



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

MODIFICACIÓN DE VARIABLES DE LA DEGRADACIÓN Y FERMENTACIÓN *in vitro* E *in situ* DE UNA DIETA CON UNA FITASA EXÓGENA PARA BORREGOS EN CRECIMIENTO

LAURA HAYDÉE VALLEJO HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **Modificación de variables de la degradación y fermentación *in vitro* e *in situ* de una dieta con una fitasa exógena para borregos en crecimiento** realizada por la alumna: **Laura Haydée Vallejo Hernández** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Sergio Segundo González Muñoz

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Germán Buendía Rodríguez

ASESOR



Dr. Jacinto Efren Ramírez Bribiesca

ASESOR



Dr. Luis Alberto Miranda Romero

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero de 2014

RESUMEN

MODIFICACIÓN DE VARIABLES DE LA DEGRADACIÓN Y FERMENTACIÓN *in vitro* E *in situ* DE UNA DIETA CON UNA FITASA EXÓGENA PARA BORREGOS EN CRECIMIENTO

Laura Haydée Vallejo Hernández.

Colegio de Postgraduados. Ganadería

Tres dosis de enzima fitasa Ronozyme-HiPhos[®] (DSM Nutritional Products 5000 FTU g⁻¹) (0, 540 y 720 g fitasa t⁻¹) se evaluaron en un dieta concentrada (70% grano de sorgo y 16.9% gluten de maíz), para determinar si la inclusión de la enzima modifica las variables de degradación y fermentación de la dieta. Muestras de dietas fueron incubadas durante 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h, para identificar cambios en degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS), pH, nitrógeno amoniacal (N-NH₃), fósforo (P) en medio de incubación, producción de gas y ácidos grasos volátiles (AGV); el diseño experimental fue de bloques al azar generalizados. Además se realizó una prueba *in situ*, en la cual se utilizaron 6 borregos criollos (40 ± 2 kg PV) con cánula en rumen y duodeno, para determinar cambios en consumo de materia seca (CMS), pH y concentración de AGV en líquido ruminal, N-NH₃ y P en líquido ruminal y duodenal, excreción de P en heces y orina, concentración de P en plasma sanguíneo. Se tomaron muestras del rumen y duodeno a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h, y el diseño experimental fue un Cuadro Latino 3x3 repetido. Los datos fueron analizados con el procedimiento GLM de SAS (v 9.2), y se compararon las medias de tratamientos usando la prueba de Tukey (P ≤ 0.05). El contenido de P fítico en la dieta fue 67.74 % del P total. No se observaron diferencias (P > 0.05) en ningún horario de incubación para DIVMS, producción de gas, N-NH₃, AGV o P en medio de incubación. La inclusión de la enzima no modificó (P > 0.05) la excreción de MS (197.30, 184.36 y 172.52 g d⁻¹), digestibilidad aparente (81.33, 82.90 y 83.75 %), pero sí el CMS (1053.32^{ab}, 988.70^b, 1141.32^a g d⁻¹). No se encontraron diferencias en pH, N-NH₃ o P en líquido ruminal y duodeno. La relación acético:propiónico se invirtió (0.73:1, 0.70:1 y 0.67:1, en promedio). La concentración de P en orina o plasma sanguíneo no cambio, pero sí en heces (2.32^a, 2.01^{ab} y 1.85^b %P g⁻¹MS). La disminución de P en heces puede reducir el efecto de este mineral como contaminante.

Palabras clave: Fitasa, fitato, fósforo, borregos.

ABSTRACT

MODIFICATION OF VARIABLES OF DEGRADATION AND FERMENTATION *in vitro* AND *in situ* OF A DIET WITH EXOGENOUS PHYTASE ON GROWING SHEEP

Laura Haydée Vallejo Hernández

Colegio de Postgraduados. Ganadería

Three doses of phytase enzyme Ronozyme-HiPhos[®] (DSM Nutritional Products 5000 FTU g⁻¹) (0, 540 and 720 g phytase t⁻¹) were evaluated in a concentrate diet (70 % sorghum, 16.9 % corn gluten) to determine if the inclusion of the enzyme modifies the degradation and fermentation variables of the diet. Diet samples were incubated for 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h, to identify changes of dry matter *in vitro* degradation (DMI_{VD}), pH, ammonia nitrogen (NH₃-N), phosphorus (P) in the incubation medium, gas production and volatile fatty acids (VFA); the experimental design was randomized complete block. Besides, an *in situ* trial was carried out, in which six Criollo lambs (40 ± 2 kg BW) with ruminal and duodenal cannula were used to determine changes in dry matter intake (DMI), pH and VFA concentration in ruminal fluid, NH₃-N and P in ruminal and duodenal fluid, P excretion in feces and urine, and P concentration in blood plasma. Ruminal and duodenal samples were taken at 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h; the experimental design was a 3x3 repeated Latin Square. Data were analyzed using the GLM procedure of SAS (v 9.2), and treatment means were compared using the Tukey test (P < 0.05). The content of phytic acid in the diet was 67.74 % of total P. No differences (P > 0.05) at any time of incubation for IVDMD, gas production, N-NH₃, AGV or P in the incubation medium were observed. The inclusion of the enzyme did not change (P > 0.05) excretion MS (197.30, 184.36 and 172.52 g d⁻¹), apparent digestibility (81.33, 82.90 and 83.75 %), but the CMS was affected (1053.32^{ab}, 988.70^b, 1141.32^a g d⁻¹). No differences in pH, N-NH₃ or P in ruminal and duodenum fluid were observed. The ratio acetic:propionic reversed (0.73:1, 0.70:1 and 0.67:1, on average). The concentration of P in urine or blood plasma exchange, but in feces was affected (2.32^a, 2.01^{ab} and 1.85^b % P g⁻¹ MS). Decreased fecal P can reduce the effect of this mineral as a contaminant

Keywords: Phytase, phytate, phosphorus, lambs.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante el periodo de maestría.

Al Colegio de Postgraduados y al programa de Ganadería por dejarme ser parte de su comunidad y por brindarme, a través de Doctores y personal enseñanzas académicas y de vida.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz, por el apoyo para la realización y conclusión de mi tesis; por las recomendaciones y guía en mi formación profesional, pero sobre todo, por los consejos que sé que me ayudarán a ser una mejor persona.

Al Dr. Germán Buendía Rodríguez, por creer en mí, por impulsarme a tomar decisiones y por darme tu voto de confianza siempre. Por aceptar dirigir la tesis y guiarme académica y personalmente.

A los Drs. J. Efrén Ramírez Bribiesca y Luis Alberto Miranda Romero, por su disposición y amabilidad, por los comentarios que le dieron un acertado enfoque a la investigación.

A la Dra. Ma. Magdalena Crosby Galván, por las facilidades otorgadas para el uso del Laboratorio de Nutrición Animal, por los consejos, comentarios y por aceptar ser parte de mi formación profesional.

Al Dr. Mario A. Cobos Peralta, por compartir un poco de sus conocimientos conmigo.

A Irma G. Peñaloza y Rodolfo Vera, por estar conmigo desde que esta aventura inició. Por el apoyo y los ánimos para seguir. Por todo el cariño recibido a pesar de la distancia.

A Mariana Meraz, Roxana Camargo y Julio Ayala, por la amistad, por la compañía en las largas jornadas de laboratorio y de campo, gracias porque aunque no debían, decidieron estar conmigo.

Al personal técnico de Laboratorio de Nutrición Animal; Jorge López, Luis de la Rosa, Anastacio Galicia. Laboratorio de Microbiología Ruminal; Sr. Agustín Hernández y Laboratorio de Nutrición Animal de CENIDFyMA-INIFAP, por el apoyo para realizar las determinaciones de las variables evaluadas en esta investigación.

Y a mis amigos y compañeros de clases que hicieron de mi maestría una bonita experiencia: Yess, Sara, Criss, Edgar Hdez, Edgar Valencia, Mary, Melisa, Karym, Elizabeth, Omar, Soni.

DEDICATORIA

Ma. de los Ángeles Hernández Ayala; una madre es apoyo moral, el empuje que hace falta cuando los ánimos fallan, un café humeante en las mañanas, un “que Dios te acompañe” al salir de casa. Pero tú, además, has sido la mujer que ayuda a mezclar el alimento, quien rotula las muestras, la compañía en las oscuras noches de muestreo, el consejo que llegó en el momento preciso. Esta Tesis es, por mucho, también tuya. Es por ti.

Rodrigo Vallejo Calderón; me has enseñado que para alcanzar una meta es necesario tener coraje, entrega, decisión y compromiso. Puedo levantar la vista y decirte: lo he logrado, tenías razón.

Emmanuel Vallejo Hernández y Rodrigo Vallejo Hernández, a ustedes que me han enseñado tantas lecciones de vida, me siento afortunada de tenerlos.

La realización de esta tesis es por ustedes, gracias por ser el viento bajo mis alas.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
2. Ovinocultura en México	1
3. Sistema de producción de ovinos	2
3.1 Sistemas de pastoreo	3
3.1.1 Pastoreo en agostadero	4
3.1.2 Pastoreo tecnificado	5
3.2 Sistemas industriales	5
3.3 Sistemas mixtos	6
4. Fósforo	6
4.1 Importancia del fósforo en el organismo	6
4.2 Absorción del fósforo en el tubo digestivo	7
4.3 Aporte dietario de fósforo	7
4.4 Ácido fítico	8
4.5 Efecto ambiental del fósforo excretado	9
5. Fitasa	9
5.1 Uso de fitasa exógena en alimentación de no rumiantes	11
5.2 Uso de fitasas exógena en alimentación de rumiantes	12
6. Hipótesis	13
7. Objetivo	13
8. Materiales y Métodos	13
8.1 Localización	13
8.2 Prueba <i>in vitro</i>	13
8.3 Prueba <i>in situ</i>	14
8.4 Análisis estadístico	14
9. Resultados y Discusión	16
9.1 Resultados <i>in vitro</i>	17
9.2 Resultados <i>in situ</i>	23
10. Conclusión	29
11. Literatura citada	30

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición (%) de las dietas experimentales	16
Cuadro 2. Degradación de materia seca <i>in vitro</i>	18
Cuadro 3. Producción acumulada de gas (mL) por gramo de muestra (MS) <i>in vitro</i>	19
Cuadro 4. pH del medio de incubación	19
Cuadro 5. Concentración de nitrógeno amoniacal (mg N dL ⁻¹) <i>in vitro</i>	20
Cuadro 6. Fósforo (mg dL ⁻¹) en medio de incubación	21
Cuadro 7. Producción de ácidos grasos volátiles <i>in vitro</i>	22
Cuadro 8. Consumo y excreción de materia seca	23
Cuadro 9. Producción de ácidos grasos volátiles <i>in situ</i>	24
Cuadro 10. Concentración de N-NH ₃ (mg N dL ⁻¹) en rumen y duodeno	26
Cuadro 11. pH de líquido ruminal	26
Cuadro 12. Concentración de fósforo (mg dL ⁻¹) en rumen y duodeno	27
Cuadro 13. Excreción de fósforo	28
Cuadro 14. Concentración de fósforo en plasma sanguíneo	29

1. Introducción

Los aditivos alimenticios en dietas para rumiantes mejoran la utilización de los nutrientes. Las fitasas son usadas para aumentar la biodisponibilidad de fósforo (P) que es baja (30 a 40 %) debido a que se encuentra como ácido fítico (Perney *et al.*, 1993). En la mayoría de los granos de cereales y semillas de oleaginosas, el ácido fítico enlaza hasta 70 % del P del ingrediente (Angel *et al.*, 2002).

En rumiantes, a pesar de que el ácido fítico es hidrolizado por la fitasas producidas por las bacterias ruminales. Cuando el rumiante se alimenta con dietas con alto contenido de granos de cereales la actividad fitásica es insuficiente, por lo cual el P inorgánico sale del rumen, no se absorbe en el intestino y es excretado como P fecal. El P en heces y orina se deposita en el suelo y es lixiviado por el agua de lluvia a los mantos acuíferos provocando la eutrofización de aguas superficiales (Satter, 2003; Knowlton *et al.*, 2004; Valk *et al.*, 2002).

La adición de fitasas exógenas en dietas para rumiantes reduce el contenido de P fecal, lo cual se atribuye a una mayor hidrólisis ruminal del ácido fítico y por tanto, de la concentración de P disponible para los microorganismos ruminales, estos incorporan el P a su metabolismo en la síntesis de ATP, como cofactor enzimático o constituyente de proteínas y fosfolípidos lo cual puede favorecer la síntesis de proteína microbiana, y por ende aumentar la eficiencia de degradación o fermentación de sustratos alimenticios (Ramírez-Pérez y Meschy 2005). No obstante, no se ha determinado si la adición de la enzima modifica estas variables ruminales.

2. Ovinocultura en México

La población de ovinos en México ocupa el quinto lugar del inventario nacional con 8,219,388 animales; detrás de la población de aves para carne y huevo (510,132,758), bovinos para carne y leche (32,936,334), porcinos (15,547,260) y caprinos (9,004,337). En el país, el Estado de México cuenta con mayor población de ovinos: 1,307,371 animales, seguido por Hidalgo con 1,099,773 y 1,229,649 en los estados del centro de la República Mexicana, es decir, más de una tercera

parte de la población nacional de ovinos se encuentra en la zona centro del país (SIAP, 2011).

En 2008 hubo una producción nacional de 51,275 ton de carne en canal de ovino y de 4,509 t de lana sucia, en el Estado de México la producción de carne en canal fue de 7,649 t (SIAP, 2011).

La Coordinación General de Ganadería (SAGARPA 2005) reportó un consumo nacional aparente (CNA) de carne de ovino de 85,965 t y una producción de 46,299 t, es decir, el 46.2 % del CNA corresponde a carne importada, principalmente de Australia y Nueva Zelanda.

En cuanto a los sistemas de producción; solamente 20 % de las unidades de producción se consideran como tecnificadas o semitecnificadas, correspondiendo el resto a un sistema tradicional o de traspatio. Aproximadamente el 80 % del rebaño ovino nacional pertenece a productores de escasos recursos con bajo nivel tecnológico y con muchas limitantes, mientras que el 95 % del inventario nacional está formado por ovino criollo (Hernández, 1996). El INEGI, en el Censo Agrícola, Ganadero y Forestal de 2007 reportó 53,338 unidades de producción ovina en México, de las cuales 34 % ofrecen alimento balanceado y sólo 13 % cuenta con asistencia técnica, de los 7,306,600 ovinos que el INEGI reportó para 2007, 63 % vive en terrenos de la vivienda, es decir, en un sistema productivo familiar.

3. Sistemas de producción de ovinos

La clasificación de los sistemas de producción agropecuaria en países en desarrollo, se basa en los siguientes criterios: 1) la base de recursos naturales disponible, 2) el patrón predominante de actividades agrícolas y formas de subsistencia de los hogares agropecuarios y 3) las principales tecnologías empleadas (Hall, 2001). Además, Sere y Steinfeld (1996) han definido tres principales sistemas de producción pecuaria: sistemas de pastoreo, mixtos e industriales; en los sistemas de pastoreo más del 90 % de la materia seca suministrada como alimento procede de pastos, pastizales y forrajes anuales, este sistema representa 9 % de la producción mundial de carne. En los sistemas

mixtos, los cultivos y la actividad ganadera están integrados en la misma unidad de producción; en estos sistemas se genera el mayor porcentaje total de carne (54 %) y leche (90 %) en el mundo y son los más utilizados en la agricultura en pequeña escala de numerosos países en desarrollo. Por último, en los sistemas pecuarios industriales los que los animales están separados de la tierra que constituye la base de suministro de alimentos y de eliminación de desechos; dichos sistemas dependen de suministros externos de alimento, energía y otros insumos y producen más del 50 % de la producción mundial de carne de cerdo y aves de corral y 10 % de la carne ovina y bovina. El exceso de nutrientes (nitrógeno y fósforo) debido a los importantes volúmenes de consumo de alimentos, puede generar problemas de eliminación de estiércol y supone un potencial riesgo de contaminación de mantos freáticos superficiales y de terrenos de cultivo.

Además, en México la producción ovina tiene características regionales. La región Norte del país basa su producción en razas especializadas productoras de carne y lana, bajo sistemas tecnificados. El ganado ovino en la región Centro es especializado en producción de carne y en su mayoría son cruces de razas de lana (Suffolk y Hampshire) y de pelo (Black belly, Pelibuey, entre otras), se efectúa de manera importante en zonas marginadas, en agostaderos y en terrenos agrícolas donde consumen los residuos de las cosechas. En la región Sur y Sur-Sureste con características tropicales se emplean generalmente razas de pelo; en el trópico, la mayoría de los ranchos se destinan a más de una actividad, es decir, se encuentran bajo un sistema agrosilvopastoril, en la cual los ovinos pastorean de manera conjunta con otras especies de ganado o cultivos agrícolas (Vilaboa *et al.*, 2006).

3.1. Sistemas de pastoreo

La temperatura, precipitación, radiación solar, la época del año y las características físicas y químicas del suelo condicionan el tipo, rendimiento y calidad de la vegetación, y esto a su vez modifica el aporte de nutrientes que serán utilizados por los ovinos para crecimiento, producción de carne, leche y

lana. De acuerdo con el tipo de vegetación, así como la tecnología empleada, se distinguen dos sistemas de pastoreo: en agostadero y tecnificado.

3.1.1. Pastoreo en agostadero

Los agostaderos son áreas con vegetación nativa, que incluye miembros de las familias *poaceae*, *compositae*, *fabaceae*, *leguminosae* y *cactaceae*, la calidad del forraje depende de su estado fenológico, variando el aporte de nutrientes con la época del año. La inversión de capital y mano de obra es reducida por superficie o por cabeza de ganado (González y Aguirre, 2005).

En un agostadero semiárido de Zacatecas, México; el aporte de proteína cruda (PC) fue 10.6 % en verano y 6.17 % en invierno, la variación de PC está asociada con la época de lluvias y el crecimiento vegetativo acelerado del pastizal; por lo tanto, para mantener un aporte apropiado de proteína durante el año, es necesario complementar durante la época de secas (Stanko, 2002). Además la baja disponibilidad y calidad del forraje en el invierno, aumenta el tiempo de pastoreo 6 a 8 h hasta 10 a 12h, hecho que repercute en la productividad del animal (Esqueda y Gutiérrez, 2009).

Aunado al problema que representa la estacionalidad, el sobrepastoreo de agostaderos es un punto de conflicto y es necesario determinar la capacidad de carga del agostadero, así cuando hay una condición de pastizal de buena a excelente será posible mantener una borrega de 50 kg en una superficie de entre 1.0 y 1.25 ha, pero cuando la condición sea regular en el pastizal se requerirá entre 1.5 y 1.75 ha. En los casos de pastizales en condición pobre se requerirán al menos 2.0 ha para poder sostener una borrega y podrá incluso requerirse una mayor superficie de acuerdo con el grado de deterioro del agostadero (Esqueda y Gutiérrez, 2009). La estacionalidad y baja carga animal representan una baja productividad y sostenibilidad del sistema debido a la poca tecnificación (González y Aguirre, 2005), por lo cual las alternativas para aumentar la producción y rentabilidad de este sistema recaen en la utilización de pastoreo rotacional, manejo adecuado de la carga animal y complementación de la alimentación en comedero.

3.1.2. Pastoreo tecnificado

Este pastoreo se desarrolla en áreas poco extensas, donde generalmente la vegetación está compuesta por especies introducidas, en una asociación de gramíneas con leguminosas. La carga animal es alta y el tiempo de ocupación es corto, por lo cual es necesario realizar un sistema de rotación de potreros. Lo anterior promueve el desarrollo regenerativo de la vegetación y el suelo, disminuye el desperdicio o subutilización del forraje y permite que el pastoreo se realice de manera adecuada en las etapas fenológicas del forraje, donde se optimice el aporte de nutrientes de acuerdo a los requerimientos de los ovinos por etapa productiva y de manera constante durante todo el año. Lo anterior hace a este sistema rentable y sustentable. La producción de forrajes no depende de la estacionalidad pues las praderas están generalmente bajo sistemas de riego y asimismo por el uso de especies perennes, como alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium spp*), pasto ovido (*Dactylis glomerata*) y ballico (*Lolium multiflorum*), principalmente (Partida *et al.*, 2013).

3.2. Sistemas industriales

La especialización de las unidades de producción ganaderas y la disminución de la superficie pastable por cambio en el destino productivo de la tierra, han impulsado a los ganaderos a mantener a los ovinos en confinamiento. En este sentido, para aumentar la producción, los ovinos son alojados en instalaciones acondicionadas de acuerdo con las necesidades fisiológicas, productivas y de manejo. Es común el uso de programas computarizados para la formulación de dietas y registros productivos, con los cuales se pueden predeterminedar los tiempos y costos de cada etapa productiva. Además hay acceso a asistencia médica y técnica especializada, y por lo tanto, manejos sanitarios integrales y técnicas de reproducción (sincronización de estros, inseminación artificial, etc.), que permiten tener grupos homogéneos en edad y etapa fisiológica.

En este sistema los ovinos, generalmente de razas especializadas, son alimentados a libre acceso con dietas formuladas para cubrir los requerimientos de nutrientes (de acuerdo a peso, edad, sexo). En el periodo de engorda, la base

de la alimentación son granos de cereales y subproductos energéticos y es frecuente el uso de modificadores del metabolismo (Partida *et al.*, 2013). Utiliza suministros externos, dependiendo así de las fluctuaciones del precio de ingredientes, medicamentos y otros insumos. Aunado al factor económico, otra desventaja es el manejo de desechos, principalmente del estiércol.

3.3. Sistemas mixtos

La producción se basa en una combinación del pastoreo con el confinamiento en corral, que se hace de acuerdo con los requerimientos alimenticios de los ovinos (Partida *et al.*, 2013); responden a la necesidad de complementar el consumo de nutrientes de animales en pastoreo. En algunas ocasiones se utilizan alimentos energéticos como granos de cereales o alimentos comerciales, aunque también es común el uso de henos, esquilmos, rastrojos, etc. y también un suplemento de minerales.

4. Fósforo

4.1 Importancia del fósforo en el organismo

Los minerales esenciales tienen una función importante en la alimentación animal, su disponibilidad y asimilación se refleja en el comportamiento productivo y en el contenido de estos minerales en heces. Las funciones del P son estructurales, como componente principal del tejido óseo. Entre 80 y 85 % del P presente en el organismo animal se localiza en los huesos como cristales de hidroxiapatita, fosfato cálcico y fosfato de magnesio; del 15 al 20 % restante, como P inorgánico en tejido muscular, nervioso y fluidos intra y extracelulares, particularmente en glóbulos rojos (Pizzani, 2005). El P se encuentra en la estructura de membranas celulares (fosfolípidos); interviene el metabolismo y transporte de lípidos, en el metabolismo energético, como adenosin trifosfato (ATP), adenosin difosfato (ADP), adenosin monofosfato (AMP) y fosfato creatina; en la síntesis de proteínas (como fosfato de ácidos nucleicos, ARN y ADN); en varios sistemas enzimáticos (cocarboxilasa, flavoproteínas, ADN) (Church y Pond, 1977); en el proceso de señalización celular (Hill *et al.*, 2008); mantiene la presión

osmótica y el equilibrio ácido básico en combinación con otros elementos (Pizzani, 2005).

Además, para los microorganismos ruminales el P es esencial para su desarrollo, es indispensable para el metabolismo bacteriano, se requiere para degradación de carbohidratos estructurales y para síntesis de proteína microbiana (Burroughs *et al.*, 1951, Durand *et al.*, 1987). Ramírez-Pérez y Meschy (2005), reportaron que la deficiencia de P en cultivos microbianos, altera los patrones de degradación (principalmente de la fibra), de fermentación (disminuyendo la utilización de N-NH₃ y la producción de AGV y gas); al mismo tiempo no permitió la síntesis de proteína microbiana.

4.2 Absorción del fósforo en el tubo digestivo

En rumiantes, la absorción de P se lleva a cabo en el intestino delgado, principalmente en yeyuno y está regulada por la acción de la vitamina D que aumenta la permeabilidad de la membrana, aumentando así la absorción del fosfato (Church y Pond, 1977). Respecto a la absorción de P en rumen, no existe información concisa, pero Yano *et al* (1991) observaron movimientos a través de la pared del rumen, sin embargo las cantidades fueron mínimas. La dinámica de absorción no ha sido posible determinarla pues la interacción de P dietario y P endógeno, proveniente de la saliva, impide hacer una estimación real de la absorción en rumen.

4.3 Aporte dietario de fósforo

Para cubrir el requerimiento de P en ovinos (0.16 a 0.38 %, según el NRC 2007), se toman en cuenta tres principales fuentes: animal, vegetal y mineral (geológico). De las fuentes de origen animal destacan las harinas de carne, de pescado y de plumas (Summers, 1997) y a pesar de ser un buen ingrediente tienen la desventaja que pueden significar un riesgo sanitario; mientras tanto, en las fuentes geológicas (fosfato diamónico, ortofosfato de calcio, fosfato dicálcico, etc) la disponibilidad del P depende de numerosos factores incluyendo la naturaleza de la roca inicial y el proceso de fabricación (De Blas *et al.*, 2010). Es

decir, a pesar que la digestibilidad de estos productos se ha calculado del 96 a 100 % en rumiantes, el coeficiente de absorción real sólo es 68 % (INRA 2007), aunado a lo anterior, es importante considerar los costos de estas fuentes minerales.

El valor nutricional del P vegetal depende de su porcentaje en P fítico y de la actividad fitásica endógena de la materia prima. A mayor contenido en fitatos y menor actividad de las fitasas endógenas, menor es la disponibilidad del P. El contenido en P fítico es superior en granos de cereales y semillas de leguminosas y representa aproximadamente 50 a 80% del P total del grano (De Blas *et al.*, 2010).

Aunque no se ha establecido un valor de requerimiento de P para los microorganismos ruminales, Ramírez-Pérez y Meschy (2005) calcularon que se requieren 4.3 g de P por kg de materia orgánica fermentable en rumen (MOFR) para la síntesis de proteína microbiana y 6.9 g de P por kg MOFR para la celulólisis, siendo la saliva la principal fuente endógena de P para el medio ruminal. Mientras que el aporte dietario del P depende de la alimentación del huésped, las bacterias ruminales pueden hidrolizar hasta 90 % del fitato en la dieta, siempre que la proporción de ácido fítico sea menor a 50 % del total del P en la dieta.

4.4 Ácido fítico

El contenido de P en granos de cereales y oleaginosas es alto (0.27 a 0.37 %) pero con baja biodisponibilidad para no rumiantes porque de 50 a 80 % del P del grano está combinado con inositol y algunos cationes, formando la molécula de fitato (myo-inositol hexaquisfosfato (IP-6)); de 20 a 30 % forma compuestos como fosfolípidos, fosfoproteínas y ácidos nucleicos y 8 a 12 % está como fosfatos inorgánicos (Hernández *et al.*, 2006).

El ácido fítico es la principal forma de almacenamiento de P y glúcidos en semillas de cereales y oleaginosas, además puede estar ligado a proteínas, almidón y diversos minerales, (Godoy y Chicco, 2005; Hernández *et al.*, 2006). El ácido fítico puede establecer fuertes uniones iónicas con minerales esenciales

formando quelatos insolubles que no pueden ser absorbidos por el organismo (Hurrell *et al.*, 1992); los radicales de ácido fosfórico, presentes en la molécula de ácido fítico, tiene afinidad por cationes de hierro (Fe), calcio (Ca), cobre (Cu), zinc (Zn) (Méndez, 1998). Una molécula de ácido fítico puede unir de 3 a 6 moles de Ca, haciendo no disponibles al P y Ca (Godoy y Chico 2005).

4.5 Efecto ambiental del fósforo excretado

La problemática que representa la necesidad de cubrir los requerimientos de P en ovinos radica en el riesgo sanitario de las fuentes animales, la baja biodisponibilidad del mineral en las fuentes vegetales; además, el P no biodisponible consumido por el animal es excretado en heces y orina, estos residuos se depositan en el suelo y son lavados y drenados por acción del agua de lluvia contaminando mantos freáticos, arroyos, lagos, ríos y océanos. Aunque si bien el exceso de P no impacta directamente a la salud humana, sí afecta a los ecosistemas acuáticos, poniendo en riesgo el equilibrio ecológico (Ramírez-Pérez y Meschy, 2005) pues estimula el crecimiento de algas, las cuales utilizan el oxígeno, deprimiendo la vida acuática y ocasionando la morbilidad de los peces de estos hábitats (Vallardi *et al.*, 2002; Hatten *et al.*, 2001; Kies *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2008). El P disponible para las plantas acuáticas se considera frecuentemente el factor clave que contribuye a la eutrofización acelerada de las aguas superficiales (Pote, 2000).

La reducción de P en la dieta reduce la excreción del elemento en heces y orina, lo que puede contribuir a la disminución de la contaminación ambiental, sin embargo, la deficiencia de este mineral es la causa de bajos índices productivos, así que una alternativa viable es aumentar la biodisponibilidad del P en fuentes vegetales.

5. Fitasas

Las fitasas (mio-inositol hexofosfatohidrolasas) son enzimas con actividad fosfomonoesterasa capaces de hidrolizar el ácido fítico para producir ortofosfato inorgánico y ésteres fosfóricos (de inositol pentafofato a inositol monofosfato, así

como productos intermediarios) liberando finalmente mio-inositol (Frontela *et al.*, 2008).

Existen diferentes criterios para la clasificación de las fitasas; basados en su pH óptimo, las fitasas se clasifican en fitasas ácidas y alcalinas (Frontela *et al.*, 2008). Además, si se tiene en cuenta la posición del carbono del anillo de mio-inositol en la molécula de fitato por el cual la fitasa comienza el proceso de desfosforilación, se clasifican en 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) y 5-fitasa (E.C. 3.1.3.72) (Durand *et al.*, 1987).

La fitasa está ampliamente distribuida en plantas y microorganismos, especialmente hongos, en organismos superiores se encuentra en cantidades insignificantes en el tubo intestinal. Las fitasas provenientes de microorganismos se encuentran aquellas procedentes de hongos (*Aspergillus sp*), levaduras (*Saccharomyces* y *Peniophora*) y bacterias (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*). Estas fitasas siguen un cierto orden para la hidrólisis de la molécula de fitato, es decir, después de ser liberado el grupo fosfato de la posición 3 de la molécula, continúa en el siguiente orden, 4, 5, 6 y 2; la temperatura óptima de estas enzimas se encuentra entre 60 y 70 °C, y presentan una actividad en general elevada siendo de un mínimo de 5000 unidades fitasa (FTU) g⁻¹ y pH óptimo de 2 a 5.5 (Ekelund *et al.*, 2003), aunque existen variaciones según el microorganismo del cual procedan. La actividad fitásica se mide en unidades fitasa, definidas como la cantidad de fitasa que libera 1 µmol de fosfato inorgánico a partir de una disolución 1 mM de fitato de sodio por minuto a un pH de 5.5 y temperatura de 37 °C.

Las fitasas vegetales, debido a su baja estabilidad y al estrecho intervalo de actividad de pH, son rápidamente inactivadas en el tubo digestivo de no rumiantes, y su eficacia *in vivo* es baja. Por el contrario, algunas fitasas microbianas tienen amplia estabilidad al pH y amplio intervalo de actividad-pH, por lo que el fitato puede ser hidrolizado más eficazmente en el tubo digestivo. La actividad fitásica en ingredientes comunes, expresada en U kg⁻¹, es para 1200 trigo, 2700 centeno, 1100 triticale, 580 cebada, 120 arroz, 12 maíz, 24 sorgo, 31 soya y 42 avena (Eeckhout y De Paepe, 1994).

En rumiantes, la población microbiana ruminal sintetiza fitasa, cataliza la liberación de grupos fosfato, a partir de ácido fítico (Hill *et al*, 2008). Yanke *et al* (1998) determinaron la actividad fitásica de algunos cultivos puros de bacterias ruminales, encontrando que la mayor actividad de la enzima se encuentra en *Selenomonas ruminantium* (125 U ml⁻¹ de actividad fitásica), *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Mitsuokella multiacidus*, *Treponema spp*. El incremento en la actividad fitásica responde a niveles altos de fitato presentes en granos de cereales, comparado con el contenido en forrajes (Reddy *et al.*, 1982).

Es probable que la actividad fitásica aumente al incrementar el fitato de la dieta, pero disminuye al aumentar el P inorgánico liberado de las moléculas del ácido fítico (Godoy y Meschy, 2001). Esta disminución se puede deber al efecto de la inhibición por la saturación del P libre sobre la actividad de la enzima (Raun *et al.*, 1956). En contraste, Yanke *et al* (1998) aseveran que la inhibición de la actividad fitásica de las bacterias por fosfato parece poco probable debido a la concentración alta de fosfato libre que se encuentra normalmente en el rumen.

5.1. Uso de fitasa exógena en alimentación de no rumiantes

La fitasa utilizada como aditivo en la alimentación de cerdos y aves, hidroliza los grupos fosfato del fitato y aumenta la disponibilidad de P (Kies *et al.*, 2005) y de otros nutrimentos ligados al ácido fítico (Vallardi *et al.*, 2002). Se ha mostrado que la digestibilidad de aminoácidos (AA) incrementa con la adición de fitasa (Kies *et al.*, 2001); además mejora la retención y utilización de algunos minerales esenciales, como Zn Ca, N debido a que son liberados del complejo de P fítico (Hatten *et al.*, 2001), aumenta la utilización de P en pollos de engorda y gallinas de postura, además de reducir la excreción de P.

La adición de fitasa en la dieta mejoró la conversión alimenticia y porcentaje de postura en gallinas alimentadas con dietas deficientes en P disponible; por lo tanto, no fue necesaria la adición de P inorgánico. La fitasa puede sustituir 0.1 % del P inorgánico de la ración debido a que es capaz de liberar el P presente en forma de P fítico (Vallardi, *et al.*, 2002; Kies *et al.*, 2005).

La inclusión de fitasa microbiana en la dieta de no rumiantes aumenta la disponibilidad de P a partir de fitato, así como la absorción de cationes (minerales), proteínas y AA (van Doorn *et al.*, 2004). Johnston *et al* (2004), al adicionar fitasa y reducir Ca y P en dietas para cerdos, observaron un aumento en la digestibilidad de AA y energía; además, la inclusión de fitasa en dietas disminuye los requerimientos de AA y energía.

5.2. Uso de fitasa exógena en alimentación de rumiantes

Los rumiantes utilizan el P por la hidrólisis enzimática, causada por las fitasas producidas por los microorganismos del rumen y en menor proporción, por las fitasas propias de las fuentes de origen vegetal. La capacidad de los microorganismos para hidrolizar el P fítico fue confirmada *in vitro* con más del 90 % del P total hidrolizado (Morse *et al.*, 1992).

La utilización de dietas con aproximadamente el 50 % del P fítico, se hidroliza más del 90 % por los microorganismos del rumen. Sin embargo, cuando se utilizan dietas con altas concentraciones de fitatos (más del 70 %), la actividad fitásica de los microorganismos ruminales es limitante para degradar todo el fitato, probablemente debido a la saturación de su capacidad para hidrolizar el sustrato (Godoy y Meschy, 2000).

Aunque existe poca información sobre el uso de fitasas en rumiantes, la utilización de enzimas exógenas en otros sustratos ha mostrado que bajo ciertas condiciones pueden ser útiles, por lo que su uso potencial no debe descartarse (Buendía 2009a). Así, se ha establecido relaciones entre la adición de fitasa y la disminución de P geológico en la ración, sin tener diferencias en variables productivas, pero sí en la excreción de P (Hankis-Herr *et al.*, 2009). El efecto de la enzima sobre índices productivos no es consistente.

6. Hipótesis

La adición de fitasa en dietas para borregos mejora la eficiencia de liberación de P a partir de ácido fítico y a mayor biodisponibilidad de P, mejor aprovechamiento por las bacterias ruminales, que se reflejará mejorando las variables de fermentación y degradación ruminal, así como disminuir la presencia del elemento en heces.

7. Objetivo

Evaluar el efecto de una fitasa exógena sobre las variables de degradación, fermentación y microbiológicas ruminales *in vitro* e *in situ* en borregos.

8. Materiales y Métodos

8.1 Localización

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Nutrición Animal, en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, así como la Unidad Metabólica de ovinos, del Programa de Ganadería, Recursos Genéticos y Productividad en el Colegio de Postgraduados, carretera Los Reyes-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Estado de México.

La determinación de P en muestras de heces, líquido ruminal, orina y suero se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENIDFyMA), del INIFAP, km 1 carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro de Arteaga.

8.2 Prueba *in vitro*

Para determinar cambios en pH, liberación de N-NH₃, producción de AGV y liberación de P en el medio, fue realizada la primera fase de la técnica de Tilley y Terry (1963): el inóculo fue tomado de dos borregos Suffolk (peso vivo 95 ± 1 kg

PV) con cánula ruminal alimentados *ad libitum* con una dieta concentrado:forraje 70:30, durante 15 d. Se realizó una mezcla de saliva de McDougall, pH 6.8, y líquido ruminal (4:1), 50 mL se colocaron en tubos de polipropileno (100 mL) con tapones y válvulas de Bunsen, que contenían 0.5 g de las dietas (Cuadro 1); CO₂ fue agregado a cada tubo, que fue tapado para mezclar su contenido, colocado en un baño maria a 38°C, e incubado por 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h; por duplicado, repetido cinco veces en el tiempo.

De muestras de las dietas se pesaron 0.5 g y se colocaron en bolsas F57 de ANKOM[®] technologies, las cuales fueron incubadas en frascos de vidrio de acuerdo con la técnica de producción de gas descrita por Herrera (2013) por 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h; por duplicado, repetido cinco veces en el tiempo. Al finalizar cada periodo de tiempo, se midió por desplazamiento de líquido la producción de gas y la degradación de materia seca.

8.3 Prueba *in situ*

En esta prueba se utilizaron 6 borregos criollos (39 kg \pm 2PV) alimentados y alojados en jaulas individuales elevadas. Los borregos, con una cánula en rumen y duodeno, recibieron las dietas experimentales. Se obtuvieron muestras de líquido del rumen y duodeno (3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h después de la alimentación) para determinar los cambios en pH y N-NH₃ (Broderick y Kang, 1980), P y producción de AGV. El total de orina y heces se recolectaron para determinar la concentración de P. Los días cuatro de cada periodo se tomaron muestras de sangre, por punción en vena yugular, para determinar P en plasma.

El consumo diario de alimento fue medido y se evaluó digestibilidad aparente. En muestras de la dieta y heces se determinó la materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas (AOAC, 2003) y P según Fiske y Subbarow (1925).

8.4 Análisis estadístico

Los datos de la prueba *in vitro* se asignaron a un modelo de bloques al azar repetidos en el tiempo, estos datos fueron analizados con el procedimiento GLM (SAS, 1997) y las medias se compararon con la prueba de Tukey (P \leq 0.05) (Steel y Torrie, 1996).

El modelo estadístico para estas variables fue el siguiente;

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad i=1,2,\dots,t \quad j= 1, 2, \dots, t$$

Dónde:

Y_{ijk} = variable respuesta en tratamiento i , repetición j .

μ = media general

τ_i = efecto de tratamiento

β_j = efecto del bloque

ε_{ij} = error aleatorio

Para la prueba *in situ* se utilizó el diseño de cuadro latino 3 x 3 repetido. Los datos fueron analizados con el procedimiento GLM (SAS, 2009) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1996). El modelo estadístico fue el siguiente;

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + H_j + C_{k:l} + t_{(l)} + \varepsilon_{ijkl} \quad i=1,2,\dots,t \quad j= 1, 2, \dots, t \quad k=1, 2, \dots, t$$

Dónde:

Y_{ijk} = variable de respuesta en fila i , columna j , tratamiento k

μ = media general

S_i = efecto de la fila i

H_j = efecto de la columna j

$C_{k:l}$ = efecto del tratamiento l anidado en el cuadro k

T_l = efecto del tratamiento l

ε_{ijkl} = error aleatorio

9. Resultados y Discusión

La composición de las dietas experimentales y sus valores nutricionales se muestran en el Cuadro 1 y se aprecia que no hubo diferencias en los valores de MS, MO, FDA, FDN y P. El aporte de P se encuentra en el intervalo óptimo según lo sugerido por el NRC (2007), es decir entre 0.16 y 0.38 % para borregos en crecimiento.

Cuadro 1. Composición (%) de las dietas experimentales.

Ingredientes	g fitasa ¹ t ⁻¹		
	0	540	720
Grano de sorgo molido	70.00	70.00	70.00
Gluten de maíz	16.90	16.90	16.90
Alfalfa henificada	12.00	12.00	12.00
Carbonato de calcio	1.10	1.10	1.10
Composición química ² (%)			
Materia seca	93.72	93.75	93.76
Materia orgánica	96.25	96.42	96.89
Proteína cruda	18.28	18.28	18.27
FDN ³	19.84	19.83	19.84
FDA ⁴	8.78	8.78	8.79
Cenizas	3.45	3.71	3.65
Calcio	0.64	0.64	0.64
Fósforo	0.31	0.31	0.31
Fósforo fítico	0.21	0.21	0.21

No existen diferencias ($P>0.05$); ¹Ronozyme-HiPhos[®] DSM Nutritional Products (5000 FTU g⁻¹); 540 g fitasa t⁻¹ = 2 700 000 FTU; 720 g fitasa t⁻¹ = 3 600 000 FTU. ²Análisis realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal, Colegio de Postgraduados, Montecillo. ³FDN: Fibra Detergente Neutro. ⁴FDA. Fibra Detergente Ácido

El contenido de P fítico en las dietas corresponde al 67.74 % del total del P, de acuerdo con Ramírez-Pérez y Meschy (2005) cuando el P fítico presente en la ración supera el 50 % del total, disminuye la capacidad para hidrolizar el fitato, por los microorganismos ruminales.

La hidrólisis del fitato puede no ser tan eficiente en las nuevas formas de alimentación con dietas ricas en granos de cereales, y además las diferentes sales de ácido fítico encontradas en los ingredientes, como el fitato de sodio contenido en el maíz o el fitato de calcio de la harinolina, pueden no ser hidrolizadas con la misma eficiencia por los microorganismos ruminales (Godoy y Meschy, 2001). Aunado a lo anterior, las dietas altas en concentrado reducen el tiempo de retención del bolo alimenticio lo que puede también disminuir la hidrólisis de los fitatos en el rumen (Sauvant *et al.*, 1999). Para este estudio, se combinan ambas condiciones, porcentaje alto de P fítico y bajo para fibra, es decir, se presume una alta tasa de pasaje.

9. 1 Resultados *in vitro*

No hubo diferencias en los valores de DIVMS en ninguno de los horarios (Cuadro 2). Aunque no existen datos respecto al efecto de la enzima en la degradación de materia seca, se supone que al existir mayor cantidad de P libre en el medio, los microorganismos ruminales pueden aprovecharlo para adaptarlo a su sistema metabólico, es decir, mejoraría la fermentación de la fibra (Durand *et al.*, 1983). Los datos encontrados para el presente estudio contrastan con otro en el que se ha utilizado la misma proporción de grano de sorgo (70 %) y reportan DIVMS a la hora 6 de 47.05 % y a las 48 h de 85.95 % (Buendía *et al.*, 2003), en este contexto, a pesar de ser una dieta rica en carbohidratos, la DIVMS fue baja, probablemente debido a estar en un sistema aislado, sin los mecanismos de regulación de pH y concentración de N-NH₃, que pueden ser dañinos para los microorganismos ruminales. Sin embargo, Buendía (2009a) al evaluar dietas con 70% de sorgo y dosis crecientes de fitasa (0, 150, 300 y 450 g fitasa t⁻¹) reportó

valores de DIVMS de 12% a las 3 h y 70% a las 48 h, pero sin efecto de la enzima sobre esta variable.

En cuanto a la producción acumulada de gas (Cuadro 3), no se observan diferencias ($P>0.05$) en ningún horario de muestreo; la producción de gas en las primeras horas tiene un comportamiento exponencial, que va de acuerdo con la rápida fermentación de carbohidratos en las primeras horas de incubación.

Cuadro 2. Degradación de materia seca *in vitro*

Tratamiento	Horario de incubación (horas)					
	3	6	9	12	24	48
0 g fitasa t ⁻¹	24.36	30.62	37.96	41.29	51.88	65.23
540 g fitasa t ⁻¹	24.06	33.58	38.16	43.74	56.29	64.55
720 g fitasa t ⁻¹	24.65	31.37	36.33	42.14	55.47	62.95

No existen diferencias ($P>0.05$)

Los valores obtenidos de producción de gas son inferiores a los reportados por Herrera (2013) para dietas con alto contenido energético (ingrediente base semilla de girasol) él observó una producción de 260 mL de gas a las 24 h., valor que representa casi el doble de lo reportado en esta investigación. Además Nasser *et al* (2010) evaluaron diferentes niveles de P en concentrado, heno y heno + concentrado y señalan que la adición de P al sustrato incrementa la producción de gas y la fermentación de concentrados genera mayor cantidad de gas en las primeras horas de incubación (valores a las 12 h de 35.18 mL 200 mg⁻¹ MS de concentrado – 8.18 mL 200 mg⁻¹ MS de heno, ambos con la adición de 1 g de P). En investigaciones *in vitro* dónde se han llevado a cabo incubaciones con inóculos deficientes en P y S, el metabolismo de las bacterias metanogénicas no fue afectado, probablemente, porque los requerimientos de estos minerales son menores que para bacterias celulolíticas por lo cual, aunque la producción de gas no sea diferente, la proporción de metano aumenta en medios deficientes en P (Durand *et al.*, 1987).

Cuadro 3. Producción acumulada de gas (mL) por gramo de muestra (MS) *in vitro*

Tratamiento	Horario de incubación (horas)					
	3	6	9	12	24	48
0 g fitasa t ⁻¹	25.65	59.39	106.01	99.83	146.10	205.74
540 g fitasa t ⁻¹	25.05	58.88	107.83	113.33	163.28	213.53
720 g fitasa t ⁻¹	28.13	59.79	96.61	99.37	160.65	210.13

No existen diferencias (P>0.05)

No se observaron diferencias (P>0.05) en valores de pH (Cuadro 4) y a pesar de tener un inóculo con pH de 6.2, el pH inicial de los medios fue de 7.0, y los componentes del medio de incubación regularon el descenso en los valores de pH, está condición, si bien favorece que las bacterias ruminales sobrevivan en un sistema *in vitro* hasta las 48 h deseadas, no permite un comportamiento normal en el caso de una dieta alta en concentrado, como la evaluada en esta investigación, no se apreció el efecto del grano y, sobre todo, la acción de la enzima, pues se ha mostrado que el intervalo de pH donde la fitasa tiene mejor comportamiento es de 2 a 5 (Kim *et al.*, 2006), estos valores pudieron haber limitado la actividad fitásica.

Cuadro 4. pH del medio de incubación

Tratamiento	Horario de incubación (horas)					
	3	6	9	12	24	48
0 g fitasa t ⁻¹	7.01	6.86	6.77	6.76	6.75	6.92
540 g fitasa t ⁻¹	7.01	6.89	6.81	6.76	6.74	6.95
720 g fitasa t ⁻¹	7.02	6.89	6.80	6.76	6.75	6.94

No existen diferencias (P>0.05)

Durand *et al* (1983) reportan que al adicionar 10 mg de P por cada 100 mL de inóculo que tenía una concentración inicial de 7 mg de P, o bien cuando las dietas

eran deficientes en el elemento, se favoreció la utilización de N-NH₃ en 15 % y la producción de AGV en 5 %; el incremento de P favorece al metabolismo microbiano que se ha reflejado como mejoras en producción de AGV y gas (Durand *et al.*, 1983); por el contrario, la deficiencia de P reduce la síntesis proteica hasta 45 % (Komisarczuk *et al.*, 1987), reduce la población de protozoarios y la producción de AGV. Estos cambios son asociados a un incremento en el pH (de 6.5 a 7.1) y una acumulación de N-NH₃ (de 9mmol a 15-20 mmol L⁻¹) (Komisarczuk, 1985).

Es probable que el pH del medio reportado en esta investigación haya afectado negativamente no sólo a la fitasa exógena, si no a la actividad fitásica de los microorganismos ruminales, pues se ha documentado que las bacterias que tienen en su metabolismo fitasa, actúan en niveles de pH cercanos a 6; al no haber condiciones óptimas para la actividad fitasica (exógena y microbiana), se alteró el metabolismo normal de las bacterias ruminales. No hubo diferencias significativas (P>0.05) en los valores de concentración de N-NH₃ (Cuadro 5) y AGV (Cuadro 7).

Cuadro 5. Concentración de nitrógeno amoniacal (mg N dL⁻¹) *in vitro*

Tratamiento	Horario de incubación (horas)					
	3	6	9	12	24	48
0 g fitasa t ⁻¹	33.36	37.73	35.51	35.82	38.79	49.67
540 g fitasa t ⁻¹	34.99	35.74	37.42	38.95	39.98	51.84
720 g fitasa t ⁻¹	35.27	36.16	37.67	38.43	39.97	53.34

No existen diferencias (P>0.05)

La adición de fitasa en la dieta no afectó la liberación de N-NH₃, en incubaciones *in vitro* al no existir los mecanismos de regulación, como absorción, no se aprecia la dinámica de utilización de N. El aumento de N como N-NH₃ puede producir toxicidad para los microorganismos ruminales. En cuanto a la producción de AGV tampoco se observan diferencias significativas.

Cuadro 6. Fósforo (mg dL⁻¹) en medio de incubación

Tratamiento	Horario de incubación (horas)					
	3	6	9	12	24	48
0 g fitasa t ⁻¹	52.75	52.61	52.87	52.30	52.61	52.95
540 g fitasa t ⁻¹	54.28	52.57	52.00	52.94	52.68	52.42
720 g fitasa t ⁻¹	53.68	52.87	52.44	53.03	52.79	53.31

No existen diferencias (P>0.05)

Las necesidades de P para los microorganismos *in vitro* son variables y se sitúan con más frecuencia entre 0.2 y 0.1 g de P por L de medio de incubación (Ramírez-Pérez y Meschy, 2005). Según Komisarczuk y Durand (1991) se requiere menor cantidad de P para la fermentación de hemicelulosa y almidón respecto a la fermentación de celulosa. El P presente en el medio de incubación superó los requerimientos mencionados (Cuadro 6) y no se observan diferencias en concentración entre tratamientos ni entre horarios. El medio utilizado (Tilley y Terry, 1963) contiene una cantidad importante de fosfatos, por lo que no es posible observar diferencias sin tener como referencia el medio sin inóculo.

Cuadro 7. Producción de ácidos grasos volátiles *in vitro*

Tratamiento	Horario de incubación (horas)					
	3	6	9	12	24	48
mMol de AGV por g de sustrato						
0 g fitasa t ⁻¹	79.68	85.88	94.66	102.82	110.62	116.78
540 g fitasa t ⁻¹	84.58	92.72	94.80	96.85	107.97	129.05
720 g fitasa t ⁻¹	83.04	89.38	95.18	97.57	119.16	133.61
Ácido acético (%)						
0 g fitasa t ⁻¹	77.10	75.18	72.47	71.02	70.87	73.80
540 g fitasa t ⁻¹	75.43	75.16	72.95	71.11	71.53	71.60
720 g fitasa t ⁻¹	75.07	75.38	72.86	71.00	72.30	71.82
Ácido propiónico (%)						
0 g fitasa t ⁻¹	16.39	17.77	19.56	20.23	20.37	17.49
540 g fitasa t ⁻¹	17.59	17.76	19.06	19.74	19.44	18.42
720 g fitasa t ⁻¹	17.87	17.67	19.06	20.32	18.49	18.62
Ácido butírico (%)						
0 g fitasa t ⁻¹	6.50	7.04	7.96	8.73	8.75	8.69
540 g fitasa t ⁻¹	6.97	7.06	7.98	9.14	9.01	9.97
720 g fitasa t ⁻¹	7.04	6.93	8.07	8.67	9.19	9.55
Relación acético-propiónico						
0 g fitasa t ⁻¹	4.85 :1	4.33 :1	3.82 :1	3.59 :1	3.61 :1	4.43 :1
540 g fitasa t ⁻¹	4.40 :1	4.33 :1	3.90 :1	3.70 :1	3.78 :1	3.99 :1
720 g fitasa t ⁻¹	4.31 :1	4.39 :1	3.89 :1	3.57 :1	4.02 :1	3.94 :1
Eficiencia de la fermentación (%)^a						
0 g fitasa t ⁻¹	43.29	49.18	58.78	65.81	65.97	58.85
540 g fitasa t ⁻¹	48.40	49.29	58.12	66.52	65.44	67.93
720 g fitasa t ⁻¹	49.49	48.20	58.68	65.49	63.99	66.36

No existen diferencias (P>0.05); ^aEficiencia de la fermentación = ((0.62 acetato)(1.09 propionato)(0.78 butirato)) / (acetato + propionato + butirato).

9.2 Resultados *in situ*

Se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) en el consumo de materia seca (Cuadro 8) y de acuerdo con Underwood y Suttle (1999), si el contenido de P en el rumen disminuye, la actividad microbiana se reduce y esto provoca una reducción en el consumo de alimento y en la producción animal. Valk y Sebek (1999) observaron bajas en la producción de leche cuando alimentaron con dietas con $2.4 \text{ g P kg}^{-1} \text{ MS}$ a vacas lechera durante un periodo prolongado. En este entendido, según los datos observados, se puede inferir que aumentó el P disponible y, aunque, no se observan diferencias significativas, la digestibilidad aparente fue mayor en dietas con alto contenido de fitasa exógena.

Cuadro 8. Consumo y excreción de materia seca

Tratamiento	CMS (g d^{-1})	Excreción de MS (g d^{-1})	D.A. ¹ de la MS (%)
0 g fitasa t^{-1}	1053.32 ab	197.30	81.33
540 g fitasa t^{-1}	988.70 b	184.36	82.90
720 g fitasa t^{-1}	1141.32 a	172.52	83.75

¹Digestibilidad aparente. ^{a,b}Medias en una columna con diferente literal, son diferentes, ($P < 0.05$)

En rumiantes, la inclusión de la enzima en la dieta se ha investigado poco y los resultados en variables productivas son inconstantes. Así Buendía (2009a) observó diferencias en el CMS (1011b , 1258a , 1106b y $1167\text{b} \text{ g d}^{-1}$) de borregos alimentados con dosis crecientes de fitasa (0, 150, 300, 450 g fitasa t^{-1}); mientras que en otras investigaciones del mismo autor donde evaluó la adición de dosis de fitasa en dietas altas en concentrado (70%) no se observaron diferencias (Buendía *et al.*, 2007; Buendía 2009a; Buendía *et al.*, 2009b Buendía *et al.*, 2010;). De la misma manera, Knowlton *et al* (2005), no reporta modificación en el CMS de vacas alimentadas con diferentes niveles de P (alto y bajo) y combinación de P bajo + fitasa. Hankis-Herr *et al* (2009) adicionaron 600 UFT kg^{-1} a dietas de novillos y no detectaron diferencias en el consumo. Hurley *et al* (2002), usaron 200 y 400 UFT kg^{-1} de dietas para novillos, sin observar diferencias. Es probable que la dosis de enzima haya sido inferior del requerimiento, considerando que los microorganismos ruminales pueden sintetizar hasta 125 UFT mL^{-1} .

Cuadro 9. Producción de ácidos grasos volátiles *in situ*.

Tratamiento	Horas después de la comida						
	3	6	9	12	24	48	72
AGV totales (mMol)							
0 g fitasa t ⁻¹	76.13	64.78	78.65	91.95	70.09	72.20	76.17
540 g fitasa t ⁻¹	75.60	69.45	77.40	100.47	77.41	93.21	78.34
720 g fitasa t ⁻¹	64.79	77.01	78.89	98.85	81.02	80.40	78.58
Ácido acético (%)							
0 g fitasa t ⁻¹	35.71	36.89	33.65	32.67	33.12	31.15	34.96
540 g fitasa t ⁻¹	32.46	33.11	34.66	33.57	33.84	37.56	34.60
720 g fitasa t ⁻¹	33.46	35.05	34.75	33.07	32.51	32.15	32.41
Ácido propiónico (%)							
0 g fitasa t ⁻¹	47.51	46.42	48.05	47.65	48.37	44.81	42.23
540 g fitasa t ⁻¹	52.02	52.06	49.46	48.23	48.99	45.13	45.08
720 g fitasa t ⁻¹	47.51	50.02	47.85	47.88	52.74	50.29	47.43
Ácido butírico (%)							
0 g fitasa t ⁻¹	16.76	18.72	18.51	21.20	22.31	21.83	23.10
540 g fitasa t ⁻¹	15.58	15.77	17.72	20.96	19.81	22.77	23.18
720 g fitasa t ⁻¹	17.63	18.48	19.36	22.46	16.51	17.59	20.58
Relación acético-propiónico							
0 g fitasa t ⁻¹	0.75:1	0.79:1	0.70:1	0.68:1	0.68:1	0.69:1	0.82:1
540 g fitasa t ⁻¹	0.62:1	0.63:1	0.70:1	0.69:1	0.69:1	0.83:1	0.76:1
720 g fitasa t ⁻¹	0.70:1	0.70:1	0.72:1	0.69:1	0.61:1	0.63:1	0.68:1

No existen diferencias (P>0.05)

En relación con la producción de AGV, no hubo diferencias significativas (P>0.05) (Cuadro 9). La fermentación de dietas con alto contenido de concentrado, favorece a la producción de ácido propiónico, la rápida fermentación reduce el pH (Cuadro 11) y fomenta la producción de ácido láctico (Cobos *et al.*, 2005). Sin embargo, algunas bacterias ruminales, tienen en su metabolismo diferentes rutas para la síntesis de ácido. propiónico y la predominante se lleva a

cabo con la formación de oxaloacetato y succinato, mientras que la segunda vía requiere la formación del acrilato y se presenta cuando la ración es deficiente en azufre o alta en concentrados quizá, debido a un cambio en la población bacteriana; se conoce como ruta del acrilato y consiste en la síntesis de propionato a partir de lactato (Prabuh *et al.*, 2012); el cambio en la población bacteriana se debe al tipo de sustrato, es decir, aumentan las bacterias amilolíticas y disminuyen las fibrolíticas.

La ruta del acrilato se ha identificado en *Bacteroides ruminicola* (ahora *Prevotella ruminicola*) (Wallnöfer y Baldwin, 1967), *Megasphaera elsdenii* (Counotte *et al.*, 1981; Prabuh *et al.*, 2012) y *Clostridium propionicum* (Prabuh *et al.*, 2012). Las dos primeras bacterias fueron estudiadas por Yanke *et al.* (1998) para determinar su actividad fitásica, situándose entre 5 – 125 U de fitasa mL⁻¹ y son de las primeras tres bacterias con mayor actividad fitásica, sólo después de *Selenomonas ruminantium*.

Es probable que al ofrecer como sustrato una dieta rica en carbohidratos altamente disponibles y en ácido fólico, la población bacteriana que proliferó fue la que tenía las enzimas y las rutas necesarias para optimizar el uso de estos nutrientes.

La concentración de N-NH₃ se ubicó dentro de los niveles óptimos para líquido ruminal (8-10 mg N 100 mL⁻¹) y no se observan diferencias entre tratamientos, en líquido ruminal y duodenal (Cuadro 10). Entendiendo que el NH₄ se encuentra en equilibrio con su forma amoniacal NH₃ según la ecuación $\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}^+$, y dado que el pKa de esta reacción es 9.3, la forma predominante a pH igual o menos a 6.5 es NH₄, la disminución del pH del rumen detiene el paso del amonio a la sangre, lo cual es benéfico para las bacterias que disponen de más tiempo para aprovecharlo. No hay reportes que indiquen alguna interacción de la actividad fitásica y la concentración de N-NH₃, sin embargo, a mayor disponibilidad de P, incrementa la síntesis de proteína microbiana, pero el pH bajo retiene el NH₄ en el rumen, entonces se esperan valores mayores de proteína microbiana disponible para el huésped.

Cuadro 10. Concentración de N-NH₃ (mg N dL⁻¹) en rumen y duodeno

Tratamiento	Horas después de la comida						
	3	6	9	12	24	48	72
Líquido ruminal							
0 g fitasa t ⁻¹	9.78	9.74	8.09	9.62	5.54	8.18	8.78
540 g fitasa t ⁻¹	8.55	9.65	8.00	6.39	5.39	8.50	9.20
720 g fitasa t ⁻¹	9.31	8.62	7.86	8.48	6.77	8.65	7.98
Líquido duodenal							
0 g fitasa t ⁻¹	9.64	9.70	11.73	12.62	12.28	13.37	15.66
540 g fitasa t ⁻¹	9.64	10.74	12.05	12.55	13.18	13.79	16.53
720 g fitasa t ⁻¹	10.69	10.63	10.94	12.59	13.37	14.58	13.73

No existen diferencias (P>0.05)

No se observan diferencias en los valores de pH y los niveles más bajos se encuentran en las primeras horas postprandial. Kim *et al* (2006) evaluaron una fitasa proveniente de *Aspergillus niger* y algunas cepas mutadas para producción de esta enzima y observaron que para actividad fitásica el pH óptimo fue igual o menor a 5.5. En esta investigación, los valores en las primeras horas postprandial se ubicaron entre 5.14 y 5.81, es decir, las condiciones fueron óptimas para la actividad enzimática.

Cuadro 11. pH de líquido ruminal

Tratamiento	Horas después de la comida						
	3	6	9	12	24	48	72
0 g fitasa t ⁻¹	5.57	5.81	5.69	5.22	6.04	6.41	6.05
540 g fitasa t ⁻¹	5.64	5.46	5.43	5.27	5.76	5.95	6.15
720 g fitasa t ⁻¹	5.59	5.56	5.51	5.14	5.92	6.36	6.22

No existen diferencias (P>0.05)

La concentración de P en líquido ruminal (Cuadro 12) supera los requerimientos para microorganismo mencionados anteriormente y es difícil determinar el efecto de la enzima, pues una proporción es debido al reciclaje de P

por la saliva y otra fracción por la hidrólisis del fitato por acción enzimática propia de los microorganismos ruminales. Aunque no se observan diferencias entre tratamientos, se puede inferir que a mayor P disponible, mayor será la actividad de bacterias ruminales para la degradación de sustrato. Ramírez-Pérez y Meschy (2005) reportan que el primer índice afectado en medios deficientes de P es el ATP, reduciendo así las poblaciones bacterianas. Un aporte correcto (o superior) de P optimiza el funcionamiento bacteriano al cubrir los requerimientos para ATP y crecimiento bacteriano. No hay efecto de la acumulación de P en pH o por toxicidad.

Cuadro 12. Concentración de fósforo (mg dL⁻¹) en rumen y duodeno

Tratamiento	Horas después de la comida						
	3	6	9	12	24	48	72
Líquido ruminal							
0 g fitasa t ⁻¹	54.16	54.95	55.97	54.95	55.29	56.22	52.67
540 g fitasa t ⁻¹	56.17	53.35	55.50	55.42	55.24	56.34	51.24
720 g fitasa t ⁻¹	56.76	56.17	56.45	55.26	55.50	56.32	53.22
Líquido duodenal							
0 g fitasa t ⁻¹	55.29	52.72	53.19	54.20	52.87	50.26	56.34
540 g fitasa t ⁻¹	55.73	55.67	51.24	56.42	53.25	51.32	52.44
720 g fitasa t ⁻¹	54.45	53.16	54.14	56.27	53.98	53.89	53.25

No existen diferencias (P>0.05)

La concentración de P en líquido duodenal (Cuadro 12) no varió entre tratamientos, ni en comparación con los datos encontrados en líquido ruminal; las investigaciones realizadas en rumiantes con dosis de enzima no han reportado concentración de P en líquido de duodeno. La absorción de P se lleva a cabo por la mucosa intestinal y los rumiantes excretan más del 95 % del P a través de las heces (Satter, 2003), que es el resultado del P presente en residuos microbianos (25-20%), células muertas y secreciones intestinales (equivalentes a 1g kg⁻¹ de MS ingerida) (Spiekers *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2000; NRC, 2001). Cuando hay un exceso de P en la dieta, los animales utilizan la orina como vía de excreción

secundaria para mantener la fosfatemia dentro de límites fisiológicos; así, vacas que reciben cantidades adecuadas de P dietario excretan en la orina menos de 1g P d⁻¹, en tanto que vacas sobrealimentadas con 20 a 30 % de P excretan 3-5 g P d⁻¹ (Ramírez-Pérez y Meschy, 2005). Los valores de excreción de P (Cuadro 13), muestran efecto de la adición de la enzima en excreción de P en heces, observando menor concentración del mineral con fitasa, varias investigaciones han mostrado este efecto (Buendía, 2009; Knowlton *et al.*, 2005; Hurley *et al.*, 2002), Las concentraciones normales de P en orina están en un intervalo de 6.2 a 9.3 mg 100 mL⁻¹ (Challa *et al.*, 1989), los valores encontrados fueron menores, esto se debe a que la mayor excreción de P es por heces.

Cuadro 13. Excreción de fósforo

Tratamiento	Heces (% P g ⁻¹ MS)		Orina (mg dL ⁻¹)
	12 h	24 h	
0 g fitasa t ⁻¹	2.47 ^a	2.32 ^a	5.57
540 g fitasa t ⁻¹	1.85 ^b	2.01 ^{ab}	5.34
720 g fitasa t ⁻¹	1.95 ^b	1.85 ^b	5.26

^{a, b} Medias en una columna con diferente literal, son diferentes, (P<0.05)

La sangre contiene entre 35 a 45 mg P dL⁻¹, presente en mayor cantidad dentro de las células. En el plasma varía entre 4 a 9 mg dL⁻¹, según la edad y especie; desde el punto de vista nutricional el contenido de P en el plasma es muy importante porque los niveles de P cambian fácilmente como consecuencia del P recibido en la ración, aumentando o disminuyendo según el suministro en la dieta. Wise *et al* (1961) determinaron que el P del suero sanguíneo fue lo más sensible y real para medir la disponibilidad biológica. No se encontraron diferencias (P≥0.05) (Cuadro 14) entre tratamientos, Buendía (2009a) al alimentar corderos con una dieta similar, encontró que aquellos a los que no se les adicionó la enzima tenían concentraciones de P de 9.03 mg dL⁻¹, en comparación con los que consumieron 450 g fitasa t⁻¹ que tuvieron 6.94 mg P dL⁻¹.

Cuadro 14. Concentración de fósforo en plasma sanguíneo

Tratamiento	mg P dL ⁻¹
0 g fitasa t ⁻¹	7.37
540 g fitasa t ⁻¹	7.63
720 g fitasa t ⁻¹	7.57

No existen diferencias (P>0.05)

10. Conclusión

No se observó efecto de fitasa en las variables de degradación y fermentación *in vitro* ni *in situ*. La concentración de P en heces fue mayor cuando los animales no consumieron fitasa.

En la prueba *in situ* la relación de acetato:propionato se invirtió, este comportamiento y las modificaciones en valores de pH y concentración de P y N-NH₃ fueron por efecto de la dieta y no de la enzima.

11. Literatura Citada

Angel, R., Tamim, N. M., Applegate, T. J., Dhandu, A. S. y Ellestad, L. E. 2002. Phytic acid chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appl. Poult. Res.* 11:471-480.

AOAC. 2003. Official methods of analysis of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International (17th ed.). AOAC International, Gaithersburg, MD.

Broderick, G. A., y Kang, J. H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *J. Dairy Sci.* 63: 64–75.

Buendía, R. G., Mendoza, M. G. D., Bárcena, G. R., Ortega, C. M. E., Solis, H. J. y Lara, B. A. 2003. Efecto de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* en la digestibilidad *in vitro* de maíz y sorgo, y en la productividad de borregos. *Agrociencia.* 37(4):317-322.

Buendía, R. G., Mendoza, M. G. D., González, M. S. S., Aranda, I. E., Miranda R. L. A., Melgoza, C. L. y Avellaneda, C. J. H. 2007. Effect of a phytase on *in vitro* digestibility and finishing criollo lambs fed a high sorghum diet. *J. Anim. Sci.* 85 (Suppl. 1):570.

Buendía R, G. 2009. Efecto de una fitasa en variables *in vitro* y productivas de corderos criollos en finalización alimentados con una dieta alta en sorgo. Tesis. Colegio de Postgraduados. 70 pp.

Buendía, R. G., González, M. S. S., Mendoza, M. G. D., Pinos, R. J. M., Aranda, I. E., Miranda, R. L. A. y Melgoza, C. L. M. 2009. Effect of an exogenous

phytase on in vitro dry matter degradation, phosphorous balance and growth performance of finishing lambs. J. Ani. Sci. 87(Suppl. 1):287

Buendía, R. G., González, M. S. S., Basurto, G. R., Crosby, G. M. M., Adame L. L. A y Montiel, O. L. J. 2010. Changes on growth performance and ruminal variables of finishing Dorper x Pelibuey lambs fed a sorghum grain diet plus an exogenous phytase. J. Ani. Sci. 88(Suppl 2):696.

Burroughs, N., A. Latone, P. De Paul, P. Gerlaugh, and R. M. Bethke. 1951. Mineral influences upon urea utilization and cellulose digestion by rumen microorganisms using the artificial rumen Technique. J. Anim. Sci. 10:693-697.

Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. INEGI. Unidades de producción con uso de tecnología en ganado ovino, según tipo de tecnología empleada por entidad y municipio. [Consultado el 19-01-2013] Disponible en: www.inegi.org.mx/sistemas/TabuladosBasicos/Default.aspx?c=17177&s=est

Challa, J., Braithwaite, G. D., and Dhanoa, M. S. 1989. Phosphorus homeostasis in growing calves. Journal of Agricultural Science. 112:217-226.

Church, D. C. y Pond, W. G. 1977. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp: 171-174.

Cobos, P. M. A., Guerra, M. E., López, G. S. J., Báez, P. J. L., González, M. S. S. y Mendoza, M. G. D. 2005. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. Agrocienza. 39(1):1-9.

Coordinación General de Ganadería, SAGARPA. Estimación del consumo nacional aparente 1990-2005. [Consultado el 18-01-2013] Disponible en: www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Estadisticas/Lists/Estadsticas/Attachments/2/Esti

maci%C3%B3n%20del%20Consumo%20Nacional%20Aparente%201990-2005%20Carne%20de%20ovino.pdf

Counotte, G. H., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M. y deBie, M. J. A. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of dl-[2-¹³C]lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(4):649-655.

De Blas, C., González, M. G., y García, R. P. 2010. Tablas Fedna de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos 3ra. Ed. FEDNA. Madrid, España. 502 pp.

Durand, M., Beaumatin, P. et Dumay C. 1983. Estimation in vitro à l'aide du phosphore radioactif des besoins en phosphore des microorganismes du rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 23: 727-739.

Durand, M., J. Stevani, S. Komisarczuk. 1987. Effect of some major minerals on rumen microbial metabolism in a semi-continuous fermentor. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 52: 1655-1663.

Eeckhout, W., and De Paepe, M. 1994. Total phosphorus, phytate phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal. Feed. Sci. Technol.* 47: 19-29.

Ekelund, A., Spörndly, R., Valk, H., and Murphy, M. 2003. Influence of feeding various phosphorus sources on apparent digestibility of phosphorus in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109: 95-104.

Esqueda, C. M. H. y Gutierrez, R. E. 2009. Producción de ovinos de pelo bajo condiciones de pastoreo extensivo en el Norte de México. INIFAP. ISBN 978-607-425-217-0

Fiske, C. H., y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol.Chem. 66:375-380.

Frontela, C., Ros, G. y Martínez, C. 2008. Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. ALAN 58(3): 215-220.

Godoy, S. y Meschy, F. 2001. Utilization of phytate phosphorus by rumen bacteria in a semi-continuous culture system (RUSITEC) in lactating goats fed on different forage to concentrate ratios. Reprod. Nutr. Dev. 41: 259-265.

Godoy, S. y Chicco, C. F. 2005. Utilización de ácido fítico en la nutrición de rumiantes. Revista Digital CENIAP HOY. 9. http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n9/arti/godoy_s/arti/godoy_s.htm

González, J. A. y Aguirre, A. E. 2005. Pastoreo racional intensivo altamente tecnificado en la Planicie Huasteca Potosina. Triptico. Publicación clave: INIFAP/CIRNE/P-59

Hall, M. 2001. Sistemas de producción agropecuaria y pobreza. FAO y Banco Mundial. Roma y Washinton DC. pp 2-8. [Consultado el 14/02/13] Disponible en línea: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/y1860s/y1860s.pdf>

Hankis-Herr, S. L., Arseneau, J. D., Lemenager, R. P. y Sutton, A. L. 2009. Effect of low phytate corn and phytase on nutrient excretion and performance of feedlot cattle. Prof. Ani. Sci. 25:360-369.

Hatten, L. F. III, Ingram, C. F., and Pittman, S. T. 2001. Effect of phytase on production parameters and nutrient availability in broilers and laying hens: A review. J. Appl. Poult. Res. 10:274-278.

Hernández, G. A. y Martínez, H. P. A. 1996. Utilización de pasturas tropicales. Manual de producción ovina en zonas tropicales. pp 7-22

Hernández, G., Godoy, S. y Chicco, C. F.. 2006. Biodisponibilidad del fósforo de cereales en aves. Revista Científica 16 (2): 149-154.

Herrera, P. J. 2013. Digestibilidad *in vitro* de dietas energéticas para ovinos con inclusión de semilla de girasol. Tesis. Colegio de Postgraduados. 57 pp

Hill, S. R., Knowlton, K. F., Kebreab, E., France, J. y Hanigan, D. 2008. A model of phosphorus digestion and metabolism in the lactating dairy cow. J. Dairy Sci. 91:2021-2032.

Hurley, L. A., Stanton, T. L., Jarosz, M. J. y Schutz, D. 2002. Case study: Effects of dietary phosphorus and microbial phytase level on beef finishing performance. Prof. Ani. Sci. 18:286-292

Hurrell, R. F., Juillerat, M. A., Reddy, M. B., Lynch, S. R., Dassenko, S. A. and Cook, J. D. 1992. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. Am J Clin Nutr. 56:573-578.

INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins: besoins des animaux, valeurs des aliments : tables. Francia. Quae Ed. 307 pp.

Johnston, S. L., Williams, S. B., Southern, L. L., Bidner, T. D., Matthews, J. O. and Olcott, B. M. 2004. Effect of phytase addition and dietary calcium and phosphorus levels on plasma metabolites and ileal and total-tract nutrient digestibility in pigs. J. Anim. Sci. 82:705-714.

Kies, A. K., van Hemert, K. H. F. and Sauer, W. C. 2001. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. *World's Poult. Sci. J.* 57: 109–126.

Kies, A. K., Gerrits, W. J. J., Schrama, J. W., Heetkamp, M. J. W., Van de Linden, K. L., Zandstra, T. and Verstegen, M. W. A. 2005. Mineral absorption and excretion as affected by microbial phytase, and their effect on energy metabolism in young piglets. *J. Nutr.* 135:1131-1138.

Kim, T., Mullaney, E. J., Porres, J. M., Roneker, K. R., Crowe, S., Rice, S., Ko, T., Ullah, A. H. J., Daly, C. B., Welch, R. y Gen L. X. 2006. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6):4397-4403

Knowlton, K. F., Radcliffe, J. S., Novak, C. L., and Emmerson, D. A. 2004. Animal management to reduce phosphorus losses to the environment. *J. Anim. Sci.* 82(E. Suppl.):E173–E195.

Knowlton, K. F., Parsons, C. M., Cobb, C. W. y Wilson, K. F. 2005. Exogenous phytase plus cellulase and phosphorus excretion in lactating dairy cows. *Prof. Ani. Sci.* 21:212-216

Komisarczuk, S. 1985. Etude de l'influence du phosphore sur l'activité fermentaire, la proteosynthèse et les teneurs en ATP des contenus de rumen dans différents systèmes de culture continus. Tesis. Université de Paris, Francia. 200 pp.

Komisarczuk, S., Merry, R. J., and McAllan, A. B. 1987. Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *Br. J. Nutr.* 57: 279-290.

Komisarczuk S, y Durand M (1991) Nutrient requirement of rumen microbes. Proc. 3rd Int. Symp. on Nutrition of Herbivores. Penang, Malasia. pp. 133-141

Mendez, J. 1998. Fitasas en avicultura. En: XV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Rebollar, P.; C. de Blas y G. Mateos, editores. FEDNA. Madrid. pp 109-116.

Morse, D., Head, H. H., Wilcox, C. J., Van Horn, H. H., Hissem, C. D., and Harris, Jr, B., 1992. Effects of concentration of dietary phosphorus on amount and route of excretion. J. Dairy Sci. 75(11): 3039-3049.

Nasser, M. E. A., Sallam, S. M. A., Araujo, R. C., Abdalla, A. L. y Vitti, M. 2010. Effect of phosphorus supplementation on gas production, rumen fermentation and produced amylase and carboxymethyle cellulase activity, *in vitro*. Lucrări Științifice. 53:97-104.

NRC. National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7a ed. National Research Council. National Academy of Sciences. Washington, D. C. USA. pp:381.

NRC. National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants. National Academy of Sciences. Washington, DC.

Partida, P. J. A., Braña, V. D., Jiménez, S. H., Ríos, R. F. G. y Buendía, R. G. 2013. Producción de carne ovina. Libro técnico No. 5. INIFAP. ISBN: 978-607-37-0036-8

Perney, K. M., Cantor, A. H., Strawn, M. L., and Herkelman, K. L. 1993 The effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chickens. Poultry Sci. 72: 2106-2114.

Pizzani, P. 2005. Utilización del fósforo fítico en la alimentación de rumiantes. Primer Curso Internacional Sobre Avances en la Nutrición de los Rumiantes 2005. Guarico, Venezuela. pp 151 – 169.

Pote, D. H. 2000. Analyzing for total phosphorus and total dissolved phosphorus in water samples. In: Methods of Phosphorus Analysis of Soils, Sediments, Residuals, and Water. Southern Cooperative Series Bull. No. 396. G. M. Pierzynski, ed. North Carolina State Univ., Raleigh. pp: 91-92

Prabhu, R., Altman, E. y Eitman, M. A. 2012. Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (24): 8564-8570.

Ramírez-Pérez, A. H. y Meschy, F. 2005. Requerimientos de fósforo de los microorganismos ruminales: una revisión. *INCI* 30(11):664-670

Raun, A., Cheng, E., and Burroughs, W. 1956. Phytate phosphorus hydrolysis and availability to rumen microorganisms. *J. Agr. Food Chem.* 4: 869-871.

Reddy, N. R., Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. 1982. Phytases in legumes and cereals. In: Chichester, C. O., Mraak, E. M., and Stewart, F. *Advances in Food Chemistry*. Academic Press. New York. pp:1-92.

Satter, L. D. 2003. Phosphorus management in cattle production systems. In: Garnsworthy, P. C., and J. Wiseman (eds). *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham, Press, U.K. pp. 157-174.

Sauvant, D., Meschy, F., y Mertens, D. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effects acidogenes des rations. *INRA. Prod. Anim.*12:49-60.

Sere C. and Steinfeld H. 1996. World Livestock Production Systems. FAO. [Consultado el 17/02/13] Disponible en línea: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/es/lead/toolbox/Paper127/cover1.htm>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SIAP. [Consultado el 18-01-2013] Disponible en: www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=23&Itemid=3

Spiekers, H., Brintrup, R., Balmelli, M., and Pfeffer, E. 1993. Influence of dry matter intake on fecal phosphorus losses in dairy cows fed rations low in phosphorus. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 69: 37-43.

Stanko, R.L. 2002. Principios de nutrición en ovinos. Memorias. Simposium Internacional de Ovinos del Norte de México. SAGARPA, Gob. Del Edo. de Chih. Ed. por S. Echavarría. INIFAP Chihuahua, Méx. P. 120-125.

Steel, R. G. D., y J. H. Torrie. 1996. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Segunda edición. McGraw-Hill. México, D.F. 622 p.

Summers, J. 1997. Precision phosphorus nutrition. J. Appl. Poultry Res. 6: 495-500.

Tilley, J., and Terry R. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. British Grassl. Soc. 18:104.

Underwood, E. J., y Suttle, N. F. 1999. The Mineral Nutrition of the Livestock. 3ª ed. CABI. New York. 614 p.

Valk, H. y Sebek L. B. J. 1999 Influence of long-term feeding of limited amounts of phosphorus on dry matter intake, milk production, and body weight of dairy cows. J. Dairy Sci. 82: 2157-2163.

Valk, H., Sebek, L. B., y Beynen, A. C. 2002. Influence of phosphorus intake on excretion and blood plasma and saliva concentrations of phosphorus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2642-2659.

Vallardi, G. M., Morales, L. R. y Ávila, G. E. 2002. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Téc. Pecu. Méx.* 40 (2):181-186.

Van Doorn, D. A., Everts, H., Wouterse, H. and Beynen, A. C. 2004. The apparent digestibility of phytate phosphorus and the influence of supplemental phytase in horses. *J. Anim. Sci.* 82:1756-1763.

Vilaboa, A. J., Díaz, R. P., Platas, R. D. E., Ortega, J. E. y Rodríguez, C. M. A. 2006. Productividad y autonomía en sistemas de producción ovina: dos propiedades emergentes de los agrosistemas. *Interciencia.* 31(1):37-44.

Wallnöfer, P. y Baldwin, R. L. 1967. Pathway of propionate formation in *Bacteroides rumenicola*. *J. Bacteriol.* 93(1):504-505

Wise, M. B., Wentworth, R. A., y Smith, S. E. 1961. Availability of the phosphorus in various sources for calves. *J. Anim. Sci.* 20:329-335.

Wu, Z., Satter, L. D., y Sojo, R. 2000. Milk production, reproductive performance, and fecal excretion of phosphorus by dairy cows fed three amounts of phosphorus. *J. Dairy Sci.* 83: 1028-1041.

Yano, F., Yano, H. y Breves, G. 1991. Calcium and phosphorus metabolism in ruminants. *International symposium on ruminant physiology.* Academic Press: 277-295

Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., y Cheng, K. J. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* 144:1565-1573.