



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS Y
PLANTAS CON CAPACIDAD DESFAUNANTE SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE METANO**

DIEGO FELIPE PORTELA DÍAZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO. TEXCOCO. EDO. DE MÉXICO

Septiembre 2012

La presente tesis titulada: **Evaluación *in vitro* de subproductos agrícolas y plantas con capacidad desfaunante sobre la producción de metano**, realizada por el alumno: **Diego Felipe Portela Díaz** 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

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

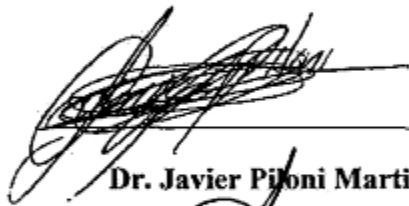
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



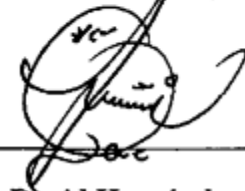
Ph. D. Mario Antonio Cobos Peralta

ASESOR



Dr. Javier Piloni Martini

ASESOR



Dr. David Hernández Sánchez

Montecillo. Texcoco. Estado de México. Septiembre 2012

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS Y PLANTAS CON CAPACIDAD DESFAUNANTE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO

Diego Felipe Portela Díaz, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN

Actualmente se necesitan alternativas que disminuyan la emisión de metano asociada a la producción ganadera, una opción, es el uso de plantas que contienen metabolitos secundarios y causan la desfaunación ruminal. El presente estudio tuvo como objetivo principal, evaluar la capacidad desfaunante *in vitro* de diferentes plantas y subproductos agrícolas, así como su efecto en algunas variables de fermentación ruminal, población de microorganismos, producción de dióxido de carbono y metano. En la primera fase, se evaluaron 10 plantas y 6 subproductos agrícolas. El follaje del chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) y el subproducto, cascabillo de café (*Coffea arabica*) fueron seleccionados, ya que presentaron la mayor capacidad desfaunante. A la 96 h de incubación, el follaje de chicalote presentó la mayor producción ($P < 0.05$) de ácido butírico, mientras que, el cascabillo de café tuvo menor producción ($P < 0.05$) de acético y butírico. Para la segunda fase, el cascabillo de café estimuló la mayor ($P < 0.05$) *DIVMS* de la alfalfa a las 72 h de incubación. El fármaco Secnidazol[®] resultó el mejor desfaunante, 100% efectivo, no afecta la población de bacterias ruminales totales y disminuye la producción de biogás y metano. A las 72 horas de incubación el porcentaje de metano en el biogás producido representó 17.13, 14.09 y 5.13%, para los tratamientos con chicalote, cascabillo de café y Secnidazol[®], respectivamente.

Palabras clave: Metano, desfaunación, protozoarios, *Coffea arabica*, *Argemone ochroleuca*.

IN VITRO EVALUATION OF AGRICULTURAL BY-PRODUCTS AND PLANTS WITH DEFAUNANT CAPACITY ON METHANE PRODUCTION

Diego Felipe Portela Díaz, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

ABSTRACT

New alternatives to decrease methane emissions related to the husbandry production systems are required, the use of plants containing secondary metabolites that produce defaunation of the rumen is an option. The main objective of the present research was to evaluate the defaunation ability of different plants and agricultural by-products *in vitro*, as well as, their effect on some rumen-fermentative, microorganism's concentration, and methane and carbon dioxide production variables. Ten plants and six agricultural by-products were evaluated during the first phase. The leaves of white chicalote (*Argemone ochroleuca*) and the coffee husk byproduct (*Coffea arabica*) were selected, because they showed the highest defaunation capacity. The chicalote leaves had the highest ($P<0.05$) acetic production, and the coffee husk the lowest ($P<0.05$) acetic and butyric production after 96 h of incubation. In the second phase, the coffee husk stimulates the highest ($P<0.05$) alfalfa's IVDMD, after 72 h of incubation. The Secnidazole[®] drug was the best defaunation agent, 100 percent effective, without negative effect on rumen bacteria, and decreases the biogas and methane production. The percent of methane contained in the biogas was 17.3, 14.09 and 5.13% for the chicalote, coffee husk and Secnidazole[®] treatments, respectively.

Key words: Methane, defaunation, protozoa, *Coffea arabica*, *Argemone ochroleuca*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme con esta gran oportunidad de conocer buenas personas y vivir situaciones que contribuyeron en mi crecimiento personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante mis estudios e investigación en estos dos años de Maestría.

A la comunidad del Colegio de Postgraduados por que como institución de investigación pública, compartió los espacios y el personal requerido para el desarrollo de la presente investigación.

A mi Consejo Particular: Dr. Mario Antonio Cobos Peralta, por brindarme el conocimiento y la orientación durante la investigación, compartiendo su amplia experiencia en el interesante tema de la Microbiología Ruminal. Al Dr. Javier Piloni Martini, por su atención y participación oportuna durante el tiempo en que se desarrollo esta investigación. Al Dr. David Hernández Sánchez por sus aportes fundamentales para la culminación de este trabajo.

A la Dra. María de Lourdes de la Isla de Bauer, por su valioso ejemplo como investigadora y persona comprometida con el desarrollo de la ciencia en pro del bien común.

A mis amigas, Alejandra Romero, Guadalupe Domínguez, Mayra Rivas y amigo, Daniel Cervantes, con quienes compartí momentos gratos en este punto donde se unieron nuestros caminos.

DEDICATORIA

A mis padres, Orlando Portela Córdoba y Martha Cecilia Díaz Rivera, quienes siempre confiaron en mí y con su esfuerzo y dedicación facilitaron el cumplimiento de esta meta.

A mis hermanas Angélica Portela y Vanessa Portela, quienes me apoyaron en mis decisiones, motivándome a continuar a dar este importante paso en mi proceso de formación.

A mis abuelos Antonio María Díaz y María Dolores Rivera de Díaz, quienes me han acompañado en los momentos representativos de mi vida personal y académica.

A Cristina Heredia, por enseñarme que la esperanza y el amor van de la mano, iluminando el camino para cumplir nuestros sueños.

A mi paisano Teobaldis Mercado y su familia, con quienes compartí buenos momentos durante mi estancia.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2 LITERATURA CITADA	10
CAPÍTULO II.....	20
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	20
2.1 Objetivo General.....	20
2.2.1 Objetivos Particulares	20
2.2 Hipótesis Particulares.....	20
CAPITULO III.....	22
EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA CAPACIDAD DESFAUNANTE DE PLANTAS Y SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS	22
3.1 RESUMEN	22
3.2 INTRODUCCIÓN	23
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.3.1. Ubicación geográfica del estudio.....	26
3.3.2. Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios.....	26
3.3.3. Plantas y subproductos agrícolas con capacidad desfaunante.....	27
3.3.4. Fármaco desfaunante (FD).....	28

3.3.5. Recuperación de protozoarios	28
3.3.6 Técnica de inoculación de los medios de cultivo.....	29
3.3.7 Conteo de protozoarios viables	29
3.3.8 pH ruminal.	30
3.3.9 Diseño y análisis estadístico	31
3.4 RESULTADOS.....	31
3.5 DISCUSION	34
3.6 CONCLUSIONES	36
3.6 LITERATURA CITADA	36
CAPITULO IV.....	42
EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS PLANTAS Y SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS SELECCIONADOS POR SU ALTA CAPACIDAD DESFAUNANTE (ACD).....	42
4.1. RESUMEN	42
4.2 INTRODUCCIÓN	43
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.3.1. Ubicación geográfica del estudio.....	45
4.3.2. Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios.....	45
4.3.3. Plantas y subproductos agrícolas con capacidad desfaunante (PSD).....	45
4.3.4. Fármaco desfaunante (FD).....	46
4.3.5. Recuperación de protozoarios.....	47
4.3.6 Técnica de inoculación de los medios de cultivo.....	47
4.3.7 Conteo de protozoarios viables	48
4.3.8 pH ruminal.	49
4.3.9 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)	49

4.3.10 Diseño y análisis estadístico	50
4.4 RESULTADOS.....	50
4.5 DISCUSIÓN	52
4.6 CONCLUSIONES	57
4.7 LITERATURA CITADA	57
CAPITULO V.....	62
EFFECTO DE TRES PLANTAS Y UN SUBPRODUCTO AGRÍCOLA CON ALTA CAPACIDAD DESFAUNANTE SOBRE VARIABLES FERMENTATIVAS Y MICROBIOLÓGICAS	62
5.1 RESUMEN	62
ABSTRACT.....	63
5.2 INTRODUCCIÓN	63
5.3 MATERIALES Y METODOS	65
5.3.1. Ubicación geográfica del estudio.....	65
5.3.2. Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios.....	65
5.3.3. Plantas y subproductos agrícolas con capacidad desfaunante (PSD).....	65
5.3.4. Fármaco desfaunante (FD).....	66
5.3.5. Recuperación de protozoarios	66
5.3.6 Técnica de inoculación de los medios de cultivo.....	67
5.3.7 Conteo de protozoarios viables	68
5.3.8 pH ruminal.	69
5.3.9. Conteo de Bacterias ruminales totales	69
5.3.10 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)	70
5.3.11 Diseño y análisis estadístico	70
5.4 RESULTADOS.....	71
5.6 DISCUSIÓN	77

5.7 CONCLUSIONES	79
5.8 LITERATURA CITADA	79
CAPITULO VI.....	83
COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DESFAUNATE, PRODUCCIÓN DE BIOGAS Y <i>DIVMS</i> ENTRE EL CHICALOTE (<i>Argenome ochroleuca</i>), CASCABILLO DE CAFÉ (<i>Coffea arabica</i>) Y SECNIDAZOL	83
6.1 RESUMEN	83
ABSTRACT.....	84
6.2 INTRODUCCIÓN	85
6.3 MATERIALES Y METODOS	87
6.3.1 Ubicación geográfica del estudio.....	87
6.3.2 Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios en los tratamientos evaluados.....	88
6.3.3. Recuperación del inóculo de protozoarios	88
6.3.4 Técnica de inoculación de los medios de cultivo de los tratamientos evaluados.....	90
6.3.5 Conteo de protozoarios viables	90
6.3.6 pH ruminal.	91
6.3.7. Conteo de Bacterias ruminales totales	91
6.3.9 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)	92
6.3.10. Degradación <i>in vitro</i> de la MS de la alfalfa	92
6.3.11. Inoculación, incubación de medios e instalación del sistema de producción de gas <i>in vitro</i> ...93	
6.3.12. Determinación de la producción de biogás, metano (CH ₄) y dióxido de carbono (CO ₂).....94	
6.3.13. Diseño experimental	95
6.4 RESULTADOS.....	95
6.5 DISCUSIÓN	99

6.6 CONCLUSIONES 104
6.7 LITERATURA CITADA 105

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
3.1	Composición del medio cultivo GCA-FR usado para estimar la concentración y supervivencia de protozoarios ciliados del rumen.....	27
3.2	Plantas y subproductos agrícolas evaluados con potencial desfaunante.....	28
3.3	Efecto de los tratamientos del grupo 1 sobre la concentración de protozoarios viables (10^4 mL ⁻¹ del medio de cultivo a diferentes horas de incubación y pH del medio a las 0 (inicial) y 72 h (final).....	32
3.4	Efecto de los tratamientos del grupo 2 sobre la concentración de protozoarios viables (10^4 mL ⁻¹ del medio de cultivo a diferentes horas de incubación y pH del medio a las 0 (inicial) y 72 h (final).....	33
3.5	Efecto de los tratamientos del grupo 3 sobre la concentración de protozoarios viables (10^4 mL ⁻¹ del medio de cultivo a diferentes horas de incubación y pH del medio a las 0 (inicial) y 72 h (final).....	34
4.1	Composición del medio cultivo base (GCA-FR) para crecimiento y supervivencia de protozoarios ciliados del rumen.....	46
4.2	Plantas y subproductos agrícolas evaluados por su capacidad desfaunante	48
4.3	Efecto sobre la concentración de protozoarios ruminales (10^4 /mL de medio de cultivo) y pH a diferentes horas de incubación.....	51
4.4	Concentración y proporción de ácidos grasos volátiles (mol L ⁻¹ medio de cultivo) en los tres grupos y relación acetato:propionato, a las 96 h de incubación.....	53

5.1	Composición de los medios de cultivo usado para estimar la concentración de protozoarios y bacterias del rumen.....	67
5.2	Plantas y subproductos agrícolas con alta capacidad desfaunante.....	68
5.3	Efecto de los agentes desfaunantes sobre la concentración de protozoarios y bacterias ruminales a diferentes horas de incubación.....	72
5.4	Concentración y proporción de ácidos grasos volátiles (mol L^{-1} medio de cultivo) y relación acetato:propionato, a diferentes horas de incubación.....	75
6.1.	Composición de los medios de cultivo usados para evaluar la capacidad desfaunante, producción de biogás, AGV y DIVMS del chicalote blanco y el cascabillo de café.....	89
6.2	Análisis bromatológico de las plantas alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), chicalote (<i>Argemone ochroleuca</i>) y el cascabillo de café (<i>Coffea arabica</i>).....	96
6.3	Concentración de protozoarios y bacterias ruminales totales a las 0, 24, 48, 72 h de incubación, pH de los biorreactores a las 0 y 72h y DIVMS de alfalfa a las 72 h de incubación.....	96
6.4	Producción total de biogás, y porcentaje de metano y dióxido de carbono en los biorreactores a las 24, 48, 72 h de incubación.....	98
6.5	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles y relación acético (C2):propiónico (C3), a diferentes horas de incubación.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Fotos de protozoarios del género <i>Isotrichia</i> fijados con formaldehído al 10%. a) protozooario viable, mostrando integridad morfológica de su ectodermo, b) Protozooario no viable, mostrando turgencia celular y pérdida de su morfología.....	31
2.1	a) Sistema de producción de gas <i>in vitro</i> . b) Esquema descriptivo del sistema de producción de gas <i>in vitro</i> , donde: 1. Trampa con solución salina saturada (SSS); 2. Probeta de recolección de la SSS desplazada; 3. Manguera y aguja para guiar el flujo del biogás; 4. Biorreactor, frascos serológicos de cada tratamiento con el medio de cultivo inoculado; 5. Baño María.....	94

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

En el rumen se hospedan varias especies de bacterias (10^{10} - 10^{11} /mL), arqueobacterias (10^7 - 10^9 /mL), protozoarios (10^4 - 10^6 /mL), hongos (10^3 - 10^6 /mL) y virus (10^9 - 10^{10} /mL) (Wright y Klieve, 2011). Entre los protozoarios se encuentran los flagelados y ciliados, siendo estos últimos los de mayor importancia por su concentración y actividad, con cerca de 30 géneros y alrededor de 300 especies y una concentración de 10^5 a 10^6 protozoarios por mL de fluido ruminal (Ogimoto e Imai, 1981; Williams y Coleman, 1992).

Los protozoarios ciliados están clasificados de acuerdo a su morfología (la cual considera el número y posición de los cilios, la ubicación y forma del macronúcleo, la ubicación del micronúcleo, la presencia y número de placas esqueléticas, así como, de vacuolas contráctiles) en tres órdenes de importancia: *Prostomatida*, *Trichostomatida* y *Entodiniomorphida*. El orden *Trichostomatida* comprende a la familia *Isotrichidae* y los géneros *Isotricha*, *Dasytricha* y *Oligoisotricha*, los cuales presentan cilios en la mayor parte de su ectodermo y utilizan material soluble como alimento. Del orden *Entodiniomorphida* prevalece la familia *Ophryoscolecidae* con los géneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium* y *Ophryoscolex* (entre los principales) (Ogimoto e Imai, 1981; Yokohama y Johnson, 1988).

Los protozoarios de la familia *Ophryoscolecidae* se caracterizan por presentar cilios localizados en la zona cercana al peristomo (orificio bucal) los cuales le ayudan en la motilidad e ingestión de partículas de alimento y bacterias (Ogimoto e Imai, 1981; Yokohama y Johnson, 1988; Williams y Coleman, 1992). Los protozoarios ciliados del rumen benefician al animal hospedero con el aporte de los nutrientes que acumulan en su endodermo, los cuales quedan disponibles

para el rumiante, una vez que estos microorganismos salen del rumen y se inicia su digestión en el tubo digestivo (Williams y Coleman, 1992). Es importante mencionar, que algunos protozoarios del rumen tienen la capacidad de convertir la glucosa de la dieta en glucógeno, el cual se almacena en el endodermo del protozoario, pero queda disponible para el rumiante, una vez que inicia el proceso digestivo (Hall, 2010).

El consumo de bacterias por parte de los protozoarios ciliados del rumen es una interacción de depredación, que permite a los protozoarios ciliados (de la orden *Entodiniomorpha*, familia *Ophryoscolecidae*) obtener la mayoría de sus nutrientes (Williams y Coleman, 1992; Jouany, 1996). La actividad bacteriófaga de estos protozoarios está asociada con la capacidad de sintetizar enzimas que rompen la pared celular de las bacterias formada por *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico (Bełżecki *et al.*, 2010).

A diferencia de la interacción depredadora entre protozoarios y bacterias (eubacterias), hay otro tipo de interacción metabólica entre arqueobacterias y protozoarios que permite al rumiante utilizar de manera más eficiente los nutrientes presentes en la dieta (Bonhomme, 1990). En algunos casos, la interacción es muy evidente y se pueden observar arqueobacterias metanogénicas colonizando el ectoplasma de protozoarios ciliados de los géneros *Entodinium*, *Polyplastron*, *Diplodinium* y *Epidinium* (Vogels y Stumm, 1980; Stumm *et al.*, 1982; Tokura *et al.*, 1997; Hans-Dieter, 2006 Ozutsumi *et al.*, 2006; Tóthová *et al.*, 2008). En esta interacción, el gas hidrógeno, producido en los hidrogenosomas de los protozoarios durante la fermentación del alimento, es usado por las bacterias metanogénicas para producir energía metabólica (ATP) y se genera como desecho el gas metano (Hungate *et al.*, 1970), un 37% de este gas puede ser producido por esta ectosimbiosis (Finlay *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1995).

Entre las funciones importantes de los protozoarios ciliados en el rumen, se destaca la capacidad de intervenir en el metabolismo del piruvato, liberando hidrogeno (H_2), este proceso se lleva a cabo en la membrana exterior del hidrogenosoma, de igual forma, el proceso de descarboxilación oxidativa del piruvato es catalizada por la ferredoxina que funciona como aceptor de electrones (Marczak *et al.*, 1983). Además de producir hidrogeno útil para la ectosimbiosis (protozoario-arqueobacteria) los hidrogenosomas están implicados en la utilización de hidrogeno y CO_2 , su absorción se asocia a la conversión de piruvato en acetil CoA, acetato quinasa y fosfato acetil transferasa, que convierte el acetil Co A en acetato (Yarlett *et al.*, 1982).

De acuerdo a las proyecciones de la producción ganadera mundial, asociada con la demanda de carne y leche; para el año 2030, se espera que las emisiones entéricas de metano se incrementen en un 60% (con relación a la emisión actual), mientras que, para el año 2050 aumentará en un 100% (FAO, 2003; FAO, 2008). Este problema no es solo ambiental, ya que la producción de metano entérico en rumiantes representa una pérdida del 8 al 12% de la energía bruta del alimento (Jhonson y Jhonson, 1995; Moss *et al.*, 2000). Como resultado del proceso de fermentación se produce metano que es expulsado mediante el eructo (400 a 500 litros por día/ animal adulto) (McAllister *et al.*, 1996; Moss *et al.*, 2000).

La desfaunación ruminal se define como la eliminación de la población de protozoarios ciliados del rumen (Jouany *et al.*, 1988; Lincoln *et al.*, 2009) y se usa experimentalmente para incrementar la población de bacterias ruminales, ya que aminora la competencia por el alimento y la depredación por parte de los protozoarios ciliados (Orpin y Lectcher, 1984); además, causa entre un 20% a 42% de reducción en las emisiones de metano (MacAllister y Newbold, 2008; Morgavi *et al.*, 2008). La desfaunación es considerada una alternativa para mitigar las emisiones

de metano del sector ganadero. Se puede llevar a cabo usando productos químicos y aditivos alimenticios, que remueven la asociación arqueobacterias-ciliados, lo que disminuye la disponibilidad de hidrogeno usado para la metanogénesis; aunque, la dificultad radica en la posible adaptación de los microorganismos y la incapacidad de mantener animales desfaunados por largos periodos (Hook *et al.*, 2010).

Entre los métodos experimentales de mitigación de las emisiones de metano en rumiantes, se encuentran: la creación de rebaños aislados libres de protozoarios (Buddle *et al.*, 2011), la identificación por selección genética de animales que produzcan menos emisiones entéricas de CH₄ (Piñares-Patiño *et al.*, 2003), la vacunación y generación de anticuerpos salivales específicos contra metanogénos (Shu *et al.*, 2001), el uso de bacteriófagos (Jansen y Kirs, 2008), y la inoculación de bacterias acetogénicas que pueden competir con las arqueobacterias metanogénicas por el dióxido de carbono y el hidrógeno (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988; Joblin, 1999).

Otras estrategias están asociadas a la disminución de metanogénos del rumen usando algunos productos químicos, entre estos destacan: cloroformo (Triet *et al.*, 1972), tricloroacetamida, tricloroetil, bromoclorometano, ácido 2-bromoetanosulfonato (Dong *et al.*, 1999). Aunque el uso de estos productos puede causar daños fisiológicos en el animal. En estudios *in vitro* se ha demostrado que compuestos como nitroetano, 2-nitroetanol, 2-nitro-1-propanol y ácido 3-nitro-1-propionico inhiben la producción ruminal de metano (Anderson *et al.*, 2008).

Aunque no se encontraron reportes científicos que mencionen un 100% de efectividad en la disminución de las emisiones de metano en rumiantes, hay reportes que indican que con la

inclusión de 1.5 mL de cloroformo diluido en 30 mL de aceite de girasol en una dieta para ganado lechero a base de ensilaje y concentrado (87:13 base MS; consumo diario de 8.4 kg/MS) durante 42 días causó una disminución ($P < 0.01$) del 75% en las emisiones de CH_4 (Knight *et al.*, 2011). También se ha reportado una disminución del 30% en las emisiones de metano en animales dosificados con 33 mg de monensina /kg de la dieta (Guan *et al.*, 2006), aunque el efecto puede ser variable y poco efectivo.

Cuando los rumiantes son alimentados con dietas que contienen una alta proporción de forrajes de baja digestibilidad (alto contenido de carbohidratos estructurales) se genera una mayor cantidad de ácido acético y gas hidrógeno (H_2 , Janssen *et al.*, 2010), lo que a su vez, aumenta la cantidad de metano producido por unidad de alimento digerido. Por el contrario, en dietas que contienen una mayor cantidad de granos o de carbohidratos de fácil fermentación, el principal producto de la fermentación es ácido propiónico (Robertson y Waghorn, 2002; Beauchemin y McGinn, 2005). Se han reportado rendimientos de 0.12 moles de metano por 100 g de glucosa, 0.20 moles de CH_4 por 100 g de almidón, 0.28 moles de CH_4 por 100 g de heno de alfalfa y 0.28 moles CH_4 por 100 g de celulosa (Blaxter y Martin, 1962; Hungate, 1966; Czerkawski, 1969). Además, dietas para rumiantes con mayor contenido de granos puede causar una disminución de pH y puede eliminar a los protozoarios ciliados y en consecuencia a las bacterias metanogénicas que viven adheridas a su ectodermo. El aumento del consumo de concentrado y granos causa una disminución ($P < 0.01$) en las emisiones de metano (15.3 g/Kg de materia seca consumida) (McGeough *et al.*, 2010). Modificaciones de la dieta, como la inclusión de grasa, causa la disminución en la producción de metano, la dosificación de 4.75% de aceite de coco en una dieta de engorda (50:50 forraje/concentrado) disminuye su producción en un 22% (28.3 g/Kg MS

consumida control vs 21.1 g/kg materia seca consumida con aceite) (Jordan *et al.*, 2006). Mediante un meta-análisis sobre adición de grasas en dietas para rumiantes, Grainger y Beauchemin (2011) concluyen que la adición de grasa (10 g/Kg de la dieta) puede disminuir las emisiones de metano sin afectar el desarrollo productivo del animal: Sin embargo, su conclusión se contrapone a la recomendación generalmente aceptada de agregar como máximo de 5% de grasa en la dieta para rumiantes; además, esta estrategia de mitigación debe ser evaluada desde el punto de vista económico buscando un equilibrio entre el costo beneficio y la salud del rumiante. El uso de plantas que contienen compuestos desfaunantes (p. ej. taninos condensados, saponinas, alcaloides y aceites esenciales) reduce la disponibilidad de hidrógeno y además resultan nocivos para los protozoarios, sin embargo todavía se desconoce la dosis óptima, sus efectos a largo plazo y la posible deposición de sus residuos en carne y leche (Hook *et al.*, 2010). Estos metabolitos secundarios, también denominados fitoquímicos, se encuentran de forma natural en diferentes plantas y tienen potencial como aditivos para modificar la fermentación ruminal, favoreciendo procesos como la desfaunación y la inhibición de la metanogénesis (Patra y Saxena, 2009). Se ha demostrado que el uso del follaje y frutos de plantas arbóreas y leguminosas forrajeras que contienen taninos y saponinas, presentan un alternativa potencial en la disminución de las emisiones de metano (Animut *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Beacheimin *et al.*, 2008), además, de beneficiar el metabolismo ruminal del nitrógeno (Waghorn *et al.*, 2002). Este efecto se presenta ya que dichos metabolitos, actúan sobre los metanógenos y protozoarios ciliados, reduciendo la degradación de la materia orgánica del alimento en el rumen y modificando la fermentación ruminal. Se ha demostrado un cambio en la proporción de ácidos grasos volátiles caracterizada por un incremento en la formación de propionato y una disminución en la producción de acetato, lo que sugiere un efecto anti-metanogénico (Busquet *et*

al., 2006; Patra y Saxena, 2010). De igual forma, el uso *in vitro* de 45 g/Kg MS, del extracto de saponinas de *Yucca schidigera* (6.0%) y *Quillaja saponaria* (3.0%) causa la reducción en la producción de metano, 194.7 y 193.5 mL/g MS respectivamente (Holtshausen *et al.*, 2009). El follaje de *Enterolobium cyclocarpum* (200 g/Kg MS de la dieta) redujo la concentración de protozoarios ciliados durante los días 4 (5×10^5 /ml líquido ruminal) y 11 (4.1×10^5 /ml líquido ruminal), 49-75% respectivamente (Ivan *et al.*, 2004). En un experimento con vaquillas alimentadas con una dieta testigo a base de grano de cebada, ensilaje de cebada y harina de canola y tres tratamientos en donde el grano se reemplazó por extracto de quillaja (*Quillaja saponaria*), quebracho (*Schinopsis balansae*) o aceite de cártamo (*Carthamus tinctorius*), se determinó una concentración de protozoarios de 1.87×10^6 /ml fluido ruminal en el tratamiento testigo, mientras que la sustitución con aceite de cártamo redujo en 54% el número de protozoarios, el efecto desfaunante fue menor con quebracho 24% y la quillaja 34% (Baah *et al.*, 2007). En un experimento realizado por Liu *et al.* (2011) determinaron que los taninos de castaña (*Castanea sp.* = CT) disminuye las emisiones de metano en ovejas ($P < 0.05$) con la inclusión de 30 gCT/Kg de MS, se redujo la producción de este gas a 23.58 g CH₄/Kg materia seca consumida, en comparación con el tratamiento control y tratamiento con 10 gCT/Kg, cuyos valores de producción de metano fueron de 31.07 gCH₄/Kg materia seca consumida y 29.91 gCH₄/Kg MS consumida, respectivamente. Los resultados descritos, confirman la importancia de usar recursos vegetales disponibles como las plantas nativas, leguminosas forrajeras y subproductos agrícolas para desfaunar y disminuir las emisiones de metano en rumiantes, con la ventaja de que pueden ser incorporados a la dieta sin tener un impacto negativo en la salud y eficiencia productiva de los rumiantes.

Para evaluar el potencial de desfaunación con diferentes recursos vegetales de una región, es necesario iniciar con estudios *in vitro*, en los cuales se analice el efecto de las plantas o residuos agrícolas seleccionados sobre la población de los protozoarios ruminales, el tipo de fermentación (AGV) y producción de metano. Los estudios *in vitro* tienen la ventaja sobre los estudios *in vivo* de ser económicos, pudiendo evaluar varias plantas en un solo estudio. El principal factor limitante de los estudios *in vitro*, es la dificultad de mantener una concentración de protozoarios mayor a $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ del medio de cultivo por al menos 72 h de incubación; por lo que, a veces se confunde la capacidad desfaunante de una planta o un extracto vegetal, con la muerte de los protozoarios debida a la falta de un nutriente o factor de crecimiento en el medio de cultivo. , que conduce a la muerte de los protozoarios (Hino *et al.*, 1973a; Dehority, 2010; Zeitz *et al.*, 2011). Entre las condiciones físico-químicas que se deben mantener en un medio de cultivo para protozoarios están: la temperatura, 38-40°C; el pH, 6.2-7.0; y el potencial de oxido reducción, -250 y -400 mV. Además, la adición de antibióticos de amplio espectro como la penicilina, estreptomina, dihidroestreptomina, y neomicina (Vogels y Stumm, 1980; Hans-Dieter, 2006; Tóthová *et la.*, 2008), permite que las bacterias ruminales presentes en el medio de cultivo se mantengan en bajas concentraciones ($\leq 10^6$ bacterias/mL), lo que permite el uso de estas bacterias como sustrato alimenticio para los protozoarios ciliados, sin que su concentración pueda disminuir la disponibilidad de otros nutrientes presentes en el medio de cultivo (carbohidratos, proteínas, entre otros) requeridos por los protozoarios (Wagtendonk y Soldo, 1970; Hino *et al.*, 1973a; Bonhomme, 1990; Dehority, 2010). Un sustrato comúnmente usado como fuente de nutrientes en medios de cultivo para protozoarios es la alfalfa (*Medicago sativa*). Esta leguminosa, normalmente se agrega molida al medio de cultivo, debido a la capacidad de los protozoarios ciliados (p.ej. *Entodinium spp*, *Epidinium*) para consumir pequeñas partículas de

alimento, que son transformados en monómeros y fermentadas por la acción de diferentes enzimas vacuolas digestivas y en los hidrogenosomas de los protozoarios (Dehority, 2010). También se ha determinado que la adición de almidón vitaminas del complejo B, β -sitosterol y minerales estimulan la sobrevivencia y crecimiento de estos microorganismos (Hino *et al.*, 1973b; Hino *et al.*, 1973c). La adición de compuestos proteínicos como la tripticasa de peptona, el extracto de levadura, la proteína de huevo y la caseína, han mostrado favorecer el crecimiento de protozoarios ruminales. También el uso de soluciones minerales y salinas que permiten establecer un medio isotónico, y soluciones reductoras e indicadores de esta reacción (p. ej. cisteína-HCl y resazurina, respectivamente; Hino *et al.*, 1973a; Hino *et al.*, 1973b; Hino *et al.*, 1973c; Dehority, 2010; Ley De Coss *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se determinó la capacidad desfaunante *in vitro* de diferentes plantas y residuos agrícolas. Entre las plantas evaluadas se encuentran: Chicalote (*Argemone ochroleuca*), seleccionada por la presencia de alcaloides con efectos inhibitorios (50%) en el crecimiento de protozoarios patógenos (*Trypanosoma*, *Plasmodium* y *Leishemia*) (Abdel *et al.*, 2010); Cokoite (*Gliricidia sepium*), leguminosa arbustiva tropical, su follaje tiene efecto desfaunante debido a la presencia de taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos y esteroides (Galindo *et al.*, 2001); Curcimina (*Curcuma longa*), hierba buena (*Mentha spicata*), plantas de uso medicinal con posible efecto nocivo sobre protozoarios patógenos; Epazote (*Chenopodium ambrosioides*) y Marrubio (*Marrubium vulgare*) (Ley de Coss 2003); *Agave mapisaga*, *A. salmiana* var. *Salmiana*, *A. salmiana* var. *ferox*, en los agaves la presencia de saponinas puede tener un efecto desfaunante, aunque los niveles de saponinas puede disminuir durante el proceso de ensilaje (Pinos *et al.*, 2009). Los residuos agrícolas evaluados fueron, el aceite de coco (*Cocos nucifera*), a una dosis de 4.75% en una dieta de engorda (50:50 forraje/concentrado) disminuye un 22% de

la producción de metano (28.3 g/Kg materia seca consumida control vs 21.1 g/Kg materia seca consumida con aceite) un efecto que puede estar asociada a la desfaunación ruminal (Jordan *et al.*, 2006); los subproductos del café (*Coffea arabica*) cascarilla, cascabillo y pulpa, de los cuales no se conoce resultados acerca del efecto desfaunante, comprende aproximadamente el 45% del grano completo de café (Esquivel y Jiménez, 2012) el uso directo de estos subproductos para la alimentación animal es limitado, debido a los factores anti-nutricionales y anti-fisiológicos (p. ej. taninos y cafeína) (Ulloa *et al.*, 2002); la harina de la semilla de Jatropha (*Jatropha curcas*), después de la extracción del aceite, este subproducto contiene toxoalbumina curcina, ésteres de forbol, terpenos, polifenoles y taninos (Llelaboye y Pikuda, 2009), los cuales pueden tener un efecto nocivo sobre los protozoarios ruminales; torta de Higuierilla (*Ricinus communis*), que tiene un efecto inhibitorios del 50% a nivel *in vitro* sobre protozoarios patógenos de los géneros *Trypanosoma*, *Plasmodium* y *Leishemia* (Abdel *et al.*, 2010). Para estimar la capacidad desfaunante de las plantas y los subproductos seleccionados se realizó el conteo de protozoarios viables, de igual forma se determino el efecto en la producción de metano, dióxido de carbono y en la producción y proporción de ácidos grasos volátiles por medio de la técnica de cromatografía de gases.

1.2 LITERATURA CITADA

Abdel, S. E., L. Maes, and S. M. Mahmoud. 2010. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas disease. *Phytotherapy Research* 24: 1322-1328.

- Anderson, R. C., N. A. Krueger, T. B. Stanto, T. R. Callaway, T. S. Edrington, and R. B. Harvey. 2008. Effects of select nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *Bioresource Technology* 99: 8655-8661.
- Animut, G., R. Puchala, A. L. Goetsch, A. K. Patra, T. Sahlu, V. H. Varel, and J. Wells, 2008. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 144: 228-241.
- Baah, J., M. A. N. Ivan, Hristov, K. M. Koenig, L. M. Rode, and T. A. McAllister. 2007. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. *Animal Feed Science and Technology* 137: 126-137.
- Beauchemin, K. A., and S. M. McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science* 83: 653-661.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 21-27.
- Bełżecki, G., R., Miltko, E. Kwiatkowska, and T. Michałowski. 2010. Mureinolytic Ability of the Rumen Ciliate. *Diploplastron affine*. *Folia Microbiologica* 55 (4):312-314.
- Blaxter, K. L., and A. K. Martin. 1962. The utilization of protein as a source of energy in fattening sheep. *British Journal of Nutrition* 16: 397-407.
- Bonhomme, A. 1990. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Animal Feed Science and Technology* 30: 203-266

- Buddle, B. M., M. Denis, G. T. Attwood, E. Altermann, P. H. Janssen, R. S. Ronimus, C. S. Pinares-Patiño, S. Muetzel, and D. N. Wedlock. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal* 188: 11-17.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 89:761-771.
- Cord-Ruwisch, R., H. J. Sietz, R. Conrad. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology* 149: 350-357.
- Czerkawski, J. W. 1969. Methane production in ruminants and its significance. *World Review of Nutrition & Dietetics* 11: 240-282.
- Dehority, B. A. 2010. Physiological characteristics of several rumen protozoa grown *in vitro* with observations on within and among species variation. *European Journal of Protosology* 46: 271-279.
- Demeyer, D. I. 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agriculture and Environment* 6: 295-337.
- Dong, Y., H. D. Bae, T. A. MaAllister, G. W. Mathison, and K. J. Cheng. 1999. Effects of exogenous fibrolytic enzymes. 2-bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in rumen simulation (RUSITEC) system. *Canadian Journal of Animal Science* 79. 491-498.
- Esquivel, P., V. M. Jiménez. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46: 488-495.

- Finlay, B. J., G. Esteban, K. J. Clarke, A. G. Williams, T. M. Embley, and R. P. Hirt. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 117: 157-162.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003. *World Agriculture: Towards 2015/2030. An FAO Perspective*. FAO. Rome. Italy. 97 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2008. *The State of Food Insecurity in the World*. <<http://www.fao.org/docrep/011/i0291e/i0291e00.htm>>.
- Galindo, J., Y. Marrero, N. González, y A. I. Aldama., 2001. Efecto de *Gliricidia sepium* en la población protozoaria y organismos celulolíticos ruminales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* Tomo 35 3:235 -239.
- Gijzen, H. J., H. J. Lubberding, M. J. Gerhardus, and G. D. Vogels, 1988. Contribution of rumen protozoa to fiber degradation and cellulose activity in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 53: 35-44.
- Grainger, C., and K.A Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 308-320.
- Guan, H., K. M. Wittenberg, K. H Ominski, and D. O. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science* 84: 896-1906.
- Guo, Y. Q., J. X. Liu, Y. Lu, W. Y. Zhu, S. E. Denman, and C. S. McSweeney, 2008. Tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47: 421-426.

- Hall, M. B. 2010. Isotrichid protozoa influence conversion of glucose to glycogen and other microbial products. *Journal of Dairy Science* 94:4589-4602.
- Hans-Dieter, G. 2006. Symbiotic Associations between ciliates and prokaryotes. *Prokaryotes* 1:364-402.
- Hegarty, R.S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agriculture Research* 50: 1321-1327.
- Hino, T., M. Kametaka, and M. Kandatsu. 1973a. The cultivation of rumen oligotrich protozoa II. Growth of *Entodinia* in vitro. *The Journal of General and Applied Microbiology* 19: 325-337.
- Hino, T., M. Kametaka, and M. Kandatsu. 1973b. The cultivation of rumen oligotrich protozoa III. White clover factors which stimulate the growth of entodinia *The Journal of General and Applied Microbiology* 19: 397-413.
- Hino, T., M. Kametaka, and M. Kandatsu. 1973c. The cultivation of rumen *Oligotrich* protozoa. I. Factors influencing the life of *Entodinia*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 19: 305-315.
- Holtshausen, L., A. V. Chaves, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, , T. A. McAllister, N. E. Odongo, P. R. Cheeke, and C. Benchaar. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92: 2809-2821.
- Hook, S. E., A. G. Wright, and B.W. McBride. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* article ID 945785. 11 p.
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press. New York. NY. USA. 533p.

- Hungate, R.E., W. Smith, T. Bauchop, I. Yu, and J.C. Rabinowitz. 1970. Formate as an intermediate in the rumen fermentation. *Journal of Bacteriology* 102: 384-397.
- Ivan, M., K. M. Koenig, B. Teferedegne, C. J. Newbold, T. Entz, L. M. Rodea, and M. Ibrahim. 2004. Effects of the dietary *Enterolobium cyclocarpum* foliage on the population dynamics of rumen ciliate protozoa in sheep. *Small Ruminant Research* 52:81-91.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology* 160:1-22.
- Janssen, P.H., and M. Kirs. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3619-3625.
- Joblin, K., 1999. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* 50:1307-1313.
- Johnson, K. A., and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73:2483-2492.
- Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan., J. Callan, B. Flynn, and F. P. O'Mara. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science* 84: 162-170.
- Jouany, J. P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition* 126:1335S-1346S.
- Jouany, J. P., D. I. Demeyer, J. Grain. 1988. Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21:229-265.
- Knight, T., R.S. Ronimus, D. Dey, C. Tootill, G. Naylor, P. Evans, G. Molano, A. Smith, M. Tavendale, C.S. Pinares-Patiño, and H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen

methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Animal Feed Science and Technology* 166-167:101-112.

Ley de Coss, A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos y plantas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-74

Ley de Coss, A., M. A. Cobos, D. Hernández, y E. Guerra. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *FCV-LUZ XXI*. 1:4349.

Lincoln, R.J., G. A. Boxshall, and P. F. Clark. 2009. Diccionario de Ecología. Evolución y Taxonomía. Segunda edición. Cambridge University Press 169p.

Liu, H., V. Vaddella, D. Zhou. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of Dairy Science* 94:6069-6077.

Llelaboye, N. O. A., and O. O. Pikuda. 2009. Determination of minerals and antinutritional factors of some lesser-known crop seeds. *Pakistan Journal of Nutrition* 8:1652-1656.

Marczak, R., T. E. Gorrell, M. Muller. 1983. Hydrogenosomal Ferredoxin of the Anaerobic Protozoon. *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Biological Chemistry* 258 (20):12427-12433.

Mc Geough, E. J., P. O'Kiely, K.J. Hart, A. P. Moloney, T. M. Boland, and D. A. Kenny, 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *Journal of Animal Science* 88:2703-2716.

- McAllister, T.A., and C. J. Newbold, 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48:7-17.
- Morgavi, D.P., J. P. Jouany, and C. Martin, 2008. Changes in methane emissions and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 69-72.
- Moss, A.R., J. P. Jouany, and C.J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales De Zootechnie*. 49:231-253.
- Newbold, C.J., B. Lassalas, and J. P. Jouany, 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology* 21:230-234.
- Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Society Press. Tokio, Japan. pp. 157-168.
- Orpin, C.G., and A. J. Letcher, 1984. Effect of absence of ciliate protozoa on rumen fluid volume flow rate and bacterial population in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 10:145-151.
- Ozutsumi, Y., K. Tajima, A. Takenaka, H. Itabashi. 2006. Real-Time PCR detection of the effects of protozoa on rumen bacteria in cattle. *Current Microbiology* 52:158-162.
- Patra A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363-375.
- Patra A. K. and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71:1198-1222.

- Pinares-Patiño, C.S., M.J. Ulyatt, C. W. Holmes, T. N. Barry, K. R. Lassey. 2003. Persistence of the between-sheep variation in methane emission. *Journal of Agricultural Science* 140:227-233.
- Pinos, J.M., M. Zamudio, S.S. Gonzalez, G. D. Mendoza, R. Barcena, M. E. Ortega, L. A. Miranda. 2009. Effects of maturity and ensiling of *Agave salmiana* on nutritional quality for lambs. *Animal Feed Science and Technology* 152:298-306.
- Robertson, L. J., and G. C. Waghorn, 2002. Dairy industry perspectives on methane emissions and production from cattle fed pasture or total mixed rations in New Zealand. *New Zealand Society of Animal Production* 62:213-218.
- Shu, Q., S. H. Bir, H. S. Gill, E. Duan, Y. Xu, M. A. Hiliard, and J. B. Rowe. 2001. Antibody response in sheep following immunization with *Streptococcus bovis* in different adjuvants. *Veterinary Research Communication*. 25:43-54.
- Stumm, C.K., H. J. Giszen, and G. D. Vogels. 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition* 47:95-99.
- Tokura, M., K. Ushida, K. Miyazaki, Y. Kojima, 1997. Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology* 22:137-143.
- Tóthová, T., M. Píknová, S. Kišidayová, P. Javorský, and P. Pristaš. 2008. Distinctive Archaeobacterial Species Associated with Anaerobic Rumen Protozoan *Entodinium caudatum*. *Folia Microbiologica*. 53 (3):259-262.
- Trei, J.E., R.C. Parish, Y.K. Singh, and G.C. Scott. 1972. Effect of methane inhibitors on rumen metabolism and feedlot performance of sheep. *Journal of Dairy Science* 54:536-540.

- Ulloa, J. B., A. J. Verreth, J. H. Van Weerd, and E. A. Huisman, (2002). Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99:195-204.
- Vogels, G. D. and C. Stumm. 1980. Interaction between methanogenic bacteria and hydrogenic ciliates in the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* 46:108-111.
- Waghorn, G.C., M.H. Tavendale, and D.R. Woodfield. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 64:167-171.
- Wagtendonk W.J. and A.T. Soldo 1970. Chapter 6. Methods used in the axenic cultivation of *Paramecium aurelia*. David M. Prescott. *Methods in cell Biology*. Academic Press. 4: 117-130.
- Williams, A.G. and G.S. Coleman. 1992. The rumen protozoa. *Brock Springer Serie in Contemporary Bioscience*. Springer-Verlag. New York Inc. pp. 133-164.
- Wright, A.G. and A.V. Klieve. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology* 166-167:248- 253.
- Yarlett, N., D. Lloyd, and A.G. Williams, 1982. Respiration of the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Biochemical Journal*. 206:259-266.
- Yokoyama, M. T. y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e Intestino delgado. In: Church, D. C. (Ed). *El Rumiente, Fisiología y Nutrición*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 137-57.
- Zeitz, J.O., L. Meile, T. Michałowski, M. Kreuzer, and C. R. Soliva. 2011. Suitability of different media for in vitro cultivation of the ruminal protozoa species *Entodinium caudatum*, *Eudiplodinium maggii*, and *Epidinium ecaudatum*. *European Journal of Protistology* 47: 314-317.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad desfaunante *in vitro* de las plantas y subproductos agrícolas y su efecto en algunas variables de fermentación ruminal, población de microorganismos ruminales y la producción de dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄).

2.2.1 Objetivos Particulares

Estimar el efecto de la capacidad desfaunante de las plantas y los subproductos de cosecha sobre la concentración de protozoarios íntegros y la población de bacterias totales a diferentes horas de incubación.

Determinar el valor de pH y la concentración de ácidos grasos volátiles en el medio de cultivo, a diferentes tiempos de incubación.

Evaluar el efecto de la planta Chicalote (*Argemone ochroleuca*) y el subproducto, cascabillo de café (*Coffea arabica*), sobre la producción de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) y la degradación *in vitro* de la materia seca.

2.2 Hipótesis Particulares

- Las plantas y los subproductos agrícolas seleccionados, tienen capacidad de disminuir la población de protozoarios en condiciones *in vitro* después de 24, 48, 72 y 96 h de incubación.

- Las plantas y subproductos agrícolas seleccionados por su alta capacidad desfaunante disminuyen la producción total de biogás, metano (CH₄) y de dióxido de carbono (CO₂).
- La desfaunación que se logra con las plantas y los subproductos de cosecha seleccionados puede modificar la proporción de ácidos grasos volátiles favoreciendo la formación de propionato.
- Las plantas y subproductos agrícolas seleccionados disminuyen la producción de metano, pero tienen un efecto negativo, no deseado, sobre la degradación *in vitro* de la dieta.

CAPITULO III

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DESFAUNANTE DE PLANTAS Y SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS

3.1 RESUMEN

La desfaunación con plantas y subproductos agrícolas es una alternativa para mitigar las emisiones de metano producidas durante la fermentación ruminal del alimento. Los protozoarios del rumen no producen metano, pero la desfaunación disminuye la población de metanógenos adheridos a estos microorganismos. En el presente estudio se evaluó *in vitro* la capacidad desfaunante de 11 plantas, seis subproductos agrícolas y del desparasitante Secnidazol®. Como tratamiento testigo se usó un medio de cultivo para protozoarios, este medio permite mantener al menos 1×10^4 protozoarios/mL⁻¹ de medio de cultivo durante 96 h de incubación. Las variables estimadas fueron el pH del medio a las 72 h de incubación, y la concentración de protozoarios viables a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. A las 72 h de incubación, las plantas que mostraron mayor capacidad desfaunante ($P < 0.05$) fueron: *Agave mapisaga*, *Agave salmiana* var. *salmiana*, *Agave salmiana* var. *ferox*, *Argemone ochroleuca* (follaje y semilla), *Chenopodium ambrosioides*. Al mismo tiempo de incubación, los subproductos agrícolas con mayor capacidad desfaunante fueron la harina de jatrofa (*Jatropha curcas*) y el cascabillo del café (*Coffea arabica*).

Palabras claves: Rumen, protozoarios, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The use of plants and agricultural by-products for rumen defaunation is an alternative to reduce the methane emissions generated during the ruminal fermentation of the feedstuffs. The rumen protozoa do not produce methane, but the defaunation decreases the population of methanogens attached to these microorganisms. In this experiment, the *in vitro* defaunation capacity of 11 plants, six agricultural by-products, and the Secnidazol[®] drug was evaluated. The control treatment was a culture medium for rumen protozoa. This medium allows to maintain at least 1×10^4 protozoa/mL⁻¹ of the culture medium during 96 h of incubation. The plants with the highest defaunation capacity ($P < 0.05$) were: *Agave mapisaga*, *Agave salmiana* var. *salmiana*, *Agave salmiana* var. *ferox*, *Argemone ochroleuca* (leaves and seeds), *Chenopodium ambrosioides* after 72 h of incubation. At the same time of incubation, the agricultural by-products jatropa meal (*Jatropha curcas*) and te coffe husk (*Coffea arabica*) showed the highest defaunation effect.

Key words: Rumen, protozoa, secondary metabolites

3.2 INTRODUCCIÓN

La desfaunación se puede lograr mediante el uso de fármacos, halógenos, aceites esenciales y metabolitos secundarios presentes en diferentes plantas (Guan *et al.*, 2006; Hook *et al.*, 2010; Patra y Saxena, 2010; Ley de Coss *et al.*, 2011). El Secnidazol[®] es un desparasitante para humanos, pero a mostrado una efectividad desfaunante del 100% a partir de las 24 h de incubación (Ley de Coss *et al.*, 2011). Este desparasitante pertenece al grupo de los nitroimidazoles, fármacos de amplio espectro que también eliminan bacterias ruminales como *Veiollonella sp*, *Clostridium butyricum* y *Clostridium perfringens* (Wüst, 1977), además de nematodos y protozoarios anaerobios. En condiciones anaerobias, el Senidazol[®] causa daños en

el ADN cuando el grupo nitrito (NO₂) del fármaco se reduce, provocando el rompimiento de los enlaces fosfodiéster que unen y forman la cadena de nucleótidos del ADN (Edwrda, 1980).

También se han usado antibióticos ionóforos como desfaunantes (p. ej. Monensina sódica), sin embargo, a partir del 2003 la legislación de la Unión Europea (1813/2003; EC, 2003) prohibió el uso de promotores del crecimiento y antibióticos en animales (Hart *et al.*, 2008); por tanto, el uso plantas o extractos naturales con metabolitos secundarios es una alternativa de desfaunación para un sistema productivo sostenible (Patra y Saxena, 2009). En diferentes plantas y subproductos agrícolas se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios con capacidad desfaunante. Por ejemplo, la planta chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) contiene flavonoides y alcaloides (Chemler *et al.*, 2009) que le confieren capacidad inhibitoria contra protozoarios (Abdel *et al.*, 2010) y algunas bacterias patógenas (Reyes *et al.*, 2011). Taninos condensados presentes en el cocoite (*Gliricidia sepium*) y el guácimo (*Guazuma ulmifolia*) (Galindo *et al.*, 2001), tienen un alto peso molecular y la capacidad de precipitar proteínas (Haslam, 1988; Patra y Saxena, 2010). Estudios *in vitro* han mostrado que la adición de 15 y 30% MS del follaje de *G. sepium*, causa la disminución (P<0.05) de la población de protozoarios ruminales (Galindo *et al.*, 2001). También podemos encontrar taninos en los subproductos del café (*Coffea arabica*), incluyendo la cascarilla, el cascabillo y la pulpa, que en conjunto representan alrededor del 45% del grano completo de café (Esquivel y Jiménez, 2012). De estos subproductos del café, no se encontraron referencias sobre su posible actividad desfaunante, aunque es sabido, que el uso directo de estos subproductos en la alimentación animal es limitado debido a los factores anti-nutricionales y anti-fisiológicos (p. ej. taninos y cafeína; Ulloa *et al.*, 2002). Los aceites esenciales clasificados como alcoholes, esterres o aldehídos derivados de fenilpropanoides y terpenoides (Greathead, 2003), presentan afinidad por los lípidos, alterando la membrana citoplasmática y las proteínas

de transporte citoplasmáticas, como resultado, aumenta la permeabilidad de la membrana, ocasionando la salida de los componentes citoplasmáticos y el agotamiento de la fuerza motriz de protones (Burt, 2004). Se estima que los aceites presentes en las plantas curcumina (*Curcuma longa*), hierba buena (*Mentha spicata*) pueden tener un efecto desfaunante (Ando *et al.*, 2003). En tanto que el epazote (*Chenopodium ambrosioides*) y el marrubio (*Marrubium vulgare*), pueden presentar un efecto desfaunante ($P < 0.05$) entre las 24 y 72 h de incubación, pero se requiere confirmar los resultados obtenidos por Ley de Coss (2003). El aceite de coco (*Cocos nucifera*) a una dosis de 4.75% en una dieta de engorda (50:50 forraje/concentrado) disminuyo un 22% de la producción de metano (28.3 g/Kg MS consumida control vs 21.1 g/Kg MS consumida con aceite) un efecto que puede estar asociado a la desfaunación ruminal (Jordan *et al.*, 2006). Las saponinas, son glucósidos de alto peso molecular, en los que, los azúcares están unidos a una aglicona hidrófoba, sapogenina (Jung *et al.*, 2004) y pueden formar complejos con los esteroides presentes en la membrana celular del protozoarios causando su destrucción (Francis *et al.*, 2002). Se ha reportado que el contenido de saponinas en plantas de agave disminuyen cuando se ensila este forraje (Pinos *et al.*, 2009); sin embargo, se desconoce si en el forraje fresco de diferentes especies de agave (*Agave mapisaga*, *A. salmiana* var. *Salmiana* y *A. salmiana* var. *ferox*) tienen efecto desfaunante. Lo que se ha confirmado en otras plantas, por ejemplo, la adición de 77 ppm de saponina esteroideal de *Yucca schidigera* disminuye el número de protozoarios (Valdez *et al.*, 1986). Resultados similares se han obtenido con extractos líquidos de *Y. schidigera* y *Q. saponaria* en dosis de 2 y 6 mL/L de solución ruminal; además, se determino un aumento en la producción de amonio, propionato y un cambio en la relación de acético:propiónico (Pen *et al.*, 2006). Los subproductos agrícolas harina de *Jatropha curcas* y la torta de ricino (*Ricinus communis*) contienen diferentes metabolitos secundarios como

toxalbumina curcina, ester de forbol, terpenos, polifenoles, taninos y alcaloides (Llelaboye y Pikuda, 2009; Abdel *et al.*, 2010). No se encontraron estudios sobre la capacidad desfaunante de estos residuos agrícolas, pero considerando su alta disponibilidad (desecho de la producción de biocombustibles), es importante caracterizarlos, ya que existe el interés de reciclarlos como alimento para rumiantes. En este experimento se realizó una evaluación de las plantas y los subproductos agrícolas anteriormente mencionados con el fin identificar su potencial para eliminar o disminuir la población de protozoario ciliados del rumen y seleccionar aquellas con alta capacidad desfaunante.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

3.3.2. Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios

El medio de cultivo usado en el experimento tuvo como componentes principales glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR), y se adiciono penicilina y estreptomycin para limitar el crecimiento de bacterias ruminales. La composición exacta del medio de cultivo GCA-FR se describe en el cuadro 3.1. Los medios fueron preparados usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate (1950). En tubos de cultivo de 18X150 mm que contenían 0.01 g del sustrato a evaluar (planta o residuo agrícola) se adicionaron 9 mL de medio de cultivo GCA-FR. Además, a cada tubo se le adicionaron 100 μ L/9 mL medio de cultivo, de una solución de

antibióticos (HIDRO-PEN[®]) que contiene 25 mg mL⁻¹ de estreptomicina y 20,000 UI mL⁻¹ de penicilina (Ley de Coss, 2003).

3.3.3. Plantas y subproductos agrícolas con capacidad desfaunante.

Las once plantas y los seis subproductos de cosecha evaluados se indican en el cuadro 3.2. Estos sustratos fueron deshidratados por 48 h en una estufa de secado a 60°C, posteriormente se molieron en un molino Willey (criba de 1 mm) y se pulverizaron en un mortero (Fritsch). Para el experimento se agregaron 0.01 g de cada sustrato en 9 mL de medio de cultivo. Las muestras de plantas y los subproductos de cosecha fueron recolectados en la región de Texcoco y en los Estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz.

Cuadro 3.1 Composición del medio cultivo GCA-FR usado para estimar la concentración y supervivencia de protozoarios ciliados del rumen.

Compuesto	Cantidad/100 mL de medio		
	Medio GCA-FR	Medio PSD*	Medio FD**
Agua destilada	47.42 mL	47.42 mL	47.42 mL
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL
Solución mineral I ⁽²⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución mineral II ⁽³⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Carbonato de sodio. solución 8% ⁽⁴⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Acetato de sodio. 1.5 % ⁽⁵⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución sulfito-cisteína ⁽⁶⁾	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.20 g	0.20 g	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g	0.10 g	0.10 g
Glucosa	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Celobiosa	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Almidón	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Planta ó residuo agrícola	----	0.1 g	----
Secnidazol [®]	----	----	6.5 g

(1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10.000 rpm. por 15 minutos a 4 °C. esterilizado 20 minutos a 15 psi. 121°C; (2) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K₂HPO₄; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂·H₂O; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 1.5 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S·9H₂O (en 100 mL de H₂O); (7) 0.1 mL de rezarsurina en un volumen final de 100 mL. calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.* Plantas y subproductos de cosecha con capacidad desfaunante (ver cuadro 3.2).** Fármaco desparasitante

3.3.4. Fármaco desfaunante (FD)

El fármaco utilizado fue el Secnidazol[®], el cual se adicionó a los medios de cultivo siguiendo el procedimiento descrito por Ley de Coss (2003) y Donato (2006) y se agregó en una cantidad de 0.65 mg de Secnidazol[®]/9 mL⁻¹ de medio de cultivo (Ley de Coss *et al.*, 2011).

Cuadro 3.2. Plantas y subproductos agrícolas evaluados con potencial desfaunante.

Plantas	
Nombre común	Nombre científico
Chicalote Blanco (Follaje)	<i>Argemone ochroleuca</i>
Chicalote Blanco (Semilla)	<i>Argemone ochroleuca</i>
Cocoite	<i>Gliricidia sepium</i>
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>
Epazote	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
Guacimo	<i>Guazuma ulmifolia</i>
Hierba buena	<i>Mentha spicata</i>
Maguey	<i>Agave mapisaga.</i>
Maguey	<i>Agave salmiana var. salmiana.</i>
Maguey	<i>Agave salmiana var. ferox.</i>
Marrubio	<i>Marrubium vulgare</i>
Subproductos agrícolas	
Nombre común	Nombre científico
Aceite de coco	<i>Cocos nucifera</i>
Cascarilla de café	<i>Coffea arabica</i>
Cascabillo de café	<i>Coffea arabica</i>
Harina de Jatropha	<i>Jatropha curcas</i>
Pulpa de café	<i>Coffea arabica</i>
Torta de Higuera	<i>Ricinus communis</i>

3.3.5. Recuperación de protozoarios

El fluido ruminal (FR) se obtuvo entre las 8:00-9:00 de la mañana, de un toro Holstein fistulado de 2.5 años de edad. El FR se filtró con una tela de manta con el fin de eliminar partículas grandes de alimento. Posteriormente, se depositó (500 mL) en un embudo de separación y se colocó en una incubadora a 39°C hasta que se precipitaron los protozoarios que se observan como un anillo blanquecino en el fondo del embudo (tiempo aproximado de 15 min). De la masa

de protozoarios precipitados (anillo blanquecino) se tomaron, en promedio, 5 mL y se depositaron bajo flujo de CO₂, en un tubo de cultivo 18X150 que contenía 5 mL del medio de cultivo GCA-FR. Una gota de esta mezcla se depositó por capilaridad en las dos cuadrículas de la cámara Neubauer, y se realizó el conteo de protozoarios de acuerdo a la técnica descrita por Ogimoto y Imai (1981). Una vez conocida la concentración de protozoarios por mL del medio de recuperación, se calcula la cantidad que se debería agregar en los diferentes tratamientos y sus repeticiones, para asegurar una concentración inicial de protozoarios (hora “cero” de incubación) igual o mayor a $1 \times 10^5 / \text{mL}^{-1}$ del medio de cultivo.

3.3.6 Técnica de inoculación de los medios de cultivo

Antes de la inoculación con los protozoarios, los tubos de cultivo anaerobio que contenían el medio GCA-FR y el sustrato a evaluar se mantuvieron a una temperatura de 39°C y se les agregó la mezcla de antibióticos descrita anteriormente. La inoculación de los medios de cultivo con el concentrado de protozoarios viables (1 mL/9 mL de medio de cultivo), se realizó bajo flujo de CO₂. Para realizar el conteo y determinar la concentración de protozoarios existentes en el medio de cultivo se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio de contrastes (Zeiss, Axiostar) a 400X de magnificación (Ogimoto y Imai. 1981), el conteo se realizó a las 0, 24, 48, 72 h de incubación.

3.3.7 Conteo de protozoarios viables

Debido a su gran movilidad, es difícil contar protozoarios viables en la cámara Neubauer, por lo que se procedió a considerar como protozoarios viables a aquellos protozoarios que mantuvieron su integridad morfológica después de ser fijados en una solución de formaldehído al 10%. En la

figura 1.1 se nota la facilidad de distinguir al microscopio protozoarios viables de no-viables de acuerdo a su morfología.

Se estimó la concentración de protozoarios por mL del medio de cultivo de cada tratamiento a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación. En cada tiempo, se extrajo con una pipeta Pasteur 0.5 mL de medio inoculado con protozoarios y se deposito por capilaridad en las dos cuadrículas que conforman la cámara de conteo Neubauer, posteriormente se observó en un microscopio de contraste modelo Axiostar (Zeiss) a 400X magnificaciones. El conteo de protozoarios se realizó en ocho cuadrantes (cuatro de cada cuadrícula) que tienen un área de 1mm^2 . El número de protozoarios por mL de medio de cultivo se estima de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoarios mL}^{-1} = (\text{X}) * (\text{FD}) * (10^4)$$

Donde:

X = media de los conteos de protozoarios en ocho cuadrantes (1mm^2) de la cámara Neubauer.

FD = valor inverso de la dilución usada.

10^4 = Factor de corrección del volumen muestreado para conversión de datos a un volumen de 1 mL.

3.3.8 pH ruminal.

Se midió el pH a las 0 y 72 h de incubación de iniciado el experimento, con un potenciómetro marca ORION 250, calibrado a dos buffers (pH 4 y 7).

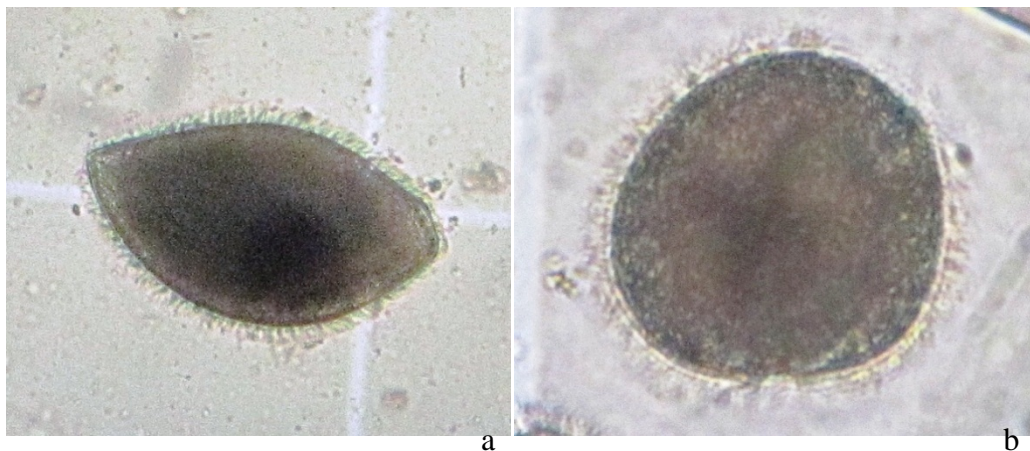


Figura 1.1. Fotos de protozoarios del género *Isotrichia* fijados con formaldehído al 10%. a) protozoario viable, mostrando integridad morfológica de su ectodermo, b) Protozoario no viable, mostrando turgencia celular y pérdida de su morfología.

3.3.9 Diseño y análisis estadístico

Para la selección de las plantas y subproductos de cosecha que presentaran capacidad desfaunante, se organizaron tres grupos al azar, cada uno con sus respectivos tratamientos, testigo y fármaco desfaunante, siendo las variables evaluadas en cada una de las tres repeticiones, el conteo de protozoarios íntegros y el valor del pH de los respectivos medios de cultivo de cada tratamiento. Para el análisis de los datos del conteo de protozoarios íntegros, se utilizó un modelo de regresión binomial negativa, realizando la comparación de medias por el método de Bonferroni ($P < 0.05$, SAS, 2002). La variable de pH fue analizada por medio de un diseño completamente al azar (GLM; SAS, 2002) y la diferencia entre medias se estimó por el método de Tukey ($P < 0.05$).

3.4 RESULTADOS

Del primer grupo evaluado, solamente la planta de *G. sepium* presentó capacidad desfaunante ($P < 0.05$) a partir de las 24 h de incubación. A partir de las 48 h de incubación, la torta de higuera (*R. communis*) presentó actividad desfaunante.

Cuadro 3.3 Efecto de los tratamientos del grupo 1 sobre la concentración de protozoarios viables (10^4 mL⁻¹ del medio de cultivo a diferentes horas de incubación y pH del medio a las 0 (inicial) y 72 h (final)

Tratamiento	Tiempo (horas de incubación)				pH	
	0	24	48	72	Inicial	Final
<i>A. sativa</i>	13.2 ^a	18.3 ^a	9.1 ^a	12.1 ^a	6.35 ^d	6.25 ^d
<i>G. ulmifolia</i>	10.1 ^a	9.1 ^a	17.6 ^a	4.7 ^a	6.45 ^b	6.35 ^b
<i>M. spicata</i>	7.0 ^a	10.6 ^a	13.2 ^a	6.5 ^a	6.42 ^b	6.32 ^{bc}
<i>M. vulgare</i>	7.1 ^a	8.1 ^a	5.8 ^a	5.4 ^a	6.35 ^d	6.25 ^d
<i>G. sepium</i>	7.5 ^a	2.8 ^b	2.0 ^b	2.0 ^a	6.38 ^{cd}	6.28 ^{cd}
<i>R. communis</i> (torta)	4.46 ^b	5.4 ^a	2.1 ^b	2.6 ^a	6.38 ^{cd}	6.28 ^{cd}
Secnidazol [®]	7.9 ^a	1.0 ^b	0.2 ^b	0.0 ^b	6.46 ^b	6.36 ^b
<i>C. nucifera</i> (aceite)	14.4 ^a	12.2 ^a	7.1 ^a	4.1 ^a	6.54 ^a	6.44 ^a
GCA-FR	10.0 ^a	8.4 ^a	4.7 ^a	7.8 ^a	6.54 ^a	6.44 ^a
EEM±	1.0	2.1	1.2	1.3	0.02	0.01

^{a b c d} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas (P<0.05)

A las 72 h de incubación, solamente el tratamiento con Secnidazol[®] (testigo positivo de desfaunación) presento actividad desfaunante (P<0.05), la cual se presento desde las 24 h de incubación. Mientras que, el tratamiento con avena (*A. sativa*) molida (tratamiento testigo) mantuvo una concentración de protozoarios de 12.1×10^4 mL⁻¹ de medio de cultivo después de 72 h de incubación, lo que indica, que el método usado para el cultivo de los protozoarios *in vitro* es adecuado para mantener estos microorganismos viables por al menos 72 h de incubación. Por tanto, la disminución en la concentración de protozoarios de los tratamientos evaluados se debe exclusivamente al efecto de dichos tratamientos.

En el segundo grupo de plantas evaluadas, los tratamientos con los sustratos *A. mapisaga*, *A. salmina var. salmiana*, *A. salmiana var. ferox*, *A. ochroleuca* (follaje) y *A. ochroleuca* (semilla) presentaron una disminución significativa (P<0.05) en la concentración de protozoarios viables a partir de las 48 h de incubación.

Cuadro 3.4 Efecto de los tratamientos del grupo 2 sobre la concentración de protozoarios viables (10^4 mL⁻¹ del medio de cultivo a diferentes horas de incubación y pH del medio a las 0 (inicial) y 72 h (final)

Tratamiento	Tiempo (horas de incubación)				pH	
	0	24	48	72	inicial	Final
<i>A. mapisaga</i>	7.5 ^b	2.1 ^a	0.5 ^b	0.2 ^b	6.52	6.41
<i>A. salmina</i> var. <i>salmiana</i>	7.0 ^b	1.8 ^a	0.3 ^b	0.3 ^b	6.55	6.47
<i>A. salmiana</i> var. <i>ferox</i> .	8.2 ^a	2.1 ^a	0.6 ^b	0.3 ^b	6.53	6.35
<i>A. ochroleuca</i> (follaje)	7.4 ^b	1.9 ^a	0.2 ^b	0.2 ^b	6.55	6.45
<i>A. ochroleuca</i> (semilla)	7.5 ^a	1.4 ^a	0.2 ^b	0.3 ^b	6.54	6.42
GCA-FR	8.4 ^a	5.7 ^a	2.9 ^a	1.0 ^a	6.56	6.53
<i>C. ambrosioides</i>	7.3 ^b	1.3 ^a	0.9 ^a	0.1 ^b	6.60	6.50
<i>J. curcas</i> (harina)	7.9 ^a	2.7 ^a	1.3 ^a	0.4 ^b	6.58	6.51
Secnidazol [®]	7.8 ^a	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	6.58	6.6
EEM±	0.3	0.2	0.1	0.1	----	----

^{a b} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas (P<0.05)

A las 72 h de incubación, todas las plantas y residuos agrícolas evaluados presentaron capacidad desfaunante con diferencias (P<0.05) con el tratamiento testigo (GCA-FR). El Secnidazol[®] volvió a mostrar su alta capacidad desfaunante a partir de la 24 h de incubación.

Finalmente en el grupo 3, únicamente el subproducto cascabillo de café presentó capacidad desfaunante desde las 48 h de incubación (P<0.05), a las 72 horas de incubación el subproducto de cascarilla también presentó capacidad desfaunante, sin diferencias (P<0.05) con los tratamientos cascabillo y Secnidazol[®].

En general, el pH inicial y final (0 y 72 h de incubación) de los medios de cultivo en los tres grupos de plantas y residuos agrícolas evaluados, se mantuvo en valores adecuados para el crecimiento de protozoarios ruminales (superior a 6.2), por tanto, se estima que no existió un efecto negativo del pH en la viabilidad de los protozoarios ruminales.

Cuadro 3.5 Efecto de los tratamientos del grupo 3 sobre la concentración de protozoarios viables (10^4 mL⁻¹ del medio de cultivo a diferentes horas de incubación y pH del medio a las 0 (inicial) y 72 h (final)

Tratamiento	Tiempo (horas de incubación)				pH	
	0	24	48	72	Inicial	Final
GCA-FR	11.3 ^a	11.2 ^a	3.8 ^a	1.0 ^a	6.54	6.45
<i>C. arabica</i> (pulpa)	8.8 ^b	4.8 ^a	2.7 ^a	1.0 ^a	6.57	6.47
<i>C. arabica</i> (cascarilla)	10.3 ^a	2.7 ^a	1.6 ^a	0.7 ^b	6.56	6.47
<i>C. arabica</i> (cascabillo)	10.3 ^a	2.4 ^a	0.8 ^b	0.6 ^b	6.55	6.52
Secnidazol [®]	8.3 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	6.58	6.62
EEM±	1.0	0.8	0.5	0.2	----	----

^{a b} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas (P<0.05)

3.5 DISCUSION

Con relación al medio GCA-FR, la adición de glucosa al medio de cultivo para el crecimiento de protozoarios, puede generar una alta proliferación de bacterias afectando su sobrevivencia; en contraste, la adición de almidón soluble estimula el crecimiento de los protozoarios (Hino, 1973a). Aun así, la presencia de bacterias en el medio de cultivo contribuye al crecimiento de protozoarios ciliados y puede eliminar la toxicidad de algunos compuestos (p.ej. metales pesados) (Mihaliková *et al.*, 2009). En común, estos carbohidratos son fácilmente fermentables y por lo tanto promueven el crecimiento del protozoario (Hino, 1973b).

Tanto el medio con avena como el medio con GCA-FR, mantuvieron valores de pH (0 a 72 h de incubación) dentro de un rango de 6.25 a 6.54, que resulta adecuado para el crecimiento de protozoarios ciliados del rumen (Hino, 1973c). Desde las 24 h de incubación, el fármaco Secnidazol[®], usado como testigo positivo de desfaunación, presento una disminución significativa (P<0.05) en la concentración de protozoarios ruminales viables, debido al efecto citotóxico, asociado al espectro de actividad de los nitroimidazoles sobre los protozoarios anaerobios, este desparasitante ingresa al citoplasma celular, dañando la integridad del ADN como consecuencia de la reducción del grupo nitrito (NO₂). La alta capacidad desfaunante que se

determinó con el Secnidazol[®], con una efectividad de 100% a partir de las 24 h de incubación, es similar a la reportada por Ley de Coss *et al.* (2011).

Del primer grupo de plantas evaluadas únicamente se determinó actividad desfaunante (a partir de las 48 h de incubación) en la planta de cocoite (*G. sepium*) y la torta higerilla (*R. communis*). Se ha reportado la presencia de taninos condensados, aceites esenciales y toxinas que afectan la sobrevivencia de los protozoarios en estos sustratos (Jackson y Barry, 1996; Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). Tanto la planta de cocoite como la torta de higerilla, fueron seleccionadas para el siguiente experimento (Capítulo IV).

En el segundo grupo evaluado, todas las plantas y subproductos mostraron capacidad desfaunante a las 72 h de incubación (ver cuadro 3.4). Sin embargo, únicamente los agaves y el chicalote, presentan una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la concentración de protozoarios íntegros desde las 48 h con respecto al tratamiento testigo. En los agaves se ha determinado la presencia de saponinas que tiene un efecto desfaunante en dietas convencionales para rumiantes, aunque también se reportado una disminución en la concentración de este metabolito secundario durante el proceso de ensilaje (Pinos *et al.*, 2009). En cuanto al chicalote (*A. ochroleuca*) se ha reportado que la actividad anti-protozoa se debe a la presencia de alcaloides (Abdel *et al.*, 2010).

En el tercer grupo evaluado, los subproductos cascabillo de café y cascarilla de café tuvieron un menor concentración de protozoarios ($P < 0.05$), a partir de la 48 y 72 h de incubación (respectivamente) con respecto a los tratamientos testigo y pulpa de café (Cuadro 3.5). A pesar de que tanto la pulpa, el cascabillo y la cascarilla de café contienen taninos condensados (Clifford, 1991; Heičmović *et al.*, 2011), se desconoce, el motivo de que solamente se presente la actividad desfaunante con algunos de estos subproductos del café. No se encontró información

publicada sobre el efecto desfaunante de estos subproductos, los cuales, comprende aproximadamente el 45% del grano completo de café. Su uso industrial está relacionado a la extracción de cafeína y polifenoles (Esquivel y Jiménez, 2012). El uso directo de estos subproductos para la alimentación animal es limitado, debido a los factores anti-nutricionales y anti-fisiológicos (p. ej. taninos y cafeína) que puede ser removidos mediante tratamientos químicos alcalinos y ácidos (Ulloa *et al.*, 2002).

3.6 CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* la adición de glucosa, celobiosa y almidón, permite la sobrevivencia de los protozoarios ruminales, por 72 horas de incubación en una concentración de por lo menos $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ de medio de cultivo.

El fármaco Secnidazol[®] usado como desfaunante en medios de cultivo *in vitro* para la sobrevivencia de protozoarios ruminales, es efectivo desde las 24 horas de incubación. Ninguna de las plantas y residuos agrícolas evaluados igualo su potencia.

Para el periodo de las 72 h de incubación, las plantas y subproducto seleccionados por su capacidad desfaunante ($P < 0.05$) son: *A. mapisaga*, *A. salmina var. salmiana*, *A. salmiana var. ferox*, *A. ochroleuca* (follaje y semilla), *C. ambrosioides*, *J. curcas* (harina), *C. arabica* (cascarilla y cascabillo).

3.6 LITERATURA CITADA

Abdel, S. E., L. Maes, and S. M. Mahmoud M. 2010. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytotherapy Research* 24: 1322–1328.

- Ando, S., T. Nishida, M. Ishida, K. Hosoda, and E. Bayaru. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science* 82:245–248.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- Chemler, J. A., E. Leonard, A. G. Koffas, C. Winefield, K. Davies, and K. Gould. 2009. Flavonoid biotransformations in microorganisms. Anthocyanins. Ed. Springer New York. *Biomedical and Life Sciences* pp.191- 255.
- Chen, A., R.J. AbuJarour, and R. K. Draper. 2003. Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI. *Journal of Cell Science* 116: 3503-3510.
- Clifford, M. N. 1991. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry* 40: 191-200.
- Donato, J.A. 2006. Evaluación de la capacidad desfaunante de la planta de Yuca (*Yucca schidigera*) y fármaco Secnidazol[®]. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-77.
- Edwrda, I.D. 1980. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *The British Journal of Venereal Diseases* 56: 285-90.
- Esquivel, P., and V.M. Jiménez. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46: 488–495.

- Francis, G., Z. Kerem, H.P.S. Makkar, and K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition* 88: 587–605.
- Galindo, J., Y. Marrero, N. González, y A. I. Aldama. 2001. Efecto de *Gliricidia sepium* en la población protozoaria y organismos celulolíticos ruminales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 35: 235 -239
- Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 279-290.
- Guan, H., K. M. Wittenberg, K. H. Ominski, and D. O. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science* 84: 1896-1906.
- Hart, K.J., D.R. Yáñez, S.M. Duval, N.R. McEwan, and C.J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 147: 8-35
- Haslam E. 1988. Plant polyphenols (*syn.* vegetable tannins) and chemical defense: A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1789-1805.
- Heičmović, I., A. Belščak, D. Horžić, and D. Komes. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry* 129: 991-1000
- Hino, T., M. Kametaka, and M. Kandatsu. 1973a. The cultivation of rumen oligotrich protozoa II. Growth of *Entodinia* in vitro. *Journal of General and Applied Microbiology* 19: 325-337.

- Hino, T., M. Kametaka, and M. Kandatsu. 1973b. The cultivation of rumen oligotrich protozoa
III. White clover factors which stimulate the growth of Entodinia. *Journal of General and Applied Microbiology* 19: 397-413.
- Hino, T., M. Kametaka, and M. Kandatsu. 1973c. The cultivation of rumen *Oligotrich* protozoa.
I. Factors influencing the life of Entodinia. *Journal of General and Applied Microbiology*
19: 305-315.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review*. 14:1-49.
- Jackson, F. S., and T. N. Barry. 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, Shrub and Forage Legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71: 103-110
- Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan, J. Callan, B. Flynn, and F. P. O'Mara. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science* 84: 162-170
- Jung, H.J., C.O. Lee, K.T Lee, J. Choi, and H. J Park. 2004. Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 744-747.
- Ley de Coss, A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos y plantas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-74

- Ley de Coss, A., M. A. Cobos, D. Hernández, y E. Guerra. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación in vitro en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ XXI 1: 43 - 49.
- Liu, H., V. Vaddella, and D. Zhou. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. Journal of Dairy Science 94: 6069-6077.
- Llelaboye, N. O. A., and O.O. Pikuda. 2009. Determination of minerals and antinutritional factors of some lesser-known crop seeds. Pakistan Journal of Nutrition 8: 1652-1656.
- Mihaliková, K., Z. Váradyová, P. Pristaš, P. Javorský, and S. Kišidayová. 2009. Tolerance of a ruminant ciliate *Entodinium caudatum* against mercury, copper and chromium. Biologia 64: 1141-1145
- Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. Rumen Protozoa. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press. Japan pp: 230.
- Patra, A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. Antonie van Leeuwenhoek 96:363-375.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry 71: 1198-1222.
- Pen, B., C. Sar, B. Mwenya, K. Kuwaki, R. Morikawa, and J. Takahashi. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. Animal Feed Science and Technology 129:175-186.

- Pinos, J.M., M. Zamudio, S.S. Gonzalez, G.D. Mendoza, R. Barcena, M. E. Ortega, and L. A. Miranda. 2009. Effects of maturity and ensiling of *Agave salmiana* on nutritional quality for lambs. *Animal Feed Science and Technology* 152: 298-306.
- Reyes, F.D., C. J. Peña, M. Canales, M. Jiménez, S. Meráz, and T. Hernández. 2011. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10: 139 - 146.
- SAS Institute. 2002. User's guide: statistics, version 10 editions. SAS Institute, Inc., Cary, N. C.
- Ulloa, J. B., J. A. J. Verreth, J. H. van Weerd, and E. A. Huisman. 2002. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99: 195-204.
- Valdez, F.R., L. J. Bush, A. L. Goetsch, and F. N. Owens. 1986. Effect of steroidal sapogenins on rumen fermentation and on production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 69:1568-1575.
- Wüst, J. 1977. Susceptibility of Anaerobic Bacteria to Metronidazole, Ornidazole, and Tinidazole and Routine Susceptibility Testing by Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11: 631-637.

CAPITULO IV

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS PLANTAS Y SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS SELECCIONADOS POR SU ALTA CAPACIDAD DESFAUNANTE (ACD)

4.1. RESUMEN

Aunque no se sabe con exactitud que metabolitos secundarios (p. ej. taninos, saponinas, alcaloides o aceites esenciales) presentes en las plantas y residuos agrícolas causan la desfaunación, los estudios *in vitro* usando medios de cultivo para protozoarios son una opción experimental eficaz para seleccionar nuevos sustratos desfaunantes. En el presente estudio se comparo (*in vitro*) la capacidad desfaunante de plantas y subproductos agrícolas previamente identificados (capítulo III) con alta capacidad desfaunante (ACD). Las variables analizadas fueron: producción de ácidos grasos volátiles, pH y concentración de protozoarios viables. El follaje de chicalote (*Argemone ochroleuca*) y el cascabillo de café (*C. arabica*) tuvieron la mejor actividad desfaunante ($P < 0.05$) con relación a los demás sustratos evaluados. Sin embargo, el tipo de fermentación fue variable, el follaje de chicalote tuvo la mayor producción ($P < 0.05$) de ácido butírico; mientras que el cascabillo de café presento una menor producción ($P < 0.05$) ácido acético y ácido butírico.

Palabras clave: taninos, saponinas, alcaloides, protozoarios, rumiantes.

4.1. ABSTRACT

Although it is not known which secondary metabolites (e.g. tannins, saponins, alkaloids or essential oils) contained in plants and agricultural by-products have a rumen defaunation effect exactly, the *in vitro* studies with culture media for protozoa work well for selection of new defaunation substrates. In this study the *in vitro* defaunation ability of plants and agricultural by products, previously identified (Chapter III) with high defaunation capacity (HDC), was evaluated. The variables analyzed were: volatile fatty acids production, pH, and the number of viable protozoa. The leaves of chicalote (*Argemone ochroleuca*) and the coffee husk (*C arabica*) had the best defaunation capacity ($P<0.05$) compared with the other evaluated substrates. However, the type of fermentation was variable, the leaves of chicalote had the highest ($P<0.05$) butyric acid production, and the coffee husk had the lowest ($P<0.05$) acetic and butyric acids production.

Key words: tannins, saponins, alkaloids, protozoa, ruminants.

4.2 INTRODUCCIÓN

El uso de plantas y sus extractos oleosos o acuosos representan una alternativa de desfaunación del ganado en diferentes sistemas de producción de leche y de carne. El objetivo es disminuir las emisiones de metano, sin que se afecte negativamente la eficiencia productiva de los animales y la sustentabilidad de la empresa (Patra y Saxena, 2009). La concentración de protozoarios ruminales también puede suprimirse con el uso de antibióticos ionóforos (Guan *et al.*, 2006; Hook *et al.*, 2010; Patra y Saxena, 2010; Ley de Coss *et al.*, 2011); sin embargo, en algunos países ya se prohíbe el uso de cualquier antibiótico como aditivo alimenticio. Lo que justifica la investigación para evaluar plantas y subproductos con potencial actividad desfaunante, debido a

su contenido de flavonoides, alcaloides (Chemler *et al.*, 2009), saponinas (Jung *et al.*, 2004), aceites esenciales (Greathead, 2003) o taninos condensados (Haslam, 1988; Patra y Saxena, 2010). De esta forma, el glucósido de yucagenina (100 µg/mL) aislado de una fracción purificada de sapogenina de la planta *Agave brittoniana*, presenta actividad antiprotozoaria (100% de eficiencia), comparada a la acción del metrodinazol. (Guerra *et al.*, 2008). La planta *Argemone ochroleuca* contiene el alcaloide isoquimnolínico berberina (Reyes *et al.*, 2011), Ley de Coss *et al.* (2011), lograron mantener *in vitro* una concentración 7.5×10^3 protozoarios ciliados/mL⁻¹ con 90% de viabilidad durante 72 h de incubación en un medio de cultivo para protozoarios (MCT), cuando agregaron al medio de cultivo el extracto soluble de la planta *Argemone mexicana*, se redujo (P<0.05) la concentración de protozoarios viables a partir de las 24 h de incubación 9.1×10^3 mL⁻¹ MCT. A las 72 horas de incubación el efecto desfaunante continuó. En este experimento se evaluaron planta y residuos agrícolas que en un experimento presentaron actividad desfaunante (capítulo III). El objetivo de este experimento fue, seleccionar los sustratos con alta capacidad desfaunante. Se evaluó la capacidad desfaunante *in vitro* de las plantas: chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) semilla y follaje), cocoite (*Gliricidia sepium*), curcumina (*Curcuma longa*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), tres especies de maguey (*Agave mapisaga*, *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. salmiana* var. *ferox*), y de los subproductos agrícolas: cascabillo y cascarilla de café, (*Coffea arabica*) harina de jatropa (*Jatropha curcas*), y torta de higerilla (*Ricinus communis*). Además, se evaluó el efecto de su adición en el pH a las 0 h y 96 h y la producción y proporción de ácidos grasos volátiles a las 96 horas de incubación.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

4.3.2. Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios

El medio de cultivo usado en el experimento tuvo como componentes principales glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR), y se adiciono penicilina y estreptomicina para limitar el crecimiento de bacterias ruminales. La composición exacta del medio de cultivo GCA-FR se describe en el cuadro 4.1. Los medios fueron preparados usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate (1950). En tubos de cultivo de 18X150 mm que contenían 0.01 g del sustrato a evaluar (planta o residuo agrícola) se adicionaron 9 mL de medio de cultivo GCA-FR. Además, a cada tubo se le adicionaron 100 $\mu\text{L}/9\text{mL}$ medio de cultivo, de una solución de antibióticos (HIDRO-PEN[®]) que contiene 25 mg/mL^{-1} de estreptomicina y 20,000 UI mL^{-1} de penicilina (Ley de Coss 2003).

4.3.3. Plantas y subproductos agrícolas con capacidad desfaunante (PSD)

Las plantas y los subproductos de cosecha evaluados se indican en el cuadro 4.2. Estos sustratos fueron deshidratados por 48 h en una estufa de secado a 60°C, posteriormente se molieron en un molino Willey (criba de 1 mm) y se pulverizaron en un mortero (Fritsch). Para el experimento se agregaron 0.01 g de cada sustrato en 9 mL de medio de cultivo. Las muestras de plantas y los

subproductos de cosecha fueron recolectados en la región de Texcoco y en los Estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz.

4.3.4. Fármaco desfaunante (FD)

El fármaco utilizado fue el Secnidazol[®], el cual se adicionó a los medios de cultivo siguiendo el procedimiento descrito por Ley de Coss (2003) y Donato (2006) y se agregó en una cantidad de 0.65 mg de Secnidazol[®] en 9 mL⁻¹ de medio de cultivo (Ley de Coss *et al.*, 2011).

Cuadro 4.1 Composición del medio cultivo base (GCA-FR) para crecimiento y supervivencia de protozoarios ciliados del rumen.

Compuesto	Cantidad/100 mL de medio		
	Medio GCA-FR	Medio PSD*	Medio FD**
Agua destilada	47.42 mL	47.42 mL	47.42 mL
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL
Solución mineral I ⁽²⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución mineral II ⁽³⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Carbonato de sodio, solución 8% ⁽⁴⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Acetato de sodio, 1.5 % ⁽⁵⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución sulfito-cisteína ⁽⁶⁾	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.20 g	0.20 g	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g	0.10 g	0.10 g
Glucosa	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Celobiosa	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Almidón	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Planta ó residuo desfaunante	----	0.1 g	----
Secnidazol [®]	----	----	6.5 g

(1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10.000 rpm. por 15 minutos a 4°C. esterilizado 20 minutos a 15 psi. 121°C; (2) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K₂HPO₄; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂·2H₂O; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 1.5 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S·9H₂O (en 100 mL de H₂O); (7) 0.1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL. calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.

* Plantas y subproductos de cosecha con capacidad desfaunante (ver cuadro 4.2).

** Fármaco desparasitante Secnidazol[®].

4.3.5. Recuperación de protozoarios

El fluido ruminal (FR) se obtuvo entre las 8:00-9:00 de la mañana, de un toro Holstein fistulado de 2.5 años de edad. El FR se filtro con una tela de manta con el fin de eliminar partículas grandes de alimento. Posteriormente, se deposito (500 mL) en un embudo de separación y se coloco en una incubadora a 39°C hasta que se precipitaron los protozoarios que se observan como un anillo blanquecino en el fondo del embudo (tiempo aproximado de 15 min). De la masa de protozoarios precipitados (anillo blanquecino) se tomaron, en promedio, 5 mL y se depositaron bajo flujo de CO₂, en un tubo de cultivo 18X150 que contenía 5 mL del medio de cultivo GCA-FR. Una gota de esta mezcla se deposito por capilaridad en las dos cuadrículas de la cámara Neubauer, y se realizó el conteo de protozoarios de acuerdo a la técnica descrita por Ogimoto y Imai (1981). Una vez conocida la concentración de protozoarios por mL del medio de recuperación, se calcula la cantidad que se debería agregar en los diferentes tratamientos y sus repeticiones, para asegurar una concentración inicial de protozoarios (hora “cero” de incubación) igual o mayor a $1 \times 10^5 / \text{mL}^{-1}$ del medio de cultivo.

4.3.6 Técnica de inoculación de los medios de cultivo

Antes de la inoculación con los protozoarios, los tubos de cultivo anaerobio que contenían el medio GCA-FR y el sustrato a evaluar se mantuvieron a una temperatura de 39°C y se les agregó la mezcla de antibióticos descrita anteriormente. La inoculación de los medios de cultivo con el concentrado de protozoarios viables (1 mL/9 mL de medio de cultivo), se realizó bajo flujo de CO₂. Para realizar el conteo y determinar la concentración de protozoarios existentes en el medio de cultivo se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio de contrastes (Zeiss, Axiostar) a 400X de magnificación (Ogimoto y Imai, 1981), el conteo se realizó a las 0, 24, 48, 72 h de incubación.

Cuadro 4.2. Plantas y subproductos agrícolas evaluados por su capacidad desfaunante

Plantas	
Nombre común	Nombre científico
Chicalote Blanco (Follaje)	<i>Argemone ochroleuca</i>
Chicalote Blanco (Semilla)	<i>Argemone ochroleuca</i>
Cocoite	<i>Gliricidia sepium</i>
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>
Epazote	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
Magüey	<i>Agave mapisaga.</i>
Magüey	<i>Agave salmiana var. salmiana.</i>
Magüey	<i>Agave salmiana var. ferox.</i>
Subproductos agrícolas	
Nombre común	Nombre científico
Cascarilla de café	<i>Coffea arabica</i>
Cascabillo de café	<i>Coffea arabica</i>
Harina de Jatropha	<i>Jatropha curcas</i>
Torta de Higuierilla	<i>Ricinus communis</i>

4.3.7 Conteo de protozoarios viables

Debido a su gran movilidad, es difícil contar protozoarios viables en la cámara Neubauer, por lo que se procedió a considerar como protozoarios viables a aquellos protozoarios que mantuvieron su integridad morfológica después de ser fijados en una solución de formaldehído al 10% (Figura 1.1a y 1.1b; Capítulo III).

Se estimó la concentración de protozoarios por mL del medio de cultivo de cada tratamiento a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación. En cada tiempo, se extrajo con una pipeta Pasteur 0.5 mL de medio inoculado con protozoarios y se depositó por capilaridad en las dos cuadrículas que conforman la cámara de conteo Neubauer, posteriormente se observó en un microscopio de contraste modelo Axiostar (Zeiss) a 400X magnificaciones. El conteo de protozoarios se realizó en ocho cuadrantes (cuatro de cada cuadrícula) que tienen un área de 1mm². El número de protozoarios por mL de medio de cultivo se estima de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoarios mL}^{-1} = (X) * (FD) * (10^4)$$

Donde:

X = media de los conteos de protozoarios en ocho cuadrantes (1mm^2) de la cámara Neubauer.

FD = valor inverso de la dilución usada.

10^4 = Factor de corrección del volumen muestreado para conversión de datos a un volumen de 1mL.

4.3.8 pH ruminal.

Se midió el pH a las 0 y 72 h de incubación de iniciado el experimento, con un potenciómetro marca ORION 250, calibrado a dos buffers (pH 4 y 7).

4.3.9 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Para determinar la producción de ácidos grasos volátiles, se recolectaron 4 mL del medio de cultivo de cada tratamiento y sus repeticiones, se adiciono ácido metafosfórico al 25% en una proporción de 4:1 mL de muestra: ácido, respectivamente. Se homogenizo la mezcla, se transfirieron 2 mL en viales para centrifuga y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm (20,817 X g) por 10 min a una temperatura de 4°C, en una centrifuga Eppendorf, modelo 5810R. Finalmente, se recolecto el sobrenadante y se almaceno en refrigeración hasta su análisis. El contenido de AGV de las muestras se determino por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Clarus 500, marca PerkinElmer con automuestreador, se uso una columna capilar empacada Elite FFAP (PerkinElmer). El gas nitrógeno fue usado como gas acarreador. El proceso de calibración del estándar de AGV se realizó por triplicado. Las temperaturas del horno, el detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron de 120°C, 250°C y 250°C, respectivamente. El

tiempo de retención de las muestras fue: acetato 2.25min, propionato 2.75min y butirato 3.25min, con un total de 4.62min de corrida.

4.3.10 Diseño y análisis estadístico

Las plantas y los subproductos de cosecha seleccionados por su capacidad desfaunante, fueron evaluados en este experimento con el fin de identificar los materiales con alta capacidad desfaunante (ACD), definida como la capacidad para reducir de forma significativa la población de protozoarios durante las primeras 24 y 48 h de incubación. Los tratamientos se organizaron al azar y se evaluó la concentración de protozoarios viables a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación *in vitro* y la producción de AGV a las 96 h de incubación, así como los valores de pH a las 0 h y 96 h de incubación. Para el análisis de la concentración de protozoario por mL de medio de cultivo, se utilizó un modelo de regresión binomial negativa, realizando la comparación de medias por el método de Bonferroni ($P < 0.05$; SAS, 2002). Las variables de pH, producción de ácidos grasos volátiles (AGV), fueron analizadas por medio de un diseño completamente al azar (GLM; SAS, 2002), para estimar la diferencia entre medias se usó el método de Tukey ($P < 0.05$).

4.4 RESULTADOS

En el cuadro 4.3 se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de protozoarios por mL de medio de cultivo a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de incubación y del pH a las 0 y 96 h.

La única planta que presentó actividad desfaunante a las 24 h de incubación, fue la especie de maguey *A. mapisaga* ($P < 0.05$). El tratamiento con Secnidazol[®], usado como control positivo de desfaunación confirmó, en todos los grupos de plantas evaluados, su alta capacidad desfaunante

a partir de las 24 h de incubación. Con excepción de la curcumina, todas las plantas del grupo 1 presentaron actividad desfaunante a partir de las 72 h de incubación.

Cuadro 4.3. Efecto sobre la concentración de protozoarios ruminales (10^4 /mL de medio de cultivo) y pH a diferentes horas de incubación

Planta/Residuo/Fármaco	Protozoarios (10^4 /mL)					pH	
	Horas de incubación					0	96
	0	24	48	72	96		
<i>Grupo 1</i>							
<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	9.1 ^b	2.2 ^a	1.1 ^a	0.5 ^b	0.1 ^b	6.5	6.4
<i>A. mapisaga</i>	8.2 ^b	0.4 ^b	0.2 ^b	0.1 ^b	0.0 ^b	6.6	6.4
<i>A. salmiana</i> var. <i>ferox</i>	8.8 ^b	10.4 ^a	4.6 ^a	0.5 ^b	0.2 ^b	6.5	6.4
<i>C. longa</i>	8.9 ^b	7.1 ^a	4.7 ^a	1.8 ^a	0.4 ^b	6.5	6.4
Secnidazol [®]	9.3 ^a	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	6.6	6.5
Testigo	10.7 ^a	4.8 ^a	3.4 ^a	3.9 ^a	1.1 ^a	6.6	6.5
EEM±	0.4	0.9	0.5	0.1	0.1	0.01	0.02
<i>Grupo 2</i>							
<i>R. communis</i> (torta)	10.8 ^a	2.5 ^a	1.5 ^a	0.5 ^b	0.4 ^b	6.5	6.5
<i>J. curcas</i> (harina)	9.7 ^a	2.3 ^a	1.1 ^a	0.9 ^b	0.6 ^b	6.6	6.5
<i>A. ochroleuca</i> (follaje)	8.3 ^b	1.6 ^a	1.1 ^a	0.9 ^b	0.4 ^b	6.5	6.4
<i>A. ochroleuca</i> (semilla)	9.2 ^a	2.0 ^a	1.0 ^a	0.4 ^b	0.1 ^b	6.5	6.4
Secnidazol [®]	9.3 ^a	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	6.6	6.5
Testigo	9.0 ^b	3.7 ^a	3.0 ^a	2.1 ^a	1.5 ^a	6.6	6.5
EEM±	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1	0.01	0.02
<i>Grupo 3</i>							
<i>C. arabica</i> (cascarilla)	8.0 ^b	3.0 ^a	1.4 ^b	1.2 ^b	0.6 ^b	6.5	6.4
<i>C. arabica</i> (cascabillo)	8.7 ^a	1.7 ^b	0.8 ^b	0.8 ^b	0.5 ^b	6.5	6.4
<i>G. sepium</i>	8.2 ^b	1.1 ^b	0.8 ^b	0.6 ^b	0.3 ^b	6.5	6.4
<i>C. ambrosioides</i>	7.8 ^b	1.4 ^b	0.9 ^b	1.0 ^b	0.3 ^b	6.5	6.4
Secnidazol [®]	7.9 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	6.5	6.5
Testigo	8.4 ^b	6.4 ^a	3.5 ^a	2.4 ^a	1.3 ^a	6.5	6.4
EEM±	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0045	0.01

^{a,b} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas (P<0.05)

En el segundo grupo tanto la semilla como el follaje de *A.ochroleuca* y los subproductos, torta de Higuerrilla y harina de *Jatropha*, presentan una disminución de la población de protozoarios ruminales (P<0.05) hasta las 72 h de incubación con respecto al tratamiento testigo. Finalmente

en el grupo 3 todas las plantas y subproductos, exceptuando la cascarilla de café, presentaron una disminución ($P<0.05$) en la concentración de protozoarios viables desde las 24 h de incubación, en comparación el tratamiento testigo.

En cuanto a la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) a las 96 h de incubación, los resultados del grupo uno indican que el tratamiento con Secnidazol[®] disminuye ($P<0.05$) la producción total de AGV, en comparación con el tratamiento con la especie de maguey *A. salmina var. salmiana*, en este tratamiento, se determinó la mayor producción ($P<0.05$) de ácido acético y propiónico. En el grupo dos, la mayor producción de AGV se presentó en el tratamiento con *R. communis* (torta). Los tratamientos Secnidazol[®] y testigo tuvieron la más baja producción ($P<0.05$) con relación a los demás tratamientos. El grupo tres la producción total de AGV fue mayor ($P<0.05$) en el tratamiento testigo y disminuyó en los tratamientos con *G. sepium* y *C. arabica* (cascarilla y cascabillo). La proporción acetato:propionato fue muy variable dentro de un rango de 3:1 a 6:1.

4.5 DISCUSIÓN

Además del Secnidazol[®] que se incluyó como un tratamiento positivo con alta capacidad desfaunante (ACD); de los tres grupos evaluados, la única planta que se puede clasificar con ACD es la especie de maguey forrajero *A. mapisaga*. La adición de esta planta en el medio de cultivo para protozoarios, fue el único de todos los tratamientos evaluados que disminuyó ($P<0.05$) la concentración de protozoarios viables a las 24 h de incubación. La planta de maguey forrajero *A. mapisaga* contiene saponinas, que posiblemente están relacionadas con la ACD de este forraje. Las saponinas forman complejos con los esteroides presentes en la membrana celular del protozoario, causando su destrucción (Francis *et al.*, 2002). A partir de la 72 h de incubación

las otras dos especies de maguey forrajero evaluados (*A. salmina* var. *salmiana* y *A. salmiana* var. *ferox*) tuvieron una capacidad desfaunante similar ($P>0.05$) a la especie *A. mapisaga*.

Cuadro 4.4. Concentración y proporción de ácidos grasos volátiles (mol L⁻¹ medio de cultivo) en los tres grupos y relación acetato:propionato, a las 96 h de incubación.

Planta/Residuo/Fármaco	Acetato		Propionato		Butirato		AGV total	C2:C3
	mol L ⁻¹	%	mol L ⁻¹	%	mol L ⁻¹	%	mol L ⁻¹	
<i>Grupo 1</i>								
<i>A. salmina</i> var. <i>salmiana</i>	55.94 ^a	75.15	9.53 ^a	12.80	8.97 ^b	12.05	74.44 ^a	6:1
<i>A. mapisaga</i>	48.53 ^{ba}	76.97	7.76 ^b	12.31	6.76 ^c	10.72	63.05 ^{ba}	5:1
<i>A. salmiana</i> var. <i>ferox</i> .	37.40 ^b	72.58	6.60 ^{ba}	12.81	7.53 ^{ba}	14.61	51.53 ^{ba}	4:1
<i>C. longa</i>	36.21 ^b	72.16	6.37 ^b	12.69	7.60 ^{ba}	15.15	50.18 ^{bc}	4:1
Secnidazol [®]	35.97 ^c	72.95	7.14 ^b	14.48	6.20 ^c	12.57	49.31 ^c	4:1
Testigo	45.74 ^b	70.94	8.16 ^{ba}	12.66	10.58 ^a	16.41	64.48 ^{ba}	5:1
EEM±	4.5	----	0.8	----	0.9	----	2.5	----
<i>Grupo 2</i>								
<i>R. communis</i> (torta)	36.6 ^a	71.67	6.48 ^a	12.69	7.99 ^a	15.65	51.07 ^a	4:1
<i>J. curcas</i> (harina)	32.10 ^{ba}	70.97	5.75 ^{ba}	12.71	7.38 ^a	16.32	45.23 ^{ba}	3:1
<i>A. ochroleuca</i> (follaje)	31.77 ^{ba}	71.43	5.55 ^{bc}	12.48	7.16 ^{ba}	16.10	44.48 ^{ba}	3:1
<i>A. ochroleuca</i> (semilla)	30.93 ^b	70.86	5.37 ^{bc}	12.30	7.35 ^a	16.84	43.65 ^b	3:1
Secnidazol [®]	24.61 ^c	72.55	4.88 ^c	14.39	4.43 ^c	13.06	33.92 ^c	5:1
Testigo	28.73 ^c	71.29	5.22 ^{bc}	12.95	6.35 ^b	15.76	40.30 ^{bc}	3:1
EEM±	1.1	----	0.2	----	0.2	----	1.4	----
<i>Grupo 3</i>								
<i>C. arabica</i> (cascarilla)	53.99 ^c	71.70	9.64 ^d	12.80	11.67 ^{ba}	15.50	75.30 ^c	5:1
<i>C. arabica</i> (cascabillo)	52.92 ^c	71.61	9.73 ^{dc}	13.17	11.25 ^b	15.22	73.90 ^c	5:1
<i>G. sepium</i>	57.85 ^{bc}	72.38	10.36 ^{dbc}	12.96	11.72 ^{ba}	14.66	79.93 ^{bc}	6:1
<i>C. ambrosioides</i>	60.94 ^{ba}	71.90	10.72 ^b	12.65	13.10 ^a	15.46	84.76 ^{ba}	6:1
Secnidazol [®]	59.25 ^{bac}	75.35	10.58 ^{bc}	13.46	8.80 ^{ba}	11.19	78.63 ^{bc}	6:1
Testigo	64.58 ^a	73.21	11.77 ^a	13.34	11.86 ^c	13.45	88.21 ^a	6:1
EEM±	1.4	----	0.2	----	0.3	----	1.8	----

^{a b c d} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas ($P<0.05$)

Estos resultados indican que la especie *A. mapisaga*, contiene metabolitos secundarios tóxicos para los protozoarios que se encuentran en mayor concentración, o son más solubles y de rápida liberación en rumen, en comparación con las otras dos especies de maguey que presentaron efecto desfaunante hasta las 72 h de incubación (ver cuadro 4.3). El glucósido de yucagenina (100 µg/mL) aislado de una fracción purificada de sapogenina de la planta *Agave brittoniana*, presenta actividad antiprotozoaria (100%), comparada a la acción del metrodinazol. De igual forma, saponinas comerciales provenientes de *Yucca schidigera* en altas concentraciones (0,06%/kg de PC) disminuyen la población de protozoarios a 8.51×10^3 /mL (Śliwiński *et al.*, 2002). En condiciones *in vitro* 77 ppm de saponina esteroideal de *Yucca schidigera* disminuye el número de protozoarios (2.9×10^3 /mL) a las 12 h de incubación. (Valdez *et al.*, 1986).

En el segundo grupo tanto la semilla como el follaje de *A. ochroleuca* y los subproductos, torta de higerilla y harina de jatropha, provocaron una disminución de la población de protozoarios ruminales ($P < 0.05$) hasta las 72 h de incubación con respecto al tratamiento testigo y se mantuvo a las 96 h de incubación. Sin embargo, no se clasifican como ACD. Estos sustratos fueron seleccionados para su evaluación, por que contienen metabolitos secundarios que se asocian con un efecto tóxico en protozoarios; por ejemplo: el chicalote (*A. ochroleuca*) contiene alcaloides isoquinolínicos como la berberina (Reyes *et al.*, 2011), el extracto en cloroformo de esta planta tiene efectos inhibitorios (50%) sobre protozoarios patógenos (*Trypanosoma*, *Plasmodium* y *Leishemia*) esta capacidad se asocia a la presencia de alcaloides de bencilisoquinolina (Abdel *et al.*, 2010); la planta higerilla contiene citotoxinas como la ricina (Barnesa *et al.*, 2009); las harina de la semilla de *J. curcas*, que se obtiene después de la extracción de aceite, contiene toxalbumina curcina, ésteres de forbol, terpenos, polifenoles y taninos (Llelaboye y Pikuda, 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos con el segundo grupo de plantas y residuos

agrícolas indican, que la presencia de metabolitos secundarios asociados con la capacidad desfaunante, no es un factor contundente para que se presente una ACD.

Todas las plantas y subproductos del grupo 3, excepto la cascarilla de café, provocaron una disminución ($P < 0.05$) en la concentración de protozoarios íntegros desde las 24 h de incubación en comparación el tratamiento testigo. La planta seleccionada por su ACD y el residuo fueron, *G. sepium* y el cascabillo de café, ya que a las 72 h de incubación, disminuyeron la concentración de protozoarios por debajo de una potencia con respecto al tratamiento testigo. La capacidad desfaunante determinada en el cocoite (*G. sepium*) coincide con los resultados obtenidos por Galindo *et al.* (2001) quienes, reportan que la adición de 15 y 30% de la MS de follaje de cocoite causa la disminución ($P < 0.05$) de la población de protozoarios ruminales de 11.2 a 1.05×10^5 /mL y 2.6×10^5 a 4.1×10^4 / mL (respectivamente) a las 72 h de incubación; los autores concluyen que la capacidad desfaunante del cocoite se debe a la presencia en de taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos y esteroides. La concentración de taninos condensados en el cocoite es de 0.6% de la MS (Seresinhe y Iben, 2003). Mientras que, en la pulpa de café (*C. arabica var. caturra vermelho*) es de 0.19% (Clifford, 1991); por tanto, es posible que el cascabillo de café contenga otros metabolitos secundario tóxicos para los protozoarios del rumen.

La producción de AGV estimada a las 96 h de incubación en el grupo uno, indican que el Secnidazol[®] disminuye ($P < 0.05$) la producción total de AGV en comparación con los tratamientos a base de las tres especies de maguey forrajero (ver cuadro 4.4). En un estudio *in vivo*, la producción total de AGV, en borregos alimentados con ensilaje de maguey forrajero, fue de 79 mol L^{-1} , en donde el 62% correspondió al acetato y 22% al propionato (Pinos *et al.*, 2009), dichos resultados son similares a los del presente experimento y son normales en la fermentación ruminal de materiales vegetales fibrosos.

Los dos tratamientos que presentaron ACD fueron la especie de maguey *A. mapisaga* y el Secnidazol[®]. Al comparar estos dos tratamientos (cuadro 4.4), se nota que el efecto de la desfaunación sobre el tipo de fermentación fue diferente, la producción total de AGV fue mayor ($P < 0.05$) con *A. mapisaga* y la proporción de acetato:propionato:butirato fue de 76.97:12.31:10.7 vs 72.95:14.48:12.57 (respectivamente); esto es, el tratamiento con el maguey forrajero favoreció una fermentación acética, mientras que el tratamiento con Secnidazol[®] favoreció una fermentación propiónico-butírica, lo que se reflejó en la proporción acetato:propionato (5:1 vs 4:1). Este resultado es diferente al reportado por Donato (2006), quien concluye que la producción de ácidos propiónico y butírico, en el tratamiento testigo y los tratamientos con el fármaco y *Y. schidigera* no presenta diferencias significativas durante los periodos de evaluación (0, 24, 48 y 96 h). En contraste, estudios *in vitro* con *Albizia lebbekoides*, una planta con una alta concentración de taninos condensados, la eliminación de protozoarios ruminales se correlacionó con una disminución en la producción de ácido butírico (Rodríguez *et al.*, 2011).

En el grupo 2, la mayor ($P > 0.05$) producción de AGV se obtuvo en los tratamientos con la torta de higuera (*R. communis*), la harina de jatrofa (*J. curcas*) y el follaje del chicalote (*A. ochroleuca*). El tratamiento con Secnidazol[®] presentó de nuevo la menor ($P < 0.05$) producción de AGV. Finalmente en el grupo 3 la producción total de AGV fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento testigo y el epazote (*C. ambrosioides*). También en este grupo, se repite una menor ($P < 0.05$) producción de AGV en el tratamiento con Secnidazol[®] en comparación con el tratamiento control, por tanto, se estima que este fármaco con ACD, tiene como desventaja, una disminución en la eficiencia de la fermentación de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo (glucosa, celobiosa y almidón).

4.6 CONCLUSIONES

El fármaco Secnidazol[®] usado como desfaunante en medios de cultivo *in vitro* para la sobrevivencia de protozoarios ruminales, es efectivo desde las 24 h de incubación. Sin embargo, se determinó que disminuye ($P < 0.05$) en comparación con el tratamiento testigo, la producción de AGV y por tanto, la eficiencia de fermentar los carbohidratos presentes en el medio de cultivo.

La única planta que presentó ACD a partir de la 24 h de incubación fue la especie de maguey *A. mapisaga*. Otras plantas y subproducto con ACD fueron: *A. ochroleuca*, *G. sepium* y *C. arabica* (cascabillo), con la desventaja de que su capacidad desfaunante se presenta después de 72 h de incubación.

La disminución en la población de protozoarios causada por las plantas y subproductos con ACD, afecta de manera diferente la producción total de AGV y el tipo de fermentación (proporción acetato:propionato:butirato), lo cual, fue más notorio en los dos tratamientos que presentaron actividad desfaunante desde las 24 h de incubación, el Secnidazol[®] y la especie de maguey *A. mapisaga*.

4.7 LITERATURA CITADA

Abdel, S. E., L. Maes, and S. M. Mahmoud. 2010. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytotherapy Research* 24: 1322–1328.

Barnesa, D. J., B. S. Baldwin, and D. A. Braascha. 2009. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. *Industrial crops and products* 29: 509–515.

- Chemler, J. A., E. Leonard, A. G. Koffas, C. Winefield, K. Davies, and K. Gould. 2009. Flavonoid biotransformations in microorganisms. Anthocyanins. Ed. Springer New York. Biomedical and Life Sciences pp.191- 255.
- Clifford, M. N. 1991. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. Food Chemistry 40: 191-200.
- Donato, J.A. 2006. Evaluación de la capacidad desfaunante de la planta de Yuca (*Yucca schidigera*) y fármaco Secnidazol[®]. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-77.
- Francis, G., Z. Kerem, H.P.S. Makkar, and K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: A review. British Journal of Nutrition 88: 587–605.
- Galindo, J., Y. Marrero, N. González, y A. I. Aldama. 2001. Efecto de *Gliricidia sepium* en la población protozoaria y organismos celulolíticos ruminales. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 35: 235 -239
- Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proceedings of the Nutrition Society 62: 279-290.
- Guan, H., K. M. Wittenberg, K. H. Ominski, and D. O. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. Journal of Animal Science 84: 1896-1906.
- Guerra, J. O., A. Meneses, A. M. Simonet, F. A. Macías, C. Nogueiras, A. Gómez, and J. A. Escario. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (*Agavaceae*) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. Revista de Biología Tropical 56: 1645-1652.

- Haslam E. 1988. Plant polyphenols (*syn.* vegetable tannins) and chemical defense: A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1789-1805.
- Hook S. E., A. G. Wright, and B. W. McBride .2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 10:1 11.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review*. 14:1-49.
- Jung, H.J., C.O. Lee, K.T Lee, J. Choi, and H. J Park. 2004. Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 744-747.
- Ley de Coss, A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos y plantas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-74
- Ley De Coss, A., M. A. Cobos, D. Hernández, y E. Guerra. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ XXI* 1: 43 - 49.
- Llelaboye, N. O. A., and O.O. Pikuda. 2009. Determination of minerals and antinutritional factors of some lesser-known crop seeds. *Pakistan Journal of Nutrition* 8: 1652-1656.
- Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. Rumen Protozoa. *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press. Japan pp: 230.

- Patra, A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363-375.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- Pinos, J.M., M. Zamudio, S.S. Gonzalez, G.D. Mendoza, R. Barcena, M. E. Ortega, and L. A. Miranda. 2009. Effects of maturity and ensiling of *Agave salmiana* on nutritional quality for lambs. *Animal Feed Science and Technology* 152: 298-306.
- Reyes, F.D., C. J. Peña, M. Canales, M. Jiménez, S. Meráz, and T. Hernández. 2011. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10: 139 - 146.
- Rodríguez, R., A. Britos, N. Rodríguez-Romero, and M. Fondevila. 2011. Effect of plant extracts from several tanniferous browse legumes on in vitro microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. *Animal Feed Science and Technology* 168:188-195.
- SAS Institute. 2002. User's guide: statistics, version 10 editions. SAS Institute, Inc., Cary, N. C.
- Seresinhe, T., and C. Iben. 2003. In vitro quality assessment of two tropical shrub legumes in relation to their extractable tannins contents. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87: 109-115.
- Śliwiński, B.J., C. R. Soliva, A. Machmüller, and M. Kreuzer. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 101:101-114.

Valdez, F.R., L. J. Bush, A. L. Goetsch, and F. N. Owens. 1986. Effect of steroidal sapogenins on rumen fermentation and on production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 69:1568-1575.

CAPITULO V

EFFECTO DE TRES PLANTAS Y UN SUBPRODUCTO AGRÍCOLA CON ALTA CAPACIDAD DESFAUNANTE SOBRE VARIABLES FERMENTATIVAS Y MICROBIOLÓGICAS

5.1 RESUMEN

Se evaluaron cuatro sustratos que presentaron alta capacidad desfaunante en un estudio previo (Capítulo IV). Las plantas evaluadas fueron: cocoite (*Gliricidia sepium*), maguey forrajero (*Agave mapisaga*) y chicalote (*Argemone ochroleuca*) y el subproducto agrícolas cascabillo de café (*Coffea arabica*). El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de su inclusión, sobre algunas variables fermentativas (producción de AGV, CH₄ y CO₂) y microbiológicas (concentración de bacterias y protozoarios). Para todas las pruebas se uso un medio de cultivo anaerobio para protozoarios. De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los sustratos desfaunantes confirmaron su alta capacidad desfaunante a partir de las 24 h de incubación. También se determino una disminución en la concentración de bacterias ruminales a las 24 h de incubación, en los tratamiento con Secnidazol[®], cocoite y chicalote blanco; sin embargo, este efecto desapareció a entre las 48 y 72 h de incubación. Todos los tratamientos mantuvieron una proporción de acetato propionato de 5.1, con excepción del Secnidazol[®] (4:1). Por lo que se concluye que los agentes desfaunantes evaluados tienen un efecto diferente sobre la producción total de AGV y la proporción acetato:propionato.

Palabras claves: cascabillo de café, *Argemone ochroleuca*, protozoarios, rumen.

ABSTRACT

Four substrates which a high defaunation capacity showed in a previous resercah (Chapter IV) were evaluated. The plants cocoite (*Gliricidia sepium*), maguey forrajero (*Agave mapisaga*), and chicalote (*Argemone ochroleuca*), and the by-product coffee husk (*Coffea arabica*) were evaluated. The main objective of this study was to determine the effect of these substrates inclusion on some fermentative (production of VFA, CH₄ and CO₂) and microbiological (concentration of bacteria and protozoa) variables. An anaerobic culture medium for protozoa was used through the entire test. According with the results obtained, the high defaunation capacity of the substrates evaluated was corroborated after 24 h of incubation. At the same time, a decrease in the concentration of rumen bacteria was determined in the Secnidazole[®], cocoite, and chicalote blanco treatments, but this effect disappears between 48 to 72 h of incubation. Except for Secnidazole[®] (4:1), all the treatments keep an acetate:propionate rate of 5:1. It is concluded that the defaunation agents evaluated had different effects on total VFA production and the acetate:propionate rate.

Key words: coffee hosk, *Argemone ochroleuca*, protozoa, rumen.

5.2 INTRODUCCIÓN

La desfaunación tiene potencial aplicación en el sector ganadero, para disminuir las emisiones de metano en rumiantes y su contribución en el calentamiento global que se estima en 35% de las emisiones antropogenicas (Buddle *et al.*, 2011). Experimentalmente se han usado antibióticos que se pueden agregar en el alimento, sin embargo, actualmente está prohibido su uso en la alimentación animal por la legislación Europea (Hart *et al.*, 2008). Una alternativa es usar metabolitos secundarios presentes en plantas y residuos agrícolas (Guan *et al.*, 2006; Hook *et al.*,

2010; Patra y Saxena, 2010; Ley de Coss *et al.*, 2011). Una manera rápida y eficaz para estimar la capacidad desfaunante de diversos sustratos, es mediante pruebas *in vitro*, determinando el efecto sobre la población de protozoarios ruminales en medios de cultivo anaerobios. Los estudios *in vitro*, también permiten estimar el efecto del sustrato desfaunante en variables fermentativas, por ejemplo, la producción de ácidos grasos volátiles, metano y dióxido de carbono. Lo que permite una selección de plantas y subproductos, no solo, por su capacidad desfaunante, sino también, por su efecto en la eficiencia fermentativa y capacidad para disminuir las emisiones de metano (Patra y Saxena, 2009). En el presente trabajo se comparó *in vitro*, la alta capacidad desfaunante (ACD) del chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*), cocoite (*Gliricidia sepium*), maguey forrajero (*Agave mapisaga*), y el cascabillo de café (*Coffea arabica*). La ACD de las hojas de chicalote blanco puede estar asociada a la presencia de alcaloides que tienen efectos inhibitorios del 50% sobre protozoarios patógenos (*Trypanosoma*, *Plasmodium* y *Leishemia*; Abdel *et al.*, 2010). El cocoite es una leguminosa arbustiva tropical, el uso de 15 y 30% (MS) de su follaje causa (*in vitro*) la disminución ($P < 0.05$) de la población de protozoarios ruminales de 2.6×10^5 a 4.1×10^4 /mL de medio de cultivo a las 72 h de incubación, debido a su contenido de taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos y esteroides (Galindo *et al.*, 2001). El maguey forrajero contiene saponinas que puede tener un efecto desfaunante, aunque se ha reportado que los niveles de este metabolito secundario puede disminuir durante el proceso de ensilaje (Pinos *et al.*, 2009). Finalmente, el cascabillo de café es una cascara que cubre al grano de café (pergamino), este subproducto representa 15 % del peso del grano completo de café (Esquivel y Jiménez *et al.*, 2012). El uso directo de estos subproducto en la alimentación animal es limitado, debido a su contenido de factores anti-nutricionales (p.ej. taninos y cafeína; Ulloa *et al.*, 2002). Las variables consideradas para este experimento fueron, conteo de protozoarios

viabiles, conteo de bacterias ruminales totales y la concentración de AGV, cada una de estas variables fueron medidas a la 0, 24, 48, 72, 96 h de incubación.

5.3 MATERIALES Y METODOS

5.3.1. Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

5.3.2. Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios

El medio de cultivo usado en el experimento tuvo como componentes principales glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR), y se adiciono penicilina y estreptomicina para limitar el crecimiento de bacterias ruminales. La composición exacta del medio de cultivo GCA-FR se describe en el cuadro 5.1. Los medios fueron preparados usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate (1950). En tubos de cultivo de 18X150 mm que contenían 0.01 g del sustrato a evaluar (planta o residuo agrícola) se adicionaron 9 mL de medio de cultivo GCA-FR. Además, a cada tubo se le adicionaron 100 μL /9 mL medio de cultivo, de una solución de antibióticos (HIDRO-PEN[®]) que contiene 25 mg mL⁻¹ de estreptomicina y 20,000 UI mL⁻¹ de penicilina (Ley de Coss 2003).

5.3.3. Plantas y subproductos agrícolas con capacidad desfaunante (PSD)

Las plantas y los subproductos de cosecha evaluados se indican en el cuadro 5.2. Estos sustratos fueron deshidratados por 48 h en una estufa de secado a 60°C, posteriormente se molieron en un

molino Willey (criba de 1 mm) y se pulverizaron en un mortero (Fritsch). Para el experimento se agregaron 0.01 g de cada sustrato en 9 mL de medio de cultivo. Las muestras de plantas y los subproductos de cosecha fueron recolectados en la región de Texcoco y en los Estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz.

5.3.4. Fármaco desfaunante (FD)

El fármaco utilizado fue el Secnidazol[®], el cual se adicionó a los medios de cultivo siguiendo el procedimiento descrito por Ley de Coss (2003) y Donato (2006) y se agregó en una cantidad de 0.65 mg de Secnidazol[®] 9 mL⁻¹ de medio de cultivo (Ley de Coss *et al.*, 2011).

5.3.5. Recuperación de protozoarios

El fluido ruminal (FR) se obtuvo entre las 8:00-9:00 de la mañana, de un toro Holstein fistulado de 2.5 años de edad. El FR se filtro con una tela de manta con el fin de eliminar partículas grandes de alimento. Posteriormente, se deposito (500 mL) en un embudo de separación y se colocó en una incubadora a 39°C hasta que se precipitaron los protozoarios que se observan como un anillo blanquecino en el fondo del embudo (tiempo aproximado de 15 min). De la masa de protozoarios precipitados (anillo blanquecino) se tomaron, en promedio, 5 mL y se depositaron bajo flujo de CO₂, en un tubo de cultivo 18X150 que contenía 5 mL del medio de cultivo GCA-FR. Una gota de esta mezcla se deposito por capilaridad en las dos cuadrículas de la cámara Neubauer, y se realizó el conteo de protozoarios de acuerdo a la técnica descrita por Ogimoto y Imai (1981). Una vez conocida la concentración de protozoarios por mL del medio de recuperación, se calcula la cantidad que se debería agregar en los diferentes tratamientos y sus repeticiones, para asegurar una concentración inicial de protozoarios (hora “cero” de incubación) igual o mayor a 1X10⁵ por mL⁻¹ del medio de cultivo.

Cuadro 5.1 Composición de los medios de cultivo usado para estimar la concentración de protozoarios y bacterias del rumen.

Compuesto	Cantidad/100 mL de medio		
	Medio GCA-FR	Medio PSD*	Medio FD**
Agua destilada	47.42 mL	47.42 mL	47.42 mL
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL
Solución mineral I ⁽²⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución mineral II ⁽³⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Carbonato de sodio. solución 8% ⁽⁴⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Acetato de sodio. 1.5 % ⁽⁵⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución sulfito-cisteína ⁽⁶⁾	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.20 g	0.20 g	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g	0.10 g	0.10 g
Glucosa	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Celobiosa	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Almidón	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Planta ó residuo desfaunante	----	0.1 g	----
Secnidazol [®]	----	----	6.5 g

(1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10.000 rpm. por 15 minutos a 4 °C. esterilizado 20 minutos a 15 psi. 121°C; (2) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K₂HPO₄; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂·H₂O; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 1.5 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S·9H₂O (en 100 mL de H₂O); (7) 0.1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL. calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.

* Plantas y subproductos de cosecha con capacidad desfaunante (ver cuadro 5.2).

** Fármaco desparasitante Secnidazol[®].

5.3.6 Técnica de inoculación de los medios de cultivo

Antes de la inoculación con los protozoarios, los tubos de cultivo anaerobio que contenían el medio GCA-FR y el sustrato a evaluar se mantuvieron a una temperatura de 39°C y se les agregó la mezcla de antibióticos descrita anteriormente. La inoculación de los medios de cultivo con el concentrado de protozoarios viables (1 mL por 9 mL de medio de cultivo), se realizó bajo flujo de CO₂. Para realizar el conteo y determinar la concentración de protozoarios existentes en el medio de cultivo se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio de contrastes (Zeiss,

Axiostar) a 400X de magnificación (Ogimoto y Imai. 1981), el conteo se realizo a las 0, 24, 48, 72 h de incubación.

Cuadro 5.2. Plantas y subproductos agrícolas con alta capacidad desfaunante.

Plantas	
Nombre común	Nombre científico
Chicalote blanco (follaje)	<i>Argemone ochroleuca</i>
Cocoite	<i>Gliricidia sepium</i>
Maguey	<i>Agave mapisaga.</i>
Subproductos agrícolas	
Nombre común	Nombre científico
Cascabillo de café	<i>Coffea arabica</i>

5.3.7 Conteo de protozoarios viables

Debido a su gran movilidad, es difícil contar protozoarios viables en la cámara Neubauer, por lo que se procedió a considerar como protozoarios viables a aquellos protozoarios que mantuvieron su integridad morfológica después de ser fijados en una solución de formaldehído al 10% (Figura 1.1a y 1.1b; Capitulo III).

Se estimó la concentración de protozoarios por mL del medio de cultivo de cada tratamiento a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación. En cada tiempo, se extrajo con una pipeta Pasteur 0.5 mL de medio inoculado con protozoarios y se deposito por capilaridad en las dos cuadrículas que conforman la cámara de conteo Neubauer, posteriormente se observo en un microscopio de contraste modelo Axiostar (Zeiss) a 400X magnificaciones. El conteo de protozoarios se realizo en ocho cuadrantes (cuatro de cada cuadrícula) que tienen un área de 1 mm². El número de protozoarios por mL de medio de cultivo se estima de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoarios mL}^{-1} = (X) * (\text{FD}) * (10^4)$$

Donde:

X = media de los conteos de protozoarios en ocho cuadrantes (1 mm^2) de la cámara Neubauer.

FD = valor inverso de la dilución usada.

10^4 = Factor de corrección del volumen muestreado para conversión de datos a un volumen de 1mL.

5.3.8 pH ruminal.

Se midió el pH a las 0 y 72 h de incubación de iniciado el experimento, con un potenciómetro marca ORION 250, calibrado a dos buffers (pH 4 y 7).

5.3.9. Conteo de Bacterias ruminales totales

El conteo de bacterias totales se realizo en una cámara Petroff-Hausser (Halisser Scientific®) y un microscopio Olympus (modelo BX51) a una magnificación de 1000X. La fórmula para estimar la concentración de bacterias ruminales totales por mL de medio de cultivo fue la siguiente:

$$\text{Bacterias totales mL-1} = (X) (FD) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X = media de los conteos de bacterias en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser.

FD = valor inverso de la dilución usada.

2×10^7 = Factor de conversión de la cantidad de protozoarios contados en la cámara Petroff-Hausser a bacterias por mL del medio de cultivo.

5.3.10 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Para determinar la producción de ácidos grasos volátiles, se recolectaron 4 mL del medio de cultivo de cada tratamiento y sus repeticiones, se adiciono ácido metafosfórico al 25% en una proporción de 4:1 mL de muestra: ácido, respectivamente. Se homogenizo la mezcla, se transfirieron 2 mL en viales para centrifuga y se centrifugaron las muestras en a 14,000 rpm (20,817 X g) por 10 min a una temperatura de 4°C, en una centrifuga Eppendorf, modelo 5810R. Finalmente, se recolecto el sobrenadante y se almaceno en refrigeración hasta su análisis. El contenido de AGV de las muestras se determino por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Clarus 500, marca PerkinElmer con automuestreador, se uso una columna capilar empacada Elite FFAP (PerkinElmer). El gas nitrógeno fue usado como gas acarreador. El proceso de calibración del estándar de AGV se realizó por triplicado. Las temperaturas del horno, el detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron de 120°C, 250°C y 250°C, respectivamente. El tiempo de retención de los analítos fue: acetato 2.25 min, propionato 2.75min y butirato 3.25min, con un total de 4.62 min de corrida.

5.3.11 Diseño y análisis estadístico

Con el fin de seleccionar la mejor planta y subproducto de cosecha con ACD, las variables a considerar fueron la concentración de protozoarios viables, el número de bacterias ruminales totales y la producción de AGV, cada una se midió por triplicado en cada tratamientos experimental durante las 0, 24, 48, 72, 96 h de incubación *in vitro*. Para el análisis de los datos del conteo de protozoarios íntegros, se utilizó un modelo de regresión binomial negativa, realizando la comparación de medias por el método de Bonferroni ($P < 0.05$; SAS, 2002). Las variables, producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y conteo de bacterias ruminales totales,

fueron analizadas por medio de un diseño completamente al azar (GLM; SAS, 2002) sumado a una comparación de medias por el método de tukey ($P < 0.05$).

5.4 RESULTADOS

La concentración promedio de protozoarios por mL de medio de cultivo a la hora cero de incubación, fue bastante homogénea entre los diferentes tratamientos con un rango de 6.3 a 7.0 protozoarios mL^{-1} de medio de cultivo (Cuadro 5.3). El tratamiento testigo a base de glucosa celobiosa, almidón y fluido ruminal (la composición exacta esta en el Cuadro 5.1) mantuvo una concentración de protozoarios y bacterias ruminales totales similar entre la 0 y 96 h de incubación. A las 24 h de incubación, todos los agentes desfaunantes, con excepción del chicalote blanco, produjeron una disminución ($P < 0.05$) en la concentración de protozoarios con relación al tratamiento testigo. A partir de las 48 h de incubación, todos los agentes desfaunantes disminuyeron ($P < 0.05$) la concentración de protozoarios ruminales con relación al tratamiento testigo, sin diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre ellos. Con respecto a la concentración de bacterias ruminales totales, se observa que a las 24 h de incubación el Secnidazol[®], y las plantas cocoite y chicalote disminuyeron ($P < 0.05$) la concentración de bacterias totales con relación al tratamiento testigo. A la 48 h y 72 h de incubación únicamente el Secnidazol[®] y el cascabillo de café (respectivamente) tuvieron una menor ($P < 0.05$) concentración con relación al tratamiento testigo. A las 96 h de incubación, no se detecto ninguna diferencia entre tratamientos.

Cuadro 5.3. Efecto de los agentes desfaunantes sobre la concentración de protozoarios y bacterias ruminales a diferentes horas de incubación.

Agente desfaunante	Tiempo de incubación, h				
	0	24	48	72	96
Concentración de protozoarios (10^4 mL ⁻¹)					
Medio GCA-FR (testigo)	7.0 ^a	2.5 ^a	2.3 ^a	1.7 ^a	1.5 ^a
Secnidazol [®]	6.8 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b	0.0 ^b
Cascabillo de café (<i>C. arabica</i>)	7.1 ^a	0.6 ^b	0.2 ^b	0.1 ^b	0.2 ^b
Magüey forrajero (<i>A. mapisaga</i>)	7.1 ^a	0.6 ^b	0.2 ^b	0.2 ^b	0.2 ^b
Cocoite (<i>G. sepium</i>)	6.5 ^b	0.9 ^a	0.5 ^b	0.3 ^b	0.2 ^b
Chicalote blanco (<i>A. ochroleuca</i>)	6.3 ^b	0.4 ^b	0.3 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b
EEM±	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Concentración de bacterias totales (10^8 mL ⁻¹)					
Medio GCA-FR (testigo)	13.0 ^a	11.2 ^a	7.0 ^a	7.2 ^{ba}	6.1 ^a
Secnidazol [®]	12.2 ^{ba}	7.0 ^b	5.3 ^b	6.1 ^{ba}	4.9 ^a
Cascabillo de café (<i>C. arabica</i>)	11.5 ^{ba}	8.7 ^{ba}	7.6 ^a	5.0 ^b	6.2 ^a
Magüey forrajero (<i>A. mapisaga</i>)	10.8 ^{ba}	8.0 ^{ba}	8.1 ^a	7.2 ^{ba}	6.2 ^a
Cocoite (<i>G. sepium</i>)	10.6 ^b	6.8 ^b	6.6 ^{ba}	7.3 ^a	5.2 ^a
Chicalote blanco (<i>A. ochroleuca</i>)	10.6 ^b	7.4 ^b	6.6 ^{ba}	7.0 ^{ba}	5.0 ^a
EEM±	0.4	0.7	0.4	0.5	0.4

^{a,b} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas (P<0.05)

A las 0 h de incubación la producción total de AGV y la proporción acetato:propionato (5:1), fue similar (P<0.05) en todos los tratamientos (Cuadro 5.4). A las 24 h de incubación la proporción acetato:propionato disminuyó en todos los tratamientos, con excepción del cascabillo de café, que presentó una fermentación acética. A partir de las 48 h de incubación la producción total de AGV fue menor en el tratamiento con Secnidazol[®]. En general, el magüey forrajero, el cocoite, el chicalote blanco y el cascabillo de café, favorecieron una mayor (P<0.05) producción de AGV a partir de las 48 h de incubación, con relación al tratamiento testigo y el de Secnidazol[®].

Cuadro 5.4. Concentración y proporción de ácidos grasos volátiles (mol L⁻¹ medio de cultivo) y relación acetato: propionato, a diferentes horas de incubación.

Tiempo (horas)	AGV		Tratamientos					EEM±	
			Testigo GCA-FR	Secnidazol [®]	Cascabillo de café	Maguey forrajero	Cocoite		Chicalote blanco
0	Acético	mol L ⁻¹	24.5 ^a	23.7 ^a	24.5 ^a	24.2 ^a	23.6 ^a	23.3 ^a	0.7
		%	78.2	76.7	76.5	78.8	79.2	78.7	---
	Propiónico	mol L ⁻¹	4.2 ^a	4.3 ^a	4.6 ^a	4.0 ^a	3.8 ^a	3.8 ^a	0.2
		%	13.3	13.8	14.3	13.0	12.7	12.8	---
	Butírico	mol L ⁻¹	2.7 ^a	3.0 ^a	3.0 ^a	2.5 ^a	2.4 ^a	2.5 ^a	0.2
		%	8.5	9.5	9.2	8.2	8.2	8.4	---
	AGV total	mol L ⁻¹	31.4 ^a	31.0 ^a	32.1 ^a	30.7 ^a	29.9 ^a	29.6 ^a	1.0
Acetato:propionato		5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	---	
24	Acético	mol L ⁻¹	41.76 ^a	39.56 ^a	45.84 ^a	42.77 ^a	39.96 ^a	43.69 ^a	1.5
		%	78.01	76.89	76.86	78.92	77.89	78.91	----
	Propiónico	mol L ⁻¹	6.98 ^{ab}	7.18 ^{ab}	7.90 ^a	6.46 ^{ab}	6.20 ^b	6.47 ^{ab}	0.3
		%	13.04	13.89	13.14	11.92	12.10	11.71	----
	Butírico	mol L ⁻¹	4.79 ^a	4.80 ^a	6.09 ^a	4.96 ^a	5.13 ^a	5.18 ^a	0.3
		%	8.95	9.22	10.00	9.16	10.01	9.38	----
	AGV total	mol L ⁻¹	53.53 ^a	51.54 ^a	59.82 ^a	54.19 ^a	51.3 ^a	55.34 ^a	2.0
Acetato:propionato		4:1	4:1	5:1	4:1	4:1	4:1	----	
48	Acético	mol L ⁻¹	44.36 ^a	36.11 ^b	46.69 ^a	48.36 ^a	42.85 ^{ab}	43.49 ^a	1.5
		%	79.10	76.94	77.46	80.91	78.22	79.24	----
	Propiónico	mol L ⁻¹	6.71 ^{ab}	6.52 ^{ab}	7.49 ^a	6.25 ^{ab}	6.19 ^{ab}	6.03 ^b	0.3
		%	11.98	13.77	12.36	10.49	11.30	11.05	----
	Butírico	mol L ⁻¹	4.98 ^a	4.44 ^a	6.22 ^a	5.14 ^a	5.74 ^a	5.32 ^a	0.3
		%	8.92	9.28	10.19	8.60	10.48	9.71	----
	AGV total	mol L ⁻¹	56.05 ^{ab}	47.06 ^b	60.4 ^a	59.75 ^a	54.78 ^{ab}	54.84 ^{ab}	2.0
Acetato:propionato		4:1	4:1	5:1	5:1	4:1	4:1	----	
72	Acético	mol L ⁻¹	45.35 ^a	37.64 ^b	49.22 ^a	51.23 ^a	46.04 ^a	50.16 ^a	1.4

		%	79.78	77.66	77.98	81.30	79.00	80.13	----
	Propiónico	mol L ⁻¹	6.47 ^a	6.35 ^a	7.50 ^a	6.38 ^a	6.17 ^a	6.44 ^a	0.3
		%	11.38	13.08	11.79	10.18	10.59	10.31	----
	Butírico	mol L ⁻¹	5.02 ^{ab}	4.54 ^b	6.55 ^a	5.35 ^{ab}	6.07 ^{ab}	5.98 ^{ab}	0.4
		%	8.83	9.26	10.23	8.52	10.42	9.56	----
	AGV total	mol L ⁻¹	56.84 ^{ab}	48.53 ^b	63.27 ^a	62.96 ^a	58.29 ^a	62.59 ^a	1.9
	Acetato:propionato		5:1	4:1	5:1	5:1	5:1	5:1	----
	Acético	mol L ⁻¹	46.37 ^{bc}	40.82 ^c	50.76 ^{ab}	54.88 ^a	49.16 ^{ab}	48.96 ^{ab}	1.3
		%	79.26	78.11	77.94	81.73	78.97	80.05	----
	Propiónico	mol L ⁻¹	6.79 ^a	6.69 ^a	7.71 ^a	6.65 ^a	6.62 ^a	6.32 ^a	0.3
		%	11.62	12.81	11.77	9.92	10.63	10.34	----
96	Butírico	mol L ⁻¹	5.34 ^a	4.78 ^a	6.77 ^a	5.60 ^a	6.49 ^a	5.88 ^a	0.4
		%	9.12	9.07	10.28	8.35	10.41	9.61	----
	AGV total	mol L ⁻¹	58.49 ^{bc}	52.29 ^c	65.24 ^{ab}	67.13 ^a	62.27 ^{ab}	61.17 ^{ab}	1.8
	Acetato:propionato		5:1	4:1	5:1	5:1	5:1	5:1	----

^{a b c} Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas (P<0.05)

5.6 DISCUSIÓN

El tratamiento testigo a base de glucosa celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR; cuadro 5.1) confirma, que es posible mantener protozoarios viables en cultivo, hasta por 96 h. Por tanto, la disminución de protozoarios observada en otros tratamientos es atribuible a su capacidad desfaunante. La concentración de protozoarios presenta una disminución $P < 0.05$ (con relación al tratamiento testigo) desde las 24 h de incubación con todas las plantas y el residuo seleccionados por su ACD, por tanto, se confirman los resultados obtenidos en un experimento anterior (Capítulo IV). Para las 48 h no se presentan diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos desfaunantes, pero las plantas de *A. mapisaga*, *A. ochroleuca* (follaje) y el subproducto de cascabillo de *C. arabica*, tienen una población de $< 3 \times 10^3$ protozoarios/mL, un valor que disminuye a 1×10^3 protozoarios/mL a las 72 h, con el subproducto y el follaje de chicalote (ver cuadro 5.3) En un estudio *in vitro* similar a este, la fracción soluble de la planta de *Argemone mexicana* presento actividad desfaunante desde las 48 h de incubación (Ley de Coss, 2003). Ya se ha reportado la presencia de taninos condensados en el cocoite (*G. sepium*); así como en subproductos del café (cascabillo, cascara y pulpa; Clifford. 1991, Galindo *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2011; Heičmović *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2012), por lo que es muy posible que este metabolito secundario sea el responsable de la ACD detectada en el cocoite y el cascabillo de café.

Considerando que la concentración de bacterias ruminales totales, solamente disminuyo ($P < 0.05$) con respecto al tratamiento testigo, en el tratamiento con Secnidazol® (a las 24 y 48 h de incubación), se puede concluir que las plantas y el residuos agrícola evaluados, son capaces de producir desfaunación, sin afectar negativamente la concentración de bacterias ruminales totales. Lo que es más notorio a las 96 h de incubación, en donde la concentración de bacterias ruminales

por mL de medio de cultivo fue similar ($P \geq 0.05$) entre todos los tratamientos. Aunque en esta investigación, el Secnidazol[®] solo se uso como un tratamiento testigo positivo de desfaunación, conviene mencionar, que la toxicidad para los protozoarios, también se ha presentado en algunas bacterias anaerobias como: *Veiollonella sp.*, *Clostridium butyricum*, y *Clostridium perfringens*. Estos microorganismos son sensibles a la acción inhibitoria de varios nitroimidazoles (p. ej. metrodinazol, oridazol, Secnidazol[®] y tinidazole; Wüst, 1977). Sin embargo, es importante mencionar que en otros estudios, se ha reportado un aumento, mayor de 1×10^9 bacterias/mL⁻¹ medio de cultivo, asociado a la desfaunación que produce el Secnidazol[®] (Ley de Coss, 2003; Donato, 2006).

El chicalote blanco contiene un alcaloide isoquinolinico denominado berberina, que es tóxico para bacterias Gram positivas (Reyes *et al.*, 2011). Igualmente, las hojas del cocoite reducen ($P < 0.05$), la población de bacterias ruminales totales en un 97 y 94%, como efecto de la presencia de taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos y esteroides (Galindo *et al.*, 2001). Considerando que, tanto el cocoite como el chicalote, promovieron una menor concentración de bacterias ruminales, únicamente a las 24 h de incubación; y que, posteriormente (48, 72 y 96 h de incubación) no se detectaron diferencias ($P > 0.05$) con el tratamiento testigo, se puede suponer, que la sensibilidad de las bacterias ruminales a diferentes metabolitos secundarios es temporal y que son capaces de desarrollar resistencia, tal como lo han demostrado con otros agentes antibacterianos (p. ej. antibióticos).

Se determinó que un efecto asociado a la desfaunación, es un cambio en el tipo de fermentación microbiana, que se refleja en la proporción y producción total de AGV. A las 48 h de incubación la concentración molar del ácido acético en el tratamiento con Secnidazol[®], es menor ($P < 0.05$) con el tratamiento testigo y se mantiene en los siguientes periodos. Este resultado es similar al

que reporta Donato (2006), aunque en su estudio las diferencias con el tratamiento testigo iniciaron a partir de las 24 h de incubación, manteniéndose esta situación hasta las 72 h de incubación.

5.7 CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de cultivo *in vitro* de protozoarios ruminales usados en este estudio, se confirma, que los medios de cultivo anaerobios usados para el crecimiento de protozoarios ruminales es confiable para seleccionar plantas o residuos agrícolas con capacidad desfaunante. Todas las plantas evaluadas (chicalote, cocoite y maguey forrajero) y el cascabillo de café, logran disminuir la población de protozoarios ruminales, sin que se presente una disminución importante en la concentración de bacterias ruminales. La defaunación produce cambios en la producción total de AGV y en la proporción acetato:propionato; sin embargo el efecto depende del tipo de agente desfaunante, lo que resulto muy evidente con el Secnidazol[®].

5.8 LITERATURA CITADA

- Abdel, S. E., L. Maes, and S. M. Mahmoud. 2010. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytotherapy Research* 24: 1322-1328.
- Buddle B. M., M. Denis, G.T. Attwood, E. Altermann, P.H Janssen, R. S. Ronimus, C. S. Pinares-Patiño, S. Muetzel, and D.N. Wedlock. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal* 188: 11–17.
- Clifford, M. N. 1991. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry* 40: 191-200.

- Delgado, D. C., J. Galindo, R. González, N. González, I. Scull, L. Dihigo, J. Cairo, A. Aldama, and O. Moreira. 2012. Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health Production* 44: 1097-1104.
- Donato, J.A. 2006. Evaluación de la capacidad desfaunante de la planta de Yuca (*Yucca schidigera*) y fármaco Secnidazol[®]. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-77.
- Esquivel, P., and V. M. Jiménez. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46: 488–495.
- Galindo, J., Y. Marrero, N. González, y A. I. Aldama. 2001. Efecto de *Gliricidia sepium* en la población protozoaria y organismos celulolíticos ruminales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 35: 235 -239
- Guan, H., K. M. Wittenberg, K. H. Ominski, and D. O. Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science* 84: 1896-1906.
- Hart, K.J., D.R. Yáñez, S.M. Duval, N.R. McEwan, and C.J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 147: 8-35
- Heičmović, I., A. Belščak, D. Horžić, and D. Komes. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry* 129: 991-1000
- Hook S. E., A. G. Wright, and B. W. McBride. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* 10:1 11.

- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review* 14:1-49.
- Ley De Coss, A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos y plantas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México pp 1-74
- Ley De Coss, A., M. A. Cobos, D. Hernández, y E. Guerra. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ XXI* 1: 43 - 49.
- Liu, H., V. Vaddella, and D. Zhou. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of Dairy Science* 94: 6069-6077.
- Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. Rumen Protozoa. *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press. Japan pp: 230.
- Patra, A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363-375.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- Pinos, J.M., M. Zamudio, S.S. Gonzalez, G.D. Mendoza, R. Barcena, M. E. Ortega, and L. A. Miranda. 2009. Effects of maturity and ensiling of *Agave salmiana* on nutritional quality for lambs. *Animal Feed Science and Technology* 152: 298-306.

- Reyes, F.D., C. J. Peña, M. Canales, M. Jiménez, S. Meráz, and T. Hernández. 2011. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10: 139 - 146.
- SAS Institute. 2002. User's guide: statistics, version 10 editions. SAS Institute, Inc., Cary, N. C.
- Ulloa, J. B., J. A. J. Verreth, J. H. van Weerd, and E. A. Huisman. 2002. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. Animal Feed Science and Technology 99: 195-204.
- Wüst, J. 1977. Susceptibility of Anaerobic Bacteria to Metronidazole, Ornidazole, and Tinidazole and Routine Susceptibility Testing by Standardized Methods. antimicrobil agents and chemotherapy. 11(4):631-637.

CAPITULO VI

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DESFAUNANTE, PRODUCCIÓN DE BIOGAS Y DIVMS ENTRE EL CHICALOTE (*Argemone ochroleuca*), CASCABILLO DE CAFÉ (*Coffea arabica*) Y SECNIDAZOL

6.1 RESUMEN

Se comparo la capacidad desfaunante del follaje de chicalote (*Argemone ochroleuca*), el cascabillo de café (*Coffea arabica*) y el desparasitante Secnidazol[®]. Además se estimo su efecto sobre la concentración de bacterias ruminales totales, producción de AGV, CH₄, CO₂, y la DIVMS usando como sustrato alfalfa. El estudio se realizó *in vitro* usando un medio de cultivo selectivo para el crecimiento de protozoarios. El Secnidazol[®] tuvo mayor (P<0.05) capacidad desfaunante a las 24 h de incubación con relación al chicalote y el cascabillo de café. Además, no presentó efecto tóxico en bacterias ruminales, mientras que los otros tratamientos desfaunantes disminuyeron (P<0.05) la concentración de bacterias ruminales a las 72 h de incubación. En cuanto a la producción de biogás, el fármaco disminuyo (P<0.05) la producción de biogás (40.5 mL/g), con relación a los tratamiento testigo (108.9 mL/g), chicalote (358 mL/g) y cascabillo de café (495 mL/g). En general, la producción total de AGV fue similar entre tratamientos a las 24, 48 y 72 h de incubación, y se determino una fermentación de tipo acético-butírica en todos los tratamientos desfaunantes. El subproducto de café y el Secnidazol[®] estimularon una mayor (P<0.05) DIVMS de la alfalfa a las 72 h de incubación. Se concluye que el chicalote y el cascabillo de café no compiten con el Secnidazol[®] en cuanto a efectividad desfaunante, capacidad para disminuir la producción de biogás y metano, y su inocuidad hacia bacterias ruminales.

Palabras claves: Metano, *Coffea arabica*, *Argenome ochroleuca*, biogás.

ABSTRACT

The defaunation capacity among the leaves of chicalote (*Argenome ochroleuca*), coffee husk (*Coffea arabica*) and the Secnidazole[®] drug was evaluated. Also, their effect on rumen bacteria concentration, VFA, CH₄ and CO₂ production, and IVDMD using alfalfa as substrate, was estimated. This assay was performed *in vitro* using a selective anaerobic medium for protozoa. After 24 h of incubation the Secnidazole[®] treatment had the highest (P<0.05) defaunation capacity compared with the chicalote and coffee husk treatments. Furthermore, no toxic effects on rumen bacteria were observed, but the other defaunation treatments decreased (P<0.05) the rumen bacteria concentration at 72 h of incubation. With respect to the biogas production, the drug reduced (P<0.05) the biogas production (40.5 mL/g), compared to the control (108.9 mL/g), chicalote (358 mL/g) and coffee husk (495 mL/g) treatments. In general, the VFA production was similar among treatments at 24 h of incubation, and a acetic-butyric fermentation type was observed in all the defaunation treatments. The coffee by-product and Secnidazol[®] enhanced (P<0.05) the alfalfa IVDMD after 72 h of incubation. It is concluded that the chicalote and the coffee husk did not compete with Secnidazole[®] on defaunation effectiveness, ability to stimulate less biogas and methane production, and it is not harmful to the rumen bacteria.

Key words: Metano, *Coffea arabica*, *Argenome ochroleuca*, biogás.

6.2 INTRODUCCIÓN

La técnica de producción de gas *in vitro* puede ser utilizada para estimar la degradación microbiana de la materia seca y sus componentes (Karlssona *et al.*, 2009), así como la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂). La metodología común de esta técnica contempla la utilización de líquido ruminal fresco como inóculo, que se agrega a un frasco herméticamente sellado que contiene medio de cultivo anaerobio y el sustrato a evaluar (p. ej. forraje, grano), el medio inoculado se incuba a 39°C por un tiempo determinado (24 a 96 h) y se estima la producción de biogás por desplazamiento de una solución o de una área en una jeringa (Huntington *et al.*, 1998; Chenost *et al.*, 2001; Camacho *et al.*, 2010). Mientras que la producción de metano y dióxido de carbono se puede estimar por cromatografía de gases usando un detector de conductividad térmica.

Las emisiones de metano (CH₄) provenientes de la fermentación ruminal representan el 16% del total mundial de gases efecto invernadero (GEI), este gas tiene una vida atmosférica de 9-10 años y un efecto invernadero 25 veces mayor que el CO₂ (Scheehle y Kruger, 2006; Unger *et al.*, 2010;). En México el 19.8% de sus emisiones del sector ganadero, se producen por fermentación entérica (Comité Intersecretarial sobre Cambio Climático, 2009). Las estrategias de desfaunación tienen como objetivo eliminar o disminuir la población de protozoarios ciliados del rumen, los cuales mantiene una interacción ectosimbiótica con arqueobacterias metanogénicas (Vogels y Stumm, 1980; Hans-Dieter, 2006; Ozutsumi *et la.*, 2006; Tóthová *et la.*, 2008). Por tanto, la desfaunación afecta la población de estas bacterias, disminuyendo así las emisiones de metano de los rumiantes y su contribución al cambio climático global.

Para lograr la desfaunación y la mitigación de las emisiones de en rumiantes, se a utilizado estrategias como, la suplementación con 1.5 mL de cloroformo, diluido en aceite de girasol, en

dietas para ganado lechero a base de ensilado y concentrado (87:13, respectivamente, base seca), como resultado, disminuyó la concentración de protozoarios ruminales de 2.17×10^5 (inicial) a 1.88×10^5 (7 d); sin embargo, durante el 8 d hasta 32 d, la población de protozoarios regresó a su nivel inicial (2.77×10^5). Mientras que, la población inicial de arqueobacterias metanogénicas (4.8×10^8 /mL) disminuyó ($P < 0.01$) con relación al tratamiento testigo, entre 1.24×10^6 /mL a 5.21×10^6 /mL, entre los 7 a 32 d que duró el experimento. A pesar de que la concentración de protozoarios se volvió a incrementar, las emisiones de metano, fueron numéricamente más elevadas en el tratamiento testigo que en el tratamiento con cloroformo (184 vs 146 g/d) manteniéndose así hasta el día 32 (Knight *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de cloroformo, aunque en pequeñas dosis, puede producir efectos nocivos para el animal y por tanto no se recomienda su uso.

El uso del follaje y frutos de arbóreas que contienen metabolitos secundarios (p. ej. taninos, alcaloides y saponinas) representan una alternativa sostenible en la disminución de las emisiones de metano (Animut *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008). En condiciones *in vivo*, la adición de taninos de castaña (30 g /KgMS) en la dieta, reducen la producción de metano en 31% en comparación con el tratamiento control (Liu y *et al.*, 2011). En condiciones *in vitro* la mezcla de 30% de pasto estrella con leguminosas arbustivas como: *Samanea saman*, *Albizia lebbbeck*, *Albizia indica*, *Tithonia diversifolia*, *Morus alba*, *Leucaena leucocephala*, *P. dulce*, *Moringa olifera*, ocasionan una reducción promedio de 23% en la producción de metano (CH_4 mL/100 mL gas; Delgado *et al.*, 2012). Estas plantas tienen metabolitos secundarios como: taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides, antocianinas, alcaloides (Delgado *et al.*, 2012). El uso de los extractos de *Salix babylonica* y *Leucaena leucocephala* (1.8 mL/g MS) disminuye la producción de gas *in vitro* a 242.1 mL/ g MS. (Jiménez, 2011). La producción de gas *in vitro* fue mayor ($P < 0.05$) con

arbustos de bajo contenido de taninos como *Quercus laeta* y *Pithecellobium dulce*. Efecto contrario presenta *Lysiloma acapulcensis* planta que presenta un alto contenido de taninos (Camacho *et al.*, 2010).

En este experimento se evaluó la planta de chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) y el subproducto de cosecha, cascabillo de café (*Coffea arabica*), materiales que presentaron alta capacidad desfaunante (ACD) en un experimento previo (ver Capítulo V). El follaje del chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) contiene flavonoides y alcaloides (Chemler *et al.*, 2009) que le confieren capacidad inhibitoria al chicalote contra protozoarios (Abdel *et al.*, 2010) y algunas bacterias patógenas (Reyes *et al.*, 2011). Así mismo, la presencia de taninos en los subproductos cascarilla, cascabillo y pulpa de café (*Coffea arabica*), limitan su uso en la alimentación animal debido al efecto anti-nutricional que presentan (Esquivel y Jiménez, 2012; Ulloa *et al.*, 2002). En la actualidad no se encontraron reportes científicos sobre el usos de este tipo de materiales desfaunantes, por lo tanto el objetivo de este trabajo es determinar el su efecto en variables de fermentación ruminal, la producción total de biogás, metano y dióxido de carbono, así como la degradación *in vitro* de la materia seca.

6.3 MATERIALES Y METODOS

6.3.1 Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, perteneciente al programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

6.3.2 Medio de cultivo para la sobrevivencia de protozoarios en los tratamientos evaluados

El medio de cultivo usado en el experimento tuvo como componentes principales glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR), y se adiciono penicilina y estreptomicina para limitar el crecimiento de bacterias ruminales. La composición exacta del medio de cultivo GCA-FR se describe en el cuadro 6.1. Los medios fueron preparados usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate (1950). En tubos de cultivo de 18X150 mm que contenían 0.01 g del sustrato a evaluar (planta o residuo agrícola) se adicionaron 9 mL de medio de cultivo GCA-FR. Además, a cada tubo se le adicionaron 100 μL /9 mL medio de cultivo, de una solución de antibióticos (HIDRO-PEN[®]) que contiene 25 mg mL⁻¹ de estreptomicina y 20,000 UI mL⁻¹ de penicilina (Ley de Coss 2003). La planta chicalote blanco. (*Argenome ochroleuca*) y el subproducto agrícola cascabillo de café (*Coffea arabica*), fueron deshidratados por 48 h en una estufa de secado a 60°C, posteriormente este material se molió en un molino Willey (criba de 1 mm) y se pulverizo en un mortero de ágata (Fritsch). Para el experimento se agregaron 0.02 g del material molido en 20 mL de medio de cultivo. El fármaco usado como control positivo (desfaunante) se adiciono de acuerdo a la metodología descrita por Ley de Coss (2003) y Donato (2006), agregando 0.65 mg de Secnidazol[®]/9 mL de medio de cultivo (Ley *et al.*, 2011).

6.3.3. Recuperación del inóculo de protozoarios

El fluido ruminal (FR) se obtuvo entre las 8:00-9:00 de la mañana, de un toro Holstein fistulado de 2.5 años de edad. El FR se filtro con una tela de manta con el fin de eliminar partículas grandes de alimento. Posteriormente, se deposito (500 mL) en un embudo de separación y se coloco en una incubadora a 39°C hasta que se precipitaron los protozoarios que se observan como un anillo blanquecino en el fondo del embudo (tiempo aproximado de 15 min). De la masa

de protozoarios precipitados (anillo blanquecino) se tomaron, en promedio, 5 mL y se depositaron bajo flujo de CO₂, en un tubo de cultivo 18X150 que contenía 5 mL del medio de cultivo GCA-FR. Una gota de esta mezcla se depositó por capilaridad en las dos cuadrículas de la cámara Neubauer, y se realizó el conteo de protozoarios de acuerdo a la técnica descrita por Ogimoto y Imai (1981). Una vez conocida la concentración de protozoarios por ml del medio de recuperación, se calcula la cantidad que se debería agregar en los diferentes tratamientos y sus repeticiones, para asegurar una concentración inicial de protozoarios (hora “cero” de incubación) igual o mayor a $1 \times 10^5 / \text{mL}^{-1}$ del medio de cultivo.

Cuadro 6.1. Composición de los medios de cultivo usados para evaluar la capacidad desfaunante, producción de biogás, AGV y DIVMS del chicalote blanco y el cascabillo de café.

Compuesto	Cantidad/100 mL de medio				
	MR	Testigo	Desfaunante	T1	T2
Agua destilada	47.42 mL	47.42 mL	47.42 mL	47.42 mL	47.42 mL
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL
Solución mineral I ⁽²⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución mineral II ⁽³⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Carbonato de sodio. solución 8% ⁽⁴⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Acetato de sodio. 1.5 % ⁽⁵⁾	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL	5.0 mL
Solución sulfido-cisteína ⁽⁶⁾	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Tripticasa-peptona	0.20 g	0.20 g	0.20 g	0.20 g	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g	0.10 g	0.10 g	0.10 g	0.10 g
Glucosa	0.06 g	----	----	----	----
Celiobiosa	0.06 g	----	----	----	----
Almidón	0.06 g	----	----	----	----
Alfalfa	----	1 g	1g	1g	1g
Chicalote blanco (follaje)	----	----	----	0.1 g	----
Cascabillo de café	----	----	----	----	0.1 g
Secnidazol [®]	----	----	6.5 g	----	----

(1) Líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10.000 rpm. por 15 minutos a 4 °C. esterilizado 20 minutos a 15 psi. 121°C; (2) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K₂HPO₄; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄ y 1.6 g de CaCl₂·H₂O; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 1.5 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2.5 g de Na₂S·9H₂O (en 100 mL de H₂O); (7) 0.1 mL de rezasurina en un volumen final de 100 mL. calentado hasta que el indicador pierde su coloración y esterilizado.

6.3.4 Técnica de inoculación de los medios de cultivo de los tratamientos evaluados

Antes de la inoculación con los protozoarios, los tubos de cultivo anaerobio que contenían el medio GCA-FR y el sustrato a evaluar se mantuvieron a una temperatura de 39°C y se les agregó la mezcla de antibióticos descrita anteriormente. La inoculación de los medios de cultivo con el concentrado de protozoarios viables (1 mL por 9 mL de medio de cultivo), se realizó bajo flujo de CO₂. Para realizar el conteo y determinar la concentración de protozoarios existentes en el medio de cultivo se utilizó una cámara Neubauer y un microscopio de contrastes (Zeiss, Axiostar) a 400X de magnificación (Ogimoto y Imai. 1981), el conteo se realizó a las 0, 24, 48, 72 h de incubación.

6.3.5 Conteo de protozoarios viables

Debido a su gran movilidad, es difícil contar protozoarios viables en la cámara Neubauer, por lo que se procedió a considerar como protozoarios viables a aquellos protozoarios que mantuvieron su integridad morfológica después de ser fijados en una solución de formaldehído al 10% (Figura 1.1a y 1.1b; Capítulo III).

Se estimó la concentración de protozoarios por mL del medio de cultivo de cada tratamiento a las 0, 24, 48 y 72 h de incubación. En cada tiempo, se extrajo con una pipeta Pasteur 0.5 mL de medio inoculado con protozoarios y se depositó por capilaridad en las dos cuadrículas que conforman la cámara de conteo Neubauer, posteriormente se observó en un microscopio de contraste modelo Axiostar (Zeiss) a 400X magnificaciones. El conteo de protozoarios se realizó en ocho cuadrantes (cuatro de cada cuadrícula) que tienen un área de 1 mm². El número de protozoarios por mL de medio de cultivo se estima de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoarios mL}^{-1} = (X) * (FD) * (10^4)$$

Donde:

X = media de los conteos de protozoarios en ocho cuadrantes (1mm^2) de la cámara Neubauer.

FD = valor inverso de la dilución usada.

10^4 = Factor de corrección del volumen muestreado para conversión de datos a un volumen de 1 mL.

6.3.6 pH ruminal.

Se midió el pH a las 0 y 72 h de incubación de iniciado el experimento, con un potenciómetro marca ORION 250, calibrado a dos buffers (pH 4 y 7).

6.3.7. Conteo de Bacterias ruminales totales

El conteo de bacterias totales se realizó en una cámara Petroff-Hausser (Halisser Scientific®) y un microscopio Olympus (modelo BX51) a una magnificación de 1000X. La fórmula para estimar la concentración de bacterias ruminales totales por mL de medio de cultivo fue la siguiente:

$$\text{Bacterias totales mL}^{-1} = (X) (FD) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X = media de los conteos de bacterias en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser.

FD = valor inverso de la dilución usada.

2×10^7 = Factor de conversión de la cantidad de protozoarios contados en la cámara Petroff-Hausser a bacterias por mL del medio de cultivo.

6.3.9 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Para determinar la producción de ácidos grasos volátiles, se recolectaron 4 mL del medio de cultivo de cada tratamiento y sus repeticiones, se adiciono ácido metafosfórico al 25% en una proporción de 4:1 mL de muestra: ácido, respectivamente. Se homogenizo la mezcla, se transfirieron 2 mL en viales para centrifuga y se centrifugaron las muestras en a 14,000 rpm (20,817 X g) por 10 min a una temperatura de 4°C, en una centrifuga Eppendorf, modelo 5810R. Finalmente, se recolecto el sobrenadante y se almaceno en refrigeración hasta su análisis. El contenido de AGV de las muestras se determino por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Clarus 500, marca PerkinElmer con automuestreador, se uso una columna capilar empacada Elite FFAP (PerkinElmer). El gas nitrógeno fue usado como gas acarreador. El proceso de calibración del estándar de AGV se realizó por triplicado. Las temperaturas del horno, el detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron de 120°C, 250°C y 250°C, respectivamente. El tiempo de retención de los analítos fue: acetato 2.25 min, propionato 2.75min y butirato 3.25min, con un total de 4.62 min de corrida.

6.3.10. Degradación *in vitro* de la MS de la alfalfa

La alfalfa se molió en un molino Willey (criba de 1 mm). Tanto la alfalfa como el papel filtro Whatman Núm. 541 se colocaron en una estufa de secado por 48 h a 70°C con el fin de eliminar el contenido de humedad, posteriormente, se dejo en una desecadora (PIREX) por 24 h, se registro el peso de los filtros. Se adiciono 0.2 g de alfalfa en frascos serológicos de 100 mL de capacidad que contenían 20 mL del medio de cultivo líquido anaerobio (Cuadro 6.1) junto con 0.02 g de planta y subproducto a evaluar (chicalote o cascabillo de café). Los frascos serológicos se dejaron en incubación durante 24 h para comprobar esterilidad y se dejaron en refrigeración hasta su uso. Antes de iniciar la inoculación, los frascos serológicos de cada tratamiento (cinco

repeticiones por tratamiento) se calentaron a 39° C. Los frascos fueron inoculados con 2 ml del inóculo de protozoarios y se incubaron a 39°C por 72 h. Al término del periodo de incubación el residuo no degradado se filtro en papel Whatman del número 541 con ayuda de una bomba de vacío. El papel filtro junto con el residuo se seco a 60°C por 48 h, posteriormente las mas muestras se pasaron a un desecado por 24 h para estabilizar su peso constante y finalmente se peso el residuo junto con el papel filtro. Por diferencia entre peso inicial y final (del papel fitro y de la muestra) se determino la degradación de la materia seca de la alfalfa (Argyle y Hespell, 1987). La fórmula utilizada para calcular el % de degradación *in vitro* de la MS de la alfalfa fue la siguiente:

$$\% \text{ de DIVMS de la alfalfa} = \left[\frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \right] \times 100$$

6.3.11. Inoculación, incubación de medios e instalación del sistema de producción de gas *in vitro*

La solución salina saturada (SSS) se preparó en un matraz aforado de 2000 mL, agregando 608 g de cloruro de sodio (NaCl) y 1600 mL de agua destilada, esta solución se mezclo en un termoagitador (Marca Cimarec 2 Mod. SP4692) hasta lograr diluir la sal. Posteriormente, se agregaron 16 mL de naranja de metilo al 0.1% (Marca Hycel), ajustando el pH a 2.3. Frascos serológicos de 100 mL de capacidad fueron llenados con la SSS, para ser usados como trampas del biogás (CH₄ y CO₂) producido durante la incubación. Los viales serológicos que contenían el medio de cultivo, alfalfa y el sustrato desfaunante (biorreactor) de cada tratamiento, se colocaron en un baño María a 39 °C, después de una hora, fueron inoculados con 2 mL de medio del inóculo de protozoarios ruminales, esto se realizó con jeringas estériles desechables de 5 mL y agujas hipodérmicas de calibre 20GX1¼' Marca Terumo. Cada biorreactor se conecto a una

trampa de captura de biogás, usando una manguera de hule marca Festo (0.25 m pneumatic, de 10 bar) de 40 cm de largo que en cada extremo tenia una aguja calibre 20GX1¼'. Cada trampa de biogás tenía insertada una aguja que funcionó como válvula de alivio para la salida de la SSS originada por la presión del biogás que se acumula en la trampa. La SSS desplazada se colecto en una probeta de 50 mL y se midió la cantidad desplazada en mL a las 24, 48, y 72 h de incubación (ver figura 2.1a y 2.1b).

6.3.12. Determinación de la producción de biogás, metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂).

Para la determinación de biogás total, se registro la cantidad de mL de solución salina desplazada después de 0, 24, 48 y 72 h de incubación. Para estimar la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) se inyecto 0.3 mL de muestra en un cromatógrafo de gases PerkinElmer, modelo Clarus 500. Se uso un detector de conductividad térmica las temperaturas del horno, columna y TCD fueron de 80°C, 170°C y 130°C respectivamente. Los tiempos de retención fueron 0.73 min y 1.05 min para CH₄ y CO₂ respectivamente.

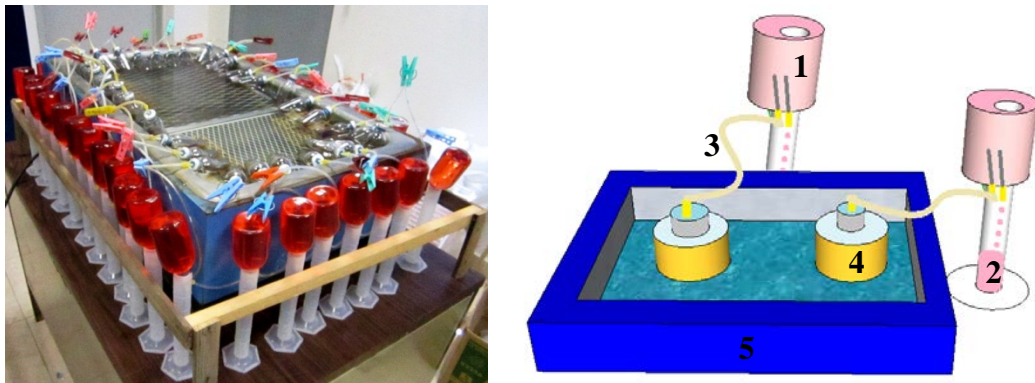


Figura 2.1. a) Sistema de producción de gas *in vitro*. b) Esquema descriptivo del sistema de producción de gas *in vitro*, donde: 1. Trampa con solución salina saturada (SSS); 2. Probeta de recolección de la SSS desplazada; 3. Manguera y aguja para guiar el flujo del biogás; 4. Biorreactor, frascos serológicos de cada tratamiento con el medio de cultivo inoculado; 5. Baño María.

6.3.13. Diseño experimental

Para estas pruebas, en el tratamiento testigo, se utilizó la alfalfa como sustrato (0.2g/ 20 mL medio de cultivo), usada para confirmar la sobrevivencia de protozoarios durante las 72 h de incubación, en una concentración de por lo menos 1×10^4 /mL medio de cultivo. El tratamiento denominado como de desfaunación tenía Secnidazol[®] (0.65 mg) además de los componentes del tratamiento testigo, lo cuales también fueron constantes para el T1 y T2, cambiando para estos tratamientos únicamente la adición de follaje de chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) ó cascabillo de café (*Coffea arabica*) en la cantidad de 0.02g/ 20 mL medio de cultivo. En total, fueron 4 tratamientos, cada uno con 5 repeticiones. El conteo de protozoarios viables, conteo de bacterias totales, pH, concentración de AGV, CO₂ y CH₄ se realizó a 0, 24, 48 y 72 h de incubación. Para el análisis de los datos del conteo de protozoarios viables, se utilizo un modelo de regresión binomial negativa, realizando la comparación de medias por el método de Bonferroni ($P < 0.05$; SAS 2002). Las variables de conteo de bacterias ruminales totales, pH, AGV, mL de SSS desplazada por gramo de alfalfa, proporción de CO₂ y CH₄, fueron analizadas en un diseño completamente al azar (GLM; SAS) y las diferencias entre las medias de cada variable se estimaron con el método de Tukey ($P < 0.05$).

6.4 RESULTADOS

Del análisis bromatológico de las plantas de alfalfa, chicalote y el residuo agrícola cascabillo, se destaca el alto contenido de proteína y bajo contenido de fibra detergente ácido y detergente neutra del follaje del chicalote. Esta planta es nativa de México y es común encontrarla en zonas sin labranza (ver cuadro 6.2).

Cuadro 6.2. Análisis bromatológico de las plantas alfalfa (*Medicago sativa*), chicalote (*Argemone ochroleuca*) y el cascabillo de café (*Coffea arabica*).

Plantas y subproducto	MS, %	Cenizas, %	PC, %	EE, %	FDN, %	FDA, %
Alfalfa	95,23	0,73	18,23	1,36	54,53	42,15
Chicalote blanco (follaje)	94,25	10,04	21,15	4,02	26,90	19,45
Cascabillo de café	96,09	10,76	3,45	0,62	89,18	69,75

A las 24 h de incubación, el Secnidazol[®] disminuyó ($P < 0.05$) la concentración de protozoarios con relación a los demás tratamientos, efecto constante hasta las 72 h de incubación (Cuadro 6.3). A las 48 h de incubación, los tratamientos con chicalote y cascabillo de café también disminuyeron su concentración de protozoarios con relación al tratamiento testigo ($P < 0.05$). Este efecto se mantuvo a las 72 h de incubación sin diferencias ($P \geq 0.05$) con el Secnidazol[®].

Cuadro 6.3. Concentración de protozoarios y bacterias ruminales totales a las 0, 24, 48, 72 h de incubación, pH de los biorreactores a las 0 y 72h y *DIVMS* de alfalfa a las 72 h de incubación.

Tiempo	Testigo	Secnidazol [®]	Chicalote	Cascabillo de café	
Concentración de protozoarios ruminales, 10 ⁴ mL					
0 h	13,3 ^b	13,5 ^b	13,4 ^b	19,8 ^a	EEM \pm 1,1
24 h	6,25 ^a	0,0 ^b	1,1 ^a	1,3 ^a	0,3
48 h	1,9 ^a	0,0 ^b	0,8 ^b	0,7 ^b	0,2
72 h	1,4 ^a	0,0 ^b	0,6 ^b	0,4 ^b	0,1
Concentración de bacterias totales ruminales, 10 ⁸ mL					
0 h	10,64	9,76	10,32	9,84	0,3
24 h	8,72	9,2	7,52	7,76	0,6
48 h	8,8	9,44	8,96	7,84	0,6
72 h	9,36 ^a	8,64 ^a	6,16 ^b	6,0 ^b	0,5
pH					
0 h	6,91	6,95	6,92	6,93	0,01
72 h	6,38	6,31	6,28	6,23	0,04
<i>DIVMS</i> , %					
72 h	5,7 ^b	7,0 ^{ba}	5,7 ^b	14,9 ^a	1,6

^{a,b} Valores con diferente literal por columnas presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

La concentración de bacterias ruminales totales durante las 0, 24 y 48 h de incubación no presenta diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos evaluados y el testigo; pero, a las 72 h los tratamientos con chicalote y cascabillo de café disminuyeron la concentración de bacterias ruminales totales, con relación a los tratamientos testigo y Secnidazol[®] ($P < 0.05$). De acuerdo con varios autores, se espera que con la desfaunación aumente el número de bacterias ruminales, debido a un aumento en la disponibilidad de nutrientes en el medio y a la disminución en la depredación por parte de los protozoarios ciliados. (Orpin y Lectcher, 1984). Sin embargo, en este estudio no se detectó un aumento importante en el número de bacterias debido a la desfaunación.

El pH en los biorreactores a las 0 h y 72 h de incubación no presentó diferencias significativas entre tratamientos y se mantuvo en valores adecuados para el crecimiento de bacterias y protozoarios ruminales. Finalmente la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de la alfalfa, fue mayor en el tratamiento con cascabillo de café presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) con todos los tratamientos (ver cuadro 6.3).

La mayor producción de biogás a las 24 h de incubación, se presentó en el tratamiento con chicalote y cascabillo de café ($P < 0.05$) con relación al tratamiento Secnidazol[®] (Cuadro 6.4). A las 48 h de incubación, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las variables evaluadas ($P > 0.05$). A las 72 h de incubación, el Secnidazol[®] muestra una mayor producción de biogás, asociada a una mayor producción de CO₂ y una disminución en la producción de CH₄ ($P < 0.05$) con relación a los demás tratamientos. La mayor producción de biogás total al finalizar el experimento (72 h) la presentó el cascabillo de café, sin diferencias significativas ($P > 0.05$) con el tratamiento de chicalote, pero sí presentó diferencias ($P \geq 0.05$) con el testigo y el desfaunante.

Cuadro 6.4. Producción total de biogás, y porcentaje de metano y dióxido de carbono en los biorreactores a las 24, 48, 72 h de incubación.

Variable	Testigo	Secnidazol [®]	Chicalote	Cascabillo	EEM±
				de café	
24 h de incubación					0.7
Biogás, mL	108.90 ^a	40.50 ^b	358.00 ^a	495.00 ^a	
CH ₄ , %	27.04 ^a	43.70 ^a	29.57 ^a	27.81 ^a	
CO ₂ , %	72.96 ^a	56.30 ^a	70.43 ^a	72.19 ^a	
48 h de incubación					0.8
Biogás, mL	43.80 ^a	119.60 ^a	92.90 ^a	56.30 ^a	
CH ₄ , %	48.12 ^a	36.64 ^a	36.19 ^a	36.11 ^a	
CO ₂ , %	51.87 ^a	63.35 ^a	63.80 ^a	63.89 ^a	
72 h de incubación					0.4
Biogás, mL	7.90 ^b	79.00 ^a	22.00 ^b	2.00 ^b	
CH ₄ , %	16.53 ^a	5.13 ^b	14.09 ^a	17.13 ^a	
CO ₂ , %	83.46 ^b	94.87 ^a	85.90 ^b	82.86 ^b	
Biogas total, mL	160.60 ^b	239.10 ^b	472.90 ^a	548.30 ^a	

^{a b} Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas (P<0.05).

Los resultados de la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y la proporción acetato:propionato se muestran en el cuadro 6.5. A las primeras 24 horas de incubación no se detectaron diferencias estadísticas en ninguna de las variables analizadas entre los tratamientos (P>0.05), la proporción acetato:propionato se mantuvo 5:1. A las 48 h de incubación la producción de acético, butírico y la producción total de AGV es menor (P<0.05) en los tratamientos con Secnidazol[®] y chicalote. Mientras que, la proporción más alta de acetato:propionato (7:1) se detecto en el tratamiento con cascabillo de café. A las 72 h de incubación, la única diferencia observada fue una menor producción de ácido butírico (P<0.05) en el tratamiento con Secnidazol[®]. El tratamiento con cascabillo de café obtiene una vez más la más alta proporción acetato:propionato (6:1).

Cuadro 6.5. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles y relación acético (C2): propiónico (C3), a diferentes horas de incubación.

Tiempo (horas)	AGV		Tratamientos				EEM±
			Testigo	Secnidazol®	Chicalote blanco	Cascabillo de café	
24	Acético	mol L ⁻¹	50.41	51.24	47.5	54.46	3.4
		%	75.75	76.98	76.53	75.00	---
	Propiónico	mol L ⁻¹	7.50	7.63	7.38	7.78	0.4
		%	11.35	11.50	12.05	10.72	---
	Butírico	mol L ⁻¹	7.64	7.00	6.93	10.1	0.9
		%	11.26	10.44	11.12	13.80	---
	AGV total	mol L ⁻¹	66.61	66.59	61.99	72.65	4.57
C2:C3		5:1	5:1	5:1	5:1	---	
48	Acético	mol L ⁻¹	52.90 ^{ab}	47.95 ^b	46.69 ^b	70.86 ^a	4.8
		%	78.7	79.7	78.1	79.3	---
	Propiónico	mol L ⁻¹	7.36	7.05	6.54	7.94	0.8
		%	11.0	11.7	11.1	9.3	---
	Butírico	mol L ⁻¹	6.96 ^{ab}	5.14 ^b	6.56 ^b	10.24 ^a	0.7
		%	10.4	8.6	10.8	11.4	---
	AGV total	mol L ⁻¹	67.22 ^{ba}	60.14 ^b	59.80 ^b	89.05 ^a	5.6
C2:C3		5:1	5:1	5:1	7:1	---	
72	Acético	mol L ⁻¹	52.45	47.73	49.73	56.17	2.6
		%	78.54	80.13	78.67	78.45	---
	Propiónico	mol L ⁻¹	7.23	6.77	6.68	7.32	0.2
		%	10.85	11.43	10.81	10.24	---
	Butírico	mol L ⁻¹	7.01 ^a	5.01 ^b	6.73 ^{ba}	8.09 ^a	0.3
		%	10.61	8.44	10.52	11.31	---
	AGV total	mol L ⁻¹	66.74	59.51	63.14	71.59	3.1
C2:C3		5:1	5:1	5:1	6:1	---	

6.5 DISCUSIÓN

A las 24 horas de incubación después de la inoculación, se presentó una desfaunación parcial, que se ve reflejada en la disminución de la concentración de protozoarios viables en los tratamientos con chicalote blanco (*Argenome ochroleuca*) y residuo de cosecha cascabillo de café (*Coffea arabica*), aunque estos valores no presentaron una diferencia significativa ($P > 0.05$) con el tratamiento testigo. A las 48 horas, si se presenta diferencias significativas ($P < 0.05$) en comparación con el tratamiento testigo en esta variable, y se determinó un mejor efecto con el

cascabillo, estas condiciones son constantes hasta las 72 horas de incubación. Aun así, el Secnidazol[®] es el desfaunante más potente con una efectividad del 100% desde las 24 h de incubación. Los metabolitos secundarios como alcaloides (Abdel *et al.*, 2010 Reyes *et al.*, 2011) y taninos (Clifford, 1991; Heičmović *et al.*, 2011) presentes en el chicalote y el cascabillo de café (respectivamente), son producidos como una línea de defensa o resistencia contra diferentes plagas (p.ej. insectos) (Patra y Saxena, 2009). Durante el proceso de degradación y digestión ruminal, estos metabolitos secundarios son liberados y actúan sobre los microorganismos, precipitando proteínas de transporte integradas a la membrana celular (Haslam, 1988). En condiciones *in vitro* los alcaloides inhiben en un 50% el crecimiento de los protozoarios (Abdel *et al.*, 2010). En la planta de chicalote, los alcaloides están presentes generalmente en forma de sales de las bases alcaloideas, las cuales son solubles en agua, mientras que, las bases libres son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos no polares, presentando afinidad por los lípidos. En la literatura no se encontraron reportes de experimentos *in vitro* o *in vivo* de desfaunación usando estos materiales vegetales; sin embargo, plantas que contienen taninos como la especie *Enterolobium cyclocarpum*, en dosis de 200g/Kg MS de dieta para borregos, causa una reducción del 75% en la población de ciliados del rumen (Ivan *et al.*, 2004).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los agentes desfaunantes no tienen una actividad bactericida importante. La concentración de bacterias totales ruminales a las 0, 24 y 48 h de incubación fue similar ($P>0.05$) entre los tratamientos desfaunantes y el testigo. Solamente se observó una disminución de bacterias a las 72 h de incubación en los tratamientos con chicalote y el cascabillo de café ($P<0.05$) con relación al tratamiento testigo. Sin embargo, el Secnidazol[®] mostró el efecto desfaunante más potente y no afectó negativamente la concentración de las bacterias ruminales. Con respecto a la planta, este efecto, puede estar asociado a la liberación del

alcaloide isoquimnolínico berberina. El cual, además de tener actividad desfaunante, también, afecta el desarrollo de bacterias Gram positivas (Reyes *et al.*, 2011). El subproducto de café, contiene taninos (Clifford, 1991; Esquivel y Jiménez, 2012), que pueden limitar el crecimiento de bacterias ruminales. Dentro de la población de microorganismos ruminales que pueden ser contabilizados, además de las bacterias se encuentran las arqueobacterias (10^7 - 10^9 microorganismos/mL) (Wright y Klieve, 2011). La población y concentración de arqueobacterias, puede ser modificada con diferentes compuestos desfaunantes (p.ej. monensina), aunque su uso *in vivo* durante largos periodos, pierde su efecto, debido al desarrollo de resistencia por parte de las bacterias metanogénicas (Hook *et al.*, 2009).

En general se determinó una baja DIVMS de la alfalfa en todos los tratamientos (5.7 a 14.9%), debido a la adición de antibióticos al medio de cultivo para protozoarios (ver sección de materiales y métodos), lo que seguramente limitó el crecimiento y actividad de las bacterias celulolíticas. La mayor ($P < 0.05$) DIVMS de alfalfa molida se presentó en el tratamiento con el cascabillo de café, seguido del tratamiento con Secnidazol[®]. De manera similar, en un estudio realizado por Donato (2006), se reporta que la degradación *in vitro* de la alfalfa usando Secnidazol[®], fue de 8.4% y no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) con el tratamiento testigo. En el tratamiento con cascabillo, el aumento de la degradación, puede estar asociado a la estimulación de la población de bacterias celulíticas. Por otra parte, el testigo y el tratamiento con chicalote, presentan una menor degradación, sin presentar diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos. Tanto los valores de pH inicial como final, no fueron diferentes entre tratamientos ($P > 0.05$) y los valores determinados se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de protozoarios y bacterias ruminales.

A las 24 horas de incubación, la mayor producción de biogas se presentó en el tratamiento con cascabillo de café, sin diferencias significativas ($P > 0.05$) con el follaje de chicalote y el tratamiento testigo. Mientras que, la proporción de metano y de dióxido de carbono fue similar ($P > 0.05$) en todos los tratamientos. Diversos reportes indican que la desfaunación produce un incremento en la población de bacterias ruminales, debido a la disminución en la competencia por nutrientes y la depredación por parte de los protozoarios ciliados (Orpin y Lectcher, 1984); en consecuencia, se favorece la fermentación y la producción de biogás (Hidayat *et al.*, 1993); sin embargo, en este estudio se determinó que la concentración de bacterias no disminuyó (numéricamente) de manera importante con la desfaunación, incluso a las 72 h de incubación, cuando se determinó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el tratamiento testigo y los tratamientos con chicalote y cascabillo de café (ver cuadro 6.3). Por tanto, se estima que el efecto de la desfaunación en las bacterias ruminales es un aumento en su eficiencia fermentativa y producción de biogás, sin que se aumente la producción de CH_4 . Este efecto es diferente a estudios en rumiantes alimentados con dietas que contienen una alta proporción de forraje, en donde se ha determinado una mayor producción de metano por unidad de alimento digerido (Beauchemin y McGinn, 2005).

La adición de algunas leguminosas forrajeras en la dieta de rumiantes, disminuye la producción de metano (CH_4), efecto asociado a la presencia de taninos condensados, contenido de fibra y una rápida tasa de pasaje ruminal (Beacheimin *et al.*, 2007). El cascabillo tiene taninos condensados (Clifford, 1991; Heičmović *et al.*, 2011); sin embargo, los resultados en las emisiones de metano, son diferentes a los reportados en otros estudios *in vivo* e *in vitro*, en donde se reporta que la presencia de estos metabolitos secundarios disminuye la producción de metano. Por ejemplo, en el experimento realizado por Lui *et al.* (2011) determinaron que los taninos de la

castaña (*Castanea sp.*) disminuyen la producción de metano ($P < 0.05$) en comparación con el tratamiento testigo (31.07 g CH₄/kg CMS), cuando adicionan 30 g de castaña/Kg de dieta (base seca) (23.58 g CH₄/kg CMS). Los resultados obtenidos son similares a los reportados con la árnica americana (*Arnica chamissonis*), esta planta contiene taninos, alcaloides y saponinas, y se reporta que tiene capacidad desfaunante, pero, no tiene efecto significativo en la producción de metano (Broudiscou *et al.*, 2000). De acuerdo a Sharp y *et al* (1998), cuando la población de protozoarios es disminuida o eliminada, las arqueobacterias asociadas a su superficie (p.ej. *Methanobacterium spp.*) desaparecen, pero son remplazadas en el rumen, por otras arqueobacterias metanogénicas de vida libre, por lo tanto, la desfaunación no disminuye la producción de metano. También Morgavi *et al* (2011), concluyen que la ausencia de protozoarios en rumen, no está relacionada con la reducción de metano en carneros con diferentes tiempos de desfaunación (D- = un par de semanas y D += dos años). Además, en dietas a base de forrajes, los hongos ruminales y las bacterias del genero *Ruminococcus*, son los principales productores de H₂ y CO₂, por lo que la desfaunación no limita los sustratos necesarios para la población de metanogénos ruminales (Chaucheyras *et al.*, 2010). Resultado contrario presento el fármaco Secnidazol[®] a las 72 h de incubación, este tratamiento presento la mayor ($P < 0.05$) producción de biogás; así mismo, redujo la producción de metano y aumento la de dióxido de carbono ($P < 0.05$) con relación a los otros tratamientos. Compuestos nitrogenados como nitroetano y el 2-nitroetanol reducen la producción de biogás ($P < 0.05$). Una dosis de 12 μ mol de nitroetano/10mL de medio de cultivo, reduce hasta el 99.3% de la producción de metano (Zhou *et al.*, 2011). Dosis de 12, 24, 36 y 48 μ mol /10mL de medio de cultivo de compuestos nitrogenados (2-nitroetanol y nitrato de sodio) causan una disminución ($P < 0.05$) de hasta el 70% de la producción *in vitro* de metano (Zhou *et al.*, 2012). En cuanto a los tratamientos con la planta de chicalote y

el subproducto cascabillo, el total de biogás producido al finalizar el experimento, fue el más alto en comparación con el fármaco y el testigo, sin modificaciones ($P>0.05$) en la producción de metano. A las 48 horas de incubación, la mayor producción de AGV totales se presentó en el tratamiento con cascabillo ($P<0.05$) en comparación a los otros tratamientos desfaunantes. Además se observó una fermentación de tipo acético-butírica en todos los tratamientos desfaunantes. Zhou *et al* (2011) reportan que el uso de compuestos nitrogenados como nitroetano y el 2-nitroetanol disminuyen ($P<0.05$) a $34.80 \mu\text{mol/mL}$ la producción total de ácidos grasos volátiles a este mismo periodo de incubación. Finalmente para la 72 h de incubación, la producción de ácido butírico del tratamiento con el fármaco disminuye, presentando diferencias significativas ($P<0.05$) con los demás tratamientos desfaunantes y el testigo, este efecto es similar al reportado por Zhou *et al* (2012) en donde los compuestos, 2-nitroetanol y nitrato de sodio, alteran la producción total de AGV disminuyendo ($P<0.05$) la producción de ácido propiónico y butírico.

6.6 CONCLUSIONES

El follaje de chicalote blanco (*Argemone ochroleuca*) y el cascabillo de café (*Coffea arabica*) disminuyen la población de protozoarios desde las 24 h de incubación un efecto que es constante hasta las 72 h de incubación. Sin embargo, a pesar de no presentar diferencias significativas ($P>0.05$) con el Secnidazol[®], no logran la eficacia desfaunante del fármaco.

Los agentes desfaunantes evaluados (chicalote blanco, cascabillo de café y Secnidazol[®]) no tienen un efecto tóxico en el crecimiento de las bacterias ruminales. Aunque, se determinó un efecto negativo en la concentración de bacterias ruminales a las 72 h de incubación en los tratamientos con chicalote blanco y cascabillo de café con relación al tratamiento testigo.

La DIVMS de la alfalfa a las 72 h de incubación fue muy baja en todos los tratamientos y se debió a la presencia de los antibióticos penicilina y estreptomina, que se agregaron para controlar el crecimiento de las bacterias ruminales en el medio de cultivo para protozoarios. Bajo estas condiciones el cascabillo de café fue el que estimulo una mayor DIVMS de la alfalfa.

Tanto el chicalote como el cascabillo de café, presentaron alta capacidad desfaunante, pero no disminuyen la producción de metano. Por el contrario, el Secnidazol[®] es un potente agente desfaunante (100% de efectividad desde las 24 h de dosificación) y disminuye la producción de metano.

Se recomienda continuar con la evaluación de otras plantas y residuos agrícolas con capacidad desfaunante, similar o superior a la mostrada por el Secnidazol[®].

6.7 LITERATURA CITADA

- Abdel, S. E., L. Maes, and S. M. Mahmoud. 2010. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and chagas disease. *Phytotherapy Research* 24: 1322-1328.
- Animut, G., R. Puchala, A. L. Goetsch, A. K. Patra, T. Sahlu, V. H. Varel, and J. Wells. 2008. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology* 144: 228-241.
- Argyle, J.L., and R. B. Hespell. 1987. Digestion of alfalfa hay using washed ruminal bacteria. *Journal of Dairy Science*.70: 2525-2533.
- Beauchemin, K. A. and S. M. McGinn, 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal Animal Science*. 83: 653-661.

- Beauchemin, K.A., S. M. McGinn, T. F. Martinez, and T. A. McAllister, 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions. *Journal Animal Science*. 85: 1990-1996.
- Broudiscou, L.P., Y. Papon, and A. F. Broudiscou. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*. 87: 263-277
- Camacho, L.M., R. Rojo, A. Z. M. Salem, G. D. Mendoza, D. López, J. L. Tinoco, B. Albarrán, O. D. Montañez. 2010. In vitro ruminal fermentation kinetics and energy utilization of three Mexican tree fodder species during the rainy and dry period. *Animal Feed Science and Technology*. 160 : 110-120.
- Chaucheyras, F.D., S. Masségli, , G. Fontv, E. Forano. 2010. Influence of the Composition of the Cellulolytic Flora on the Development of Hydrogenotrophic Microorganisms, Hydrogen Utilization, and Methane Production in the Rumen of Gnotobiotically Reared Lambs. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (24): 7931-7937.
- Chemler, J. A., E. Leonard, A. G. Koffas, C. Winefield, K. Davies, and K. Gould. 2009. Flavonoid biotransformations in microorganisms. Anthocyanins. Ed. Springer New York. *Biomedical and Life Sciences* pp.191- 255.
- Chenost, M., J. Aufrère, and D. Macheboeuf. 2001. The gas-test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Animal Research*. 50: 349-364.
- Clifford, M. N. 1991. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry* 40: 191-200.

- Comité Intersecretarial sobre Cambio Climático. 2009. México: cuarta comunicación nacional ante la convención de las naciones unidas sobre el cambio climático. ISBN 978-607-7908-00-5. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Delgado, D. C., J. Galindo, R. González, N. González, I. Scull, L. Dihigo, J. Cairo, A. Aldama, and O. Moreira. 2012. Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health Production* 44: 1097-1104.
- Donato, J.A. 2006. Evaluación de la capacidad desfaunante de la planta de Yuca (*Yucca schidigera*) y fármaco Secnidazol®. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. pp 1-77.
- Esquivel, P., and V.M. Jiménez. 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46: 488–495.
- Guo, Y.Q., J. X. Liu, Y. Lu, W. Y. Zhu, S. E. Denman, and C. S. McSweeney. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 421-426.
- Hans-Dieter, G. 2006. Symbiotic Associations Between Ciliates and Prokaryotes. *Prokaryotes*. 1:364-402.
- Haslam E. 1988. Plant polyphenols (*syn.* vegetable tannins) and chemical defense: A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1789-1805.

- Heičmović, I., A. Belščak, D. Horžić, and D. Komes. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry* 129: 991-1000
- Hidayat, K., C. J. Newbold, and C. S. Stewart. 1993. The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation in vitro, as determined by microbial gas production. *Animal Feed Science and Technology*. 42 :193-208
- Hook, S.E., K. S. Northwood, D. G. Wright, and B. W. McBride. 2009. Long-Term Monensin Supplementation Does Not Significantly Affect the Quantity or Diversity of Methanogens in the Rumen of the Lactating Dairy Cow. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (2) :374–380.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Review*. 14:1-49.
- Huntington, J.A., C. Rymer, D. I. Givens. 1998. The effect of host diet on the gas production profile of hay and high-temperature dried grass. *Animal Science*. 67:59-64.
- Ivan, M., K. M. Koenig, B. Teferedegne, C. J. Newbold, T. Entz, L. M. Rodea, and M. Ibrahim. 2004. Effects of the dietary *Enterolobium cyclocarpum* foliage on the population dynamics of rumen ciliate protozoa in sheep. *Small Ruminant Research*. 52: 81-91.
- Jiménez, F.S., A.Z.M. Salem, P. Mejia, M. González, B. Albarrán, R. Rojo, J.L. Tinoco. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on in vitro gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livestock Science*. 136:192-200.

- Karlssona, L., M. Hetta, P. Udén, and K. Martinsson. 2009. New methodology for estimating rumen protein degradation using the *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*. 153: 193-202.
- Knight T., R. S. Ronimus, D. Dey, C. Tootill, G. Naylor, P. Evans, G. Molano, A. Smith, M. Tavendale, C. S. Pinares-Patiño, and H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167: 101-112.
- Ley de Coss, A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos y plantas. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México pp 1-74
- Ley de Coss, A., M. A. Cobos, D. Hernández, y E. Guerra. 2011. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y evaluación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ XXI* 1: 43 - 49.
- Liu, H., V. Vaddella, and D. Zhou. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of Dairy Science* 94: 6069-6077.
- Morgavi, D.P., C. Martin, J. P. Jouany, and M. J. Ranilla. 2011. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause–effect relationship. *British Journal of Nutrition*. 107(3): 388-97.

- Ogimoto, K., and S. Imai. 1981. Rumen Protozoa. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press. Japan pp: 230.
- Orpin, C.G., and A. J. Letcher, 1984. Effect of absence of ciliate protozoa on rumen fluid volume flow rate and bacterial population in sheep. *Animal Feed Science Technology.*, 10:145-151.
- Ozutsumi, Y., K. Tajima, A. Takenaka, H. Itabashi. 2006. Real-Time PCR Detection of the Effects of Protozoa on Rumen Bacteria in Cattle. *Current Microbiology.* 52: 158-162.
- Patra, A. K. and J. Saxena. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363-375.
- Reyes, F.D., C. J. Peña, M. Canales, M. Jiménez, S. Meráz, and T. Hernández. 2011. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10: 139 - 146.
- Scheehle, E.A. and D. Kruger. 2006. Global anthropogenic methane and nitrous oxide emissions. *Energy Journal.* 3:33-44.
- Tóthová, T., M. Píknová, S. Kišidayová, P. Javorský, and P. Pristaš. 2008. Distinctive Archaeobacterial Species Associated with Anaerobic Rumen Protozoan *Entodinium caudatum*. *Folia Microbiology.* 53 (3): 259-262.
- Ulloa, J. B., J. A. J. Verreth, J. H. van Weerd, and E. A. Huisman. 2002. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99: 195-204.

- Unger, N., T.C. Bond, J.S. Wang, , D. M. Koch, S. Menon, D. T. Shindell, and S. Bauer. 2010. Attribution of climate forcing to economic sectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 3382–3387.
- Vogels, G.D. and C. Stumm, 1980. Interaction between methanogenic bacteria and hydrogenic ciliates in the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek.* 46:108-111.
- Wright, A.G. and A. V. Klieve, 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology.* 166-167: 248-253.
- Zhou, Z., Q. Meng, and Z. Yu. 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic Bacteria in *in vitro* ruminal cultures. *Applied and Environmental Microbiology.* 7 (8): 2634-2639.
- Zhou, Z., Z. Yu, , Q. Meng. 2012. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. *Bioresource Technology.* 103: 173-179.