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Off. Agric. Chem., Washington, D.C., U.S.A.
- Araque, C. 2001. Uso de la urea en la alimentación de rumiantes. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Táchira, Venezuela. www.produccion-animal.com.ar/.../46-uso-de_urea_en_la_alimentaci
- ARC (Agricultural Research Council). 1980. The nutrient requirements of ruminant livestock. Farnham Royal, Common. Agric. Bur.
- Arias, L.F. de T. 2010. Efecto de los niveles de Vitafert y melaza en la pollinaza fermentada aeróbica. Tesis presentada para obtener el grado de maestra en ciencias en producción agroalimentaria en el trópico. Colegio de Posgraduados campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.
- Bernstein, J. 1983. Análisis de alimento. Eds. Wintra, A.L. y Winto, K.B. Tomo I. Ed. Pueblo y Educación. 84 p.
- Buchbinder, L., Y. Baris, and L. Goldstein. 1953. Further studies on new milk-free media for the standard plate count of dairy products. Am J. Public Health 43:869-872.

- Calderón, A. J. O., Elías, I. A., Valdivié, N.M. 2005. Dinámica de la fermentación en estado sólido de la camas de cascarilla de café en inicio de ponedoras inoculadas con Vitafert. REDVET - ISSN 1695-7504
- Cano, A.L., Aranda, I.E.M., Mendoza, M.G.D., Pérez, P.J. & Ramos, J.J.A. 2003. Comportamiento de toretes en pastos tropicales suplementados con caña de azúcar y enzimas fibrolíticas. Tec. Pecu. Méx. 41(2):153-164.
- Castellanos, R. A. F., Murguía, O. M. L. 2002. Comportamiento de la contaminación microbiológica en alimentos balanceados para rumiantes elaborados con pollinaza. Rev Biomed; 13:171-177.
- Castellanos, R. A. F., Murguía, O. M. L., Moguel, O. Y. B. 2000. Efecto del deshidratado sobre el valor nutritivo de la pollinaza y la presencia de microorganismos. Téc Pecu Mex 38: 219-230.
- Conway, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and Volumetric Error. 4th Ed. Crosby Lockwood and Sons, Ltd. London.
- De Dios, V.O.O. 2003. Ecofisiología de los bovinos en sistemas de producción del trópico húmedo. Colección José N. Roviroso: Biodiversidad, desarrollo sustentable y trópico húmedo. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) 376.
- Elías, A. 1977. Producción de carne bajo sistema de pastoreo en el trópico. ALPA-VI Reunión. Ciudad de la Habana Cuba. 28 p.
- Elías, A., Herrera, R. 2008. Prodccion de un alimento a través de procesos biotecnológicos sencillos, con el empleo de microorganismos beneficos activados (MEBA) Vitafert. Rev. Cubana Cienc. Agric. 35:153.

- Elías, A., Lezcano, O. & Herrera, F.R. 2001. Algunos indicadores bromatológicos y productos finales de la fermentación para la obtención de cuatro tipos de Sacarinas inoculadas con Vitafert. *Rev. Cub Cienc. Agric.* 35:153.
- El-Jalil, M.H., Zinedine, A., Faid, M. 2008. Some Microbiological and Chemical Properties of Poltry Wastes Manure After Lactic Acid Fermentation. *Int J Agr Biol*, 10:405-11.
- Encarta, 2000. Enciclopedia Microsoft corporation. Director Editorial. Ramiro Sánchez Sanz.
- Enriquez, Q.F. 2001. Los forrajes del trópico húmedo en México: conocimiento actual e investigación futura. En: memorias los forrajes en México presente y futuro. Programa de Ganadería. Colegio de Postgraduados Montecillo, edo. de México, pp. 1-24
- Enriquez, Q.F., Meléndez, N.F. & Bolaños, A.E.D. 1999. Tecnología para la producción y manejo de forrajes tropicales de México. INIFAP – Produce. Libro técnico No. 7. División pecuaria. México. 263 p.
- FAO, 1998. La fermentación en pequeña escala. En: Agricultura21. <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3.htm>> /Consultado: 7 de septiembre del 2005/.
- Fontenot J.P. y K.E. Webb. 1975. Health aspects of recycling animal wastes by feeding. *J. Anim. Sci.*, 40(6):1267-77
- Fontenot, J.P. 1999. Nutrient Recycling: The North American Experience. *Review. J. Anim. Sci.* 12:642

- García, Y., Elías, A., Albelo, N., Herrera, F.R., Nuñez O., Dieppa O. 2008. Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*, tomo 32, pág. 195.
- García, Y., Elías, A., Herrera, F.R. 2005. Dinámica microbiana de la fermentación *in vitro* de las excretas de gallinas ponedoras. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*, tomo 39, número 1.
- García, Y., Lon, W. E. & A. Ortiz. 2008. Efecto de los residuales avícolas en el ambiente. *Los Avicultores y su Entorno*. Año 10: 40 – 50.
- Gonzales, P.E. 2006. Pubertad en vaquillas y su impacto en la eficiencia reproductiva de los hatos de cría en el trópico. *Memorias V Foro de Lechería Tropical*, Villahermosa Tabasco, México.
- Gutiérrez, F., Rojas, B.A., Dormond, H., Poore, M., Wing C.J.R. 2003. Características nutricionales y fermentativas de mezclas ensiladas de desechos de piña y avícolas. *Agronomía Costarricense* 27(1): 79-89.
- Hazan, R., Levine, A., & Abeliovich, H. 2004. Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (8): 4449-4457.
- Hernández, C.J. 2001. Elaboración y caracterización de un aditivo biológicamente activo a través de una fermentación en estado líquido. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, campus Tabasco, México.

- Hernández, G. M. 2002. Desarrollo de un modelo conceptual para la simulación dinámica, mecanística del consumo de bovinos pastoreando en el trópico. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de: Maestro en Producción Animal Tropical opción: Nutrición Animal. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida Yucatán, México.
- Ibañez, A., Castillo, C.J.A, Peducassé, C.A. & Vaca, R.J.L. 2006. Situación de la oferta nutritiva de la gallinaza y pollinaza procesadas en granjas avícolas adyacentes a la Ciudad de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- INEGI. 2010. Instituto nacional de estadística geográfica e informática. Anuario estadístico ganadero. Instituto nacional de estadística geográfica e informática. Gobierno del estado de Tabasco.
- Ishaizaki, S., Hikosaka, K. and Hirose, T. 2003. Increase in leaf mass per area benefits plant growth at elevated CO² concentration. *Ann Bot* 91: 905-014.
- Jacob, J., Kunkle, W., Tervola, R., Miles, R., Mather, F. 1997. Brioler litter, Part 1; A feed ingredient for ruminant. University of Florida. Institute of Food Animal and Agricultural Science. Florida Cooperative Extension Service, PS-13, 1-5 p.
- Jay, J.M. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Tercera Edición. Ed. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 804 p.
- Jesús O. Calderón, A. J.O., Elías, I. A., & Valdivia, N. M. 2005. Dinámica de la fermentación en estado sólido de la camas de cascarilla de café en inicio de ponedoras inoculadas con Vitafert. *Revista Electrónica de Veterinaria*

REDVET - ISSN 1695-7504

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

Jordon, D. J.; Klopfenstein, Terry J.; and Adams, Don C. 2002. "Dried Poultry Waste for Cows Grazing Low-Quality Winter Forage" Faculty Papers and Publications in Animal Science. 539 p.

Juárez, L.F.I., Montero, L.M., Serna, G. C., Canudas, L.E.G. 2011. Evaluación nutricional de gramíneas forrajeras Tropicales para Bovinos <tiesmexico.cals.cornell.edu/.../...> /Consultado: 22 de abril del 2011/.

Julián, R.M.C., & Ramos Sánchez, R. L.B. 2007. fermentación en estado sólido (i). Producción de alimento animal. Tecnología Química Vol. XXVII, No. 3. Universidad de Camagüey
<http://ojs.uo.edu.cu/index.php/tq/article/viewFile/2435/1966>

Lastra, M.I., Galarza, M.J., García, B.C., Olvera, N.R., Albarran, D.M., Smith, C.D., López, G.A., Yañez, Z.M., Sánchez H.A. & Rebolledo, V.M. 1998. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en México 1990 – 1998. SAGAR.

Lehninger, A.L. 1991. Bioquímica. Segunda edición. Ed. Ediciones omega, S. A. Barcelona. 1117 p.

Lemaire, G. 2001. Ecophysiology of grasslands: dynamic aspect of forego plant populations in grazed swards. In: Proc. XIX international grassland congress. Sao Paulo Brasil, 29-37.

Mac Conkey , A.1905.Lactose-fermenting bacteria in feces. J. Hyg. 5:333-379

- Madigan M. T, Martinko, J. M. y Parker J., 2004. Brock Biología de los Microorganismos, 10ª edición. Ed. Prentice-Hall, Madrid.
- Mc Culloough, H.1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clin. Chem. 17:297-304.
- Mitchell, D. A., Berovic M., Krieger, n., 2002, Overview of solid state bioprocessing. Biotechnology Annual Review. 8;183–225.
- Morales, T. H., Gutierrez, O. E., Bernal, B. H. 2002. El uso de la cama de pollo de buena calidad mejora la productividad de bovinos en crecimiento en engorda intensiva. Tec. Pecu Mex; 40 (1): 1-15.
- Nigam, P., Robinson, T., 2004. Solid state fermentation: An overview. Handbook of fungal biotechninology. CRC Press 2003. Print ISBN: 978-0-203-02735-6.
- Ørskov, E.R. 1992. Protein nutrition in ruminants. 2ª Ed. New York. Academic Press Inc. London. p. 175.
- Pandey, A., & Sumitra, R. 2005. Process Developments in Solid-State Fermentation for Food Applications. Food Biothechnology, Second edition. CRC Print ISBN: 978-0-8247-5329-0
- Pandey, A., Socol C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Nigam, P. 2001. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi. 221 p.

Pastrana, L. 1996. Fundamentos de la fermentación en estado sólido y la aplicación en la industria alimentaria. Ciencia y tecnología alimentaria. ISSN: 1696-2443.

Pedro J. Panisello, J.P., Rooney, R., Peter C. Quantick, P.C., Stanwell, S, R. 2000. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems International Journal of Food Microbiology 59: 221–234

Perez, G.N., Torrado A. A., Lopez M.C., Pastrana, L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electronic journal of Environment, Agricultural and Food Chemistry. ISSN : 1549-4377.

Peruchena, C.O. 2004. Suplementación de bovinos para carne sobre pasturas tropicales. Aspectos nutricionales, reproductivos y económicos y económicos 3 p.

Piad, R. 2001. Evaluación del hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollitas de reemplazo de ponedoras. Tesis Dr. Cs. Instituto de ciencia animal. La Habana, Cuba.

<http://www.ica.edu.cu/biblioteca/Tesis/martinezma%20.pdf>

Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, N.G. 2003. Biochem. Eng J. 13, 127-135 p.

Ramírez, R.O., Garay, H.A., Sila, C. da S., Pérez, P.J., Enríquez, Q. J.F., Quero C.A.R, Herrera H. J.G., Cervantes N.A. 2009. Acumulación de forraje, crecimiento y características estructurales del pasto Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.) cosechado a diferentes intervalos de corte. Tec. Pecu Méx 2009; 47(2):203-213

- Ramos, J.A., 2005. Obtención de un concentrado energético- proteínico por fermentación en estado sólido de la caña de azúcar para bovinos en ceba. Tesis de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana Cuba.
- Ricke, S.C. 2003. Perspectives on the of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials. Poultry science; 82: 632-639
- Rios, A.L., Combellas, J., Alvarez, Z. 2005. Uso de excretas de Aves en la alimentación de Ovinos. Zootecnia Tropical 23(2):183-210.
- Roach, S., Isenhardt, L., Mckenna, L., Cunningham, M. 2009. The Risk and Unregulated Prctice of Feeding Poultry Litter to Cattle. Filthy Feed. http://www.foodanimalconcerns.org/PDF/filthy_feed_report.pdf
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. & Wiseman, R.F. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. J. Bacteriol. 62:132
- Ruiz, M.E. 1994. Subproductos y residuos en la alimentación de bovinos. Memoria del IV curso de “Producción e Investigación en Pastos Tropicales” Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia, La sociedad Venezolana de Pastizales y Forrajes. Capitulo Zuliano y el banco de Maracaibo. Maracaibo Venezuela. P 69-87.
- Sage, F.R., & Kubein, S.D. 2007. The temperatura response of C3 and C4 photosynthesis. Plan Cell and Enviroment (30): 1086-1106.
- Santos, M.R., da Fonseca, D.M., Euclides, V.P., Júnior, J.R., Júnior, D. N. & Moreira, L.M. 2009. Produção de bovinos em pastagens de capim-braquiária diferidas. Rev. Bras. Zootec. 38:635

- SIGMA. 1990. Lactate, quantitative, enzymatic determination of lactate in whole blood at 340 nm (Procedure No. 826-uv) USA. 31 p.
- Software R. 2009. Foundation for statistical computing, version 2.10.1.
- Surbrook, T.C., Sheppard, C.C., Boyd, J.S. Zindel, H.C., Flegal, C.J. 1971. Drying poultry waste. *Lvstk Waste Mgmt and Pollut Abatement Proc Inter Symp Lvstk Wastes*. ASAE Michigan 1971: 192-194
- Tukey, J. 1980. The problema of Multiple Comparisons. Unpublished manuscript. Princeton University.
- Unión Nacional de Avicultores. 2011. Pollinaza: recurso nutricional y amenaza sanitaria. *Boletín*, Mexico.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.P. & Lewis, B.A. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:3583 – 3597.
- Van Winsen, R., Urlings, B.A.P., Lipman, L.J.A., Snijders, J.M.A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H.M. & van Knapen, F. 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracs of pigs. *Appl. Environm, Microbiol.* 67:3071
- Vásquez, S.M., Suarez, M.H., Zapata, B.S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias acido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr Vol.* 36, num 1

Wang, Z., Xu, Q. & Huang, B. 2004. Endogenous Cytokinin Levels and Growth Responses to Extended Photoperiods for Creeping Bentgrass under Heat Stress. *Crop Sci.* 44: 209-213.

Wu, Z., Skjelvag, O.A., & Baadshaud, H.O., 2004. Quantification of photoperiodic effects on Growth of *Phleum pratense*. *Annals Botany.* 94: 535-543.

Zinn, R.A., Barajas, R., Montaña, M. and Sean, Y. 1996. Protein and energy value of dehydrated poultry excreta in diets for feedlot cattle. *J. Anim. Sci* 74:2331-2335.

IX. ANEXOS

Anexo 1.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el pH, ácido láctico y amoniaco.

TRATAMIENTOS	pH	Acido láctico %	Amoniaco %
PSF	8.03 ^a	0.0 ^g	0.50 ^d
DÍA 0	7.77 ^b	0.02 ^f	0.44 ^e
DÍA 5	6.63 ^c	0.07 ^e	0.52 ^{cd}
DÍA 10	5.72 ^d	0.16 ^d	0.53 ^{cd}
DÍA 15	5.57 ^e	0.19 ^b	0.62 ^b
DÍA 20	5.55 ^{ef}	0.17 ^{cd}	0.55 ^c
DÍA 25	5.50 ^f	0.18 ^{bc}	0.51 ^{cd}
DÍA 30	5.24 ^h	0.20 ^a	0.69 ^a
DÍA 40	5.36 ^g	0.17 ^{cd}	0.72 ^a
EE±	0.001***	0.000048***	0.0007***

PSF= pollinaza sola sin fermentar.

^{abcdefghg} Medias con diferentes literal en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1980)

***P<0.001

Anexo 2.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en la materia seca, proteína cruda, proteína verdadera y relación PV-PC

TRATAMIENTOS	Materia seca %	Proteína cruda %	Proteína verdadera %	Relación PV-PC
PSF	91.91 ^a	28.32 ^a		
DÍA 0	70.55 ^{bc}	24.87 ^f	14.31 ^c	57.01 ^c
DÍA 5	70.18 ^{bc}	25.70 ^e	14.34 ^c	55.70 ^d
DÍA 10	71.21 ^b	26.52 ^{cd}	14.84 ^{bc}	53.32 ^e
DÍA 15	70.44 ^{bc}	26.45 ^d	14.51 ^c	53.00 ^e
DÍA 20	70.08 ^{bc}	27.57 ^b	15.91 ^{ab}	58.60 ^b
DÍA 25	69.67 ^{bc}	27.67 ^{ab}	16.79 ^a	60.60 ^a
DÍA 30	69.95 ^{bc}	27.52 ^b	15.67 ^{ab}	58.56 ^b
DÍA 40	69.36 ^c	27.12 ^{bc}	15.81 ^{ab}	58.33 ^{bc}
EE±	0.862 ***	0.250 ***	0.430 **	0.624***

PSF= pollinaza sola sin fermentar.

^{abcd} Medias con diferentes literal en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1980)

P<0.01, *P<0.001

Anexo 3.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en la fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, contenido celular, y hemicelulosa.

TRATAMIENTOS	FDN %	FDA%	Contenido celular %	Hemicelulosa %
PSF	48.44 ^a	21.34 ^a	51.55 ^g	26.61 ^a
DÍA 0	37.71 ^{cd}	18.11 ^{cd}	62.28 ^{de}	19.59 ^{bc}
DÍA 5	36.58 ^{def}	17.42 ^d	63.41 ^{bcd}	17.81 ^e
DÍA 10	36.22 ^{ef}	17.90 ^{cd}	63.77 ^{bc}	18.37 ^{cde}
DÍA 15	38.55 ^{bc}	17.90 ^{cd}	61.44 ^{ef}	20.65 ^b
DÍA 20	39.56 ^b	19.68 ^b	60.75 ^f	19.28 ^{cd}
DÍA 25	36.74 ^{de}	17.80 ^{cd}	64.42 ^{ab}	18.21 ^{de}
DÍA 30	35.31 ^f	17.08 ^d	65.13 ^a	17.66 ^e
DÍA 40	37.25 ^{cde}	18.66 ^{bc}	63.04 ^{cd}	18.58 ^{cde}
EE±	1.346***	0.785****	0.899***	1.158***

PSF= pollinaza sola sin fermentar.

^{abcdef} Medias con diferentes literal en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1980)

***P<0.001

Anexo 4.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de cenizas, materia orgánica, DIMS y DIMO a 24 hrs.

TRATAMIENTOS	Ceniza %	Materia orgánica %	DIMS %	DIMO %
PSF	20.17 ^d	79.82 ^c	70.04 ^c	92.34 ^a
DÍA 0	20.77 ^b	79.22 ^e	69.88 ^c	90.60 ^b
DÍA 5	20.81 ^b	79.18 ^e	72.14 ^{bc}	91.51 ^{ab}
DÍA 10	19.60 ^f	80.40 ^a	73.21 ^{bc}	91.98 ^{ab}
DÍA 15	19.54 ^f	80.45 ^a	75.14 ^{ab}	91.90 ^{ab}
DÍA 20	21.03 ^a	78.96 ^f	73.87 ^b	92.15 ^a
DÍA 25	20.06 ^{de}	79.93 ^{bc}	75.29 ^{ab}	92.20 ^a
DÍA 30	19.95 ^e	80.04 ^b	77.90 ^a	91.96 ^{ab}
DÍA 40	20.50 ^c	79.49 ^d	73.89 ^b	91.59 ^{ab}
EE±	0.0207***	0.0207***	10.463**	1.640

PSF= pollinaza sola sin fermentar.

abcdef Medias con diferentes literal en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1980)

P<0.01, *P<0.001

Anexo 5.- Efecto de los días de fermentación de la pollinaza en el contenido de lactobacilos, bacterias aeróbicas, *Echerichia coli* y levaduras (Log ufc/ml).

TRATAMIENTOS	Lactobacilos	Bacterias aeróbicas	<i>Echerichia coli</i>	Levaduras
PSF	6.96 ^f	7.64 ^c	1.33 ^c	6.84 ^{bc}
DÍA 0	7.13 ^e	8.61 ^b	3.18 ^a	6.61 ^c
DÍA 5	8.55 ^b	9.01 ^a	1.92 ^a	7.08 ^b
DÍA 10	9.38 ^a	7.17 ^{de}	-	7.10 ^b
DÍA 20	8.19 ^c	7.32 ^d	-	7.38 ^a
DÍA 25	8.16 ^c	7.15 ^{de}	-	7.38 ^a
DÍA 30	7.07 ^{ef}	6.47 ^f	-	7.47 ^a
DÍA 40	7.80 ^d	7.05 ^e	-	6.35 ^d
EE±	0.009***	0.250***	0.0695***	0.430***

PSF= pollinaza sola sin fermentar, Log ufc= Logaritmo de unidades formadoras de colonias, ^{abcdef} Medias con diferentes literal en la misma columna difieren a P<0.05 (Tukey, 1980) ***P<0.001