

LA CAPACIDAD DESFAUNANTE DEL EXTRACTO DE PLANTAS EN EL RUMEN

Assessment *in vitro* of the Defaunant Capacity of the Plant Extract in the Rumen

Alejandro Ley de Coss ^{1*}, Jaime Jorge Martínez Tinajero ¹, Francisco Javier Marroquín Agreda ¹,
Carlos Gumaro García Castillo ¹, Oziel Dante Montañez Valdez ² y Enrique Guerra Medina ³

¹Cuerpo Académico Ganadería Tropical Sustentable, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas, Entronque Carretera Costera S/N, Huehuetán, Chiapas, México. CP. 36670. Fax: 01 (964) 62 70439. E-mail: aleycoss@gmail.com.

²Departamento de Desarrollo Regional, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Zapotlán el Grande, Jalisco, México. ³Departamento de Producción Agrícola, Universidad de Guadalajara, Autlán, Jalisco, México.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de eliminar protozoarios del rumen con el uso del extracto soluble en agua de las plantas *Buddleia cordata*, *Chenopodium ambrosioides*, *Datura innoxia*, *Marrubium vulgare*, *Mentha piperita* y *Verbesina perymenioides*, las cuales contienen compuestos secundarios con posible efecto tóxico sobre los protozoarios ciliados del rumen. La capacidad desfaunante (CD) del extracto soluble en agua de las plantas se realizó inoculando 0,5 mL de un concentrado de protozoarios en 9,5 mL de medio de cultivo anaerobio (MCA) enriquecido con el extracto soluble de *Avena sativa* (tratamiento testigo) más 150 µL del extracto de cada planta, en un diseño completamente al azar. El conteo de protozoarios fue realizado mediante una cámara Neubaüer al finalizar los tiempos de incubación 0; 24; 48 y 72 h. La CD se clasificó como alta (CDA), mediana (CDM) y nula (CDN). El MCA permitió la ejecución de la prueba al mantener concentraciones de 10⁴ protozoarios mL⁻¹ de medio de cultivo durante 72 h con una viabilidad superior al 80%. Los extractos de *C. ambrosioides*, *M. vulgare*, *M. piperita* redujeron (P<0,05) la concentración de protozoarios a menos de 10² mL⁻¹ de medio entre 24 y 72 h de incubación clasificándola como CDA. Mientras que los extractos de *V. perymenioides* y *B. cordata* presentaron CDM y solamente CDA hasta las 72 h. *D. innoxia* tuvo CDN durante las 72 h de incubación similar (P>0,05) al control. Las concentraciones de bacterias totales y celulolíticas fueron afectadas por los extractos de las plantas que presentaron CDA, aunque es necesario, en evaluaciones futuras, identificar el tipo y la concentración de las sustancias con efecto desfaunante en *C. ambrosioides*, *M. vulgare*, *M. piperita*, además del grado de toxicidad que pueden provocar, estas sustancias, a los rumiantes.

Palabras clave: Rumen, desfaunación, protozoarios, plantas tóxicas.

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate defaunant effect of the water soluble extracts of the plants *Buddleia cordata*, *Chenopodium ambrosioides*, *Datura innoxia*, *Marrubium vulgare*, *Mentha piperita* and *Verbesina perymenioides*, which contain secondary compounds with possible toxic effect on rumen ciliate protozoa. The defaunant property was estimated inoculating 0.5 mL of a concentrate of protozoa in 9.5 mL of an anaerobic culture medium (ACM) enriched with the soluble extract of *Avena sativa* (control treatment), which was added 150 µL of water-soluble extract of the evaluated plants, in a design completely at random. The quantification of ciliate protozoa was done by means of the direct count to 40X in a Neubaüer chamber, at 0, 24, 48 and 72 h. Defaunant capacity (DC) was classified as high (DCA), medium (DCM) and null (DCN). The ACM supported even the 72 h of incubation a concentration of protozoa of 10⁴ mL⁻¹ culture media, with 80% of viability. The extracts of *C. ambrosioides*, *M. vulgare* and *M. piperita* reduced (P<0.05) the quantity of protozoa to less than 10² cell mL⁻¹ of culture medium between 24 and 72 h of incubation, it was DCA; whereas, the extract of the plants *V. perymenioides* and *B. cordata*, they showed a DCM and only up DCA to 72 h of incubation (P<0.05). *D. Innoxia* showed DCN at 72 h of incubation was similar to control. The concentration of total and cellulolytic bacteria was unaffected by the extract that had CDA plants, more research is needed to identify the type and concentration of defaunant substances in *C. ambrosioides*, *M. vulgare* and *M. piperita*, besides the degree of toxicity that can cause these substances to ruminants.

Key words: Rumen, protozoa, defaunant, toxic plants.

INTRODUCCIÓN

Los estudios de desfaunación buscan evaluar el desempeño productivo de los animales por la ausencia de protozoarios en el rumen, además de aclarar la controversia que existe

sobre la importancia de éstos en la degradación del alimento y en la productividad del animal [4, 41], reducción por efecto de la desfaunación, en la digestibilidad ruminal de la materia orgánica (MO), de la materia seca (MS) [38, 39], y en los nutrientes como celulosa, fibra detergente ácido (FDA), fibra detergente neutro (FDN) y hemicelulosa [2, 4, 16, 41], aunque hay resultados que indican aumentos en la digestibilidad del almidón en animales desfaunados [19, 21, 26].

Se ha reportado la capacidad desfaunante (CD) de algunas plantas utilizadas en la alimentación de rumiantes, a las cuales se les ha encontrado compuestos como taninos, saponinas, alcaloides, entre otros [23-25]. La desfaunación o CD del extracto de ciertas plantas han mostrado efectos variables, debido a que en algunas se ha reportado un efecto positivo al eliminar o reducir la población de protozoarios del rumen [30, 37], mientras que en otras, los mismos extractos no la afectaron; en otros en cambio, aumentaron la concentración ruminal de protozoarios [1, 14, 25, 40]. En estudios *in vitro*, el uso de un medio de cultivo enriquecido con el extracto de *Avena sativa* (MCA) ha permitido mantener protozoarios viables por 72 h de incubación y evaluar la CD del extracto de plantas que contienen compuestos químicos secundarios con efectos negativos contra bacterias y protozoarios, como las amibas [3, 32]. Se ha encontrado en *Buddleia cordata* y *Verbesina perymenioide*, concentraciones de 0,648 y 0,475 g de taninos condensados por cada 100 g y cantidades moderadas de alcaloides, además de glucósidos cianogénicos en *B. cordata*, planta que ha sido usada en la alimentación de *Ovis aries* (borrego criollo) en la región de los altos de Chiapas, aunque sin evaluar los efectos, de esta planta sobre las poblaciones microbianas del rumen, principalmente sobre los protozoarios [27].

Se han realizado evaluaciones que ponen en duda la CD de dichos agentes desfaunantes reportados [12, 29], mientras que por otro lado, alcaloides, aminoácidos no proteínicos, micotoxinas, terpenoides, esteroides, lecitinas, inhibidores de proteasas y fenoles son producidos naturalmente por las plantas como un mecanismo de defensa contra plantas, animales, insectos depredadores e infecciones microbianas [6, 30]. Aunque no todos estos compuestos secundarios tienen efectos tóxicos contra protozoarios, por ejemplo, análogos de la tirosina (mimosina) y productos de su degradación (3,4 dihidroxipiridina) que se encuentran en *Leucaena leucocephala*, *Mimosa pudica* y *Pittosporum undulatum*, y la 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) presente en *Vicia faba*, *Mucuna* spp y *Stizolobium deeringiamin* se han identificado que tienen un efecto tóxico para el animal, pero no, para los protozoarios, sin embargo; los efectos de estos compuestos producen cambios en el metabolismo ruminal con aumentos en la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y reducción de amoníaco en la mayoría de los casos, pero sin ningún efecto sobre la concentración de protozoarios existiendo en algunos casos incremento en la población de los mismos [11, 28]. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de eliminar protozoarios del rumen del extracto soluble en

agua de las plantas que contienen compuestos secundarios con posible efecto tóxico sobre estos microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación: El presente trabajo se realizó en el módulo bovino (*Bos taurus*) de la raza criollo lechero y en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas, México, situado a 14° 54' 29" LN y 92° 15' 38" LO.

Medios de cultivo y tratamiento. El MCA (TABLA I) fue el tratamiento 1 (testigo), los tratamientos 2; 3; 4; 5; 6 y 7 lo conformaron el MCA más el extracto soluble de las plantas *B. cordata*, *Chenopodium ambrosioides*, *Datura inoxia*, *Marrubium vulgare*, *Mentha piperita* y *V. perymenioides*, respectivamente. Los medios fueron preparados usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate [18], en tubos de cultivo de 18 x150 mm, a los cuales se adicionaron por triplicado 9,5 mL de MCA, 150 µL del extracto de cada planta, 20000 UI de penicilina y 25 mg de estreptomina para mantener una población de 10⁸ bacterias mL⁻¹ de medio [13, 23]. Mediante esta prueba se pretendió demostrar la CD de la fracción soluble en agua de cada planta (*B. cordata*, *C. ambrosioides*, *D. inoxia*, *M. vulgare*, *M. piperita*, *V. perymenioides*), las cuales fueron deshidratadas por secado natural, principalmente para reducir la pérdi-

TABLA I
COMPOSICIÓN DEL MEDIO CULTIVO ANAEROBIO (MCA)

Compuesto	Cantidad para 100 mL de medio de cultivo
Agua destilada, mL	47.42
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30,0
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5,0
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5,0
Carbonato de sodio, solución 8% ⁽⁴⁾ , mL	5,0
Acetato de sodio, 1.5 % ⁽⁵⁾ , mL	5,0
Solución sulfido-cisteína ⁽⁶⁾ , mL	2,0
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾ , mL	0,1
Tripticasa-peptona, g	0,20
Extracto de levadura, g	0,10
Glucosa, g	0,06
Celobiosa, g	0,06
Almidón, g	0,06

(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.

das de compuesto secundarios termolábiles, posteriormente fueron sometidas a un secado en estufa de secado (VWR International 1390FM, Sheldon Manufacturing, Inc. EUA) a 40°C, hasta obtener una humedad constante de entre 10 y 15%, las muestras deshidratadas se molieron en un molino Willey (Molino eléctrico ED-5, Tomas-Willey Mill, EUA) criba de 1 mm y se almacenaron en recipientes de vidrio color ámbar.

Obtención del extracto soluble. Para la obtención del extracto soluble de los sustratos evaluados se pesaron 2,0 g en base seca (BS) de cada planta en una balanza analítica (Ohaus, modelo Explorer, EUA) y se colocaron en tubos de cultivo de 18 x 150 mm, se adicionó 20 mL de agua destilada y se agitaron en un vortex (Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA.) durante 3 min y se dejaron reposar por 30 min, del sobrenadante se tomó 150 µL para adicionarlo a los medios de cultivo según la técnica reportada por Ley de Coss y col. [23].

Obtención del concentrado de protozoarios. Se obtuvieron 250 mL de líquido ruminal fresco (LRF) de borregos alimentados con una dieta a base de concentrado (20%) y de paja de avena (80%), mediante una sonda esofágica de fabricación casera. El LRF se depositó, bajo flujo de bióxido de carbono (CO₂, 95% de pureza, INFRA®) para mantener las condiciones de anaerobiosis, en un embudo de separación de 500 mL durante 15 min, posteriormente se recuperó la cantidad de 10 mL del sedimento (anillo blanquecino de protozoarios) en un tubo de cultivo (18 x 150 mm) que contenía 9,0 mL de MCA (TABLA I), esta mezcla permite mantener una concentración de protozoarios de entre 10⁴ a 10⁵ de células viables por mL de medio de cultivo [23]. La mezcla representó el inóculo de protozoarios, el cual se mantuvo bajo flujo (CO₂, 95% de pureza, INFRA®) y en baño maría (Felisa FE-373, Fabricantes Feligneo, México) a 39°C, con el fin de reducir las muertes de protozoarios por la presencia de oxígeno y por cambios de temperatura [8, 23].

Técnica de inoculación y conteo de protozoarios. Los tratamientos, previos a inocular se mantuvieron en baño maría (39°C). Cada tratamiento por triplicado se inoculó con 0,5 mL del concentrado de protozoarios bajo condiciones libres de oxígeno al bombear bióxido de carbono (CO₂, 95% de pureza, INFRA®), para mantener un ambiente de anaerobiosis. Posteriormente, para el conteo de protozoarios se homogenizó el medio y se retiró, bajo flujo de CO₂, un mL de medio de cultivo inoculado a las 0; 24; 48 y 72 h. Para determinar la concentración de protozoarios se utilizó una cámara Neubaüer y un microscopio de contrastes (Biológico Serie BX51, Olympus, EUA) a 40x, el número de protozoarios por mililitro de medio de cultivo se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula: Protozoarios mL⁻¹ = (Promedio de las cámaras) (10⁴). Al momento de hacer el conteo se consideraron, aparte de la motilidad de las células según la técnica aplicada por Ogimoto e Imai [31] a los protozoarios vivos los que se tiñeron cuando se adicionó el colorante Tripán blue®, mientras que los protozoarios muertos mantuvieron un color transparente o se encontraban en un estado de desintegración (lisado), con la finalidad de determinar el porcentaje de viabilidad en los medios de cultivo evaluados

[23]. El conteo se realizó por triplicado para cada tratamiento, en una cuarta repetición por cada tratamiento se retiró la cantidad de 2 mL para determinar el pH con un potenciómetro (Orion A250, Orion Research, Inc. EUA) al terminar cada tiempo de incubación (0; 14; 48 y 72 h) [5, 23].

Efecto sobre concentración de bacterias totales y celulolíticas. Para medir el efecto sobre la concentración de bacterias totales y celulolíticas de los compuestos secundarios presentes en las plantas, que presentaron capacidad para eliminar a los protozoarios del rumen, en tubos de cultivo (18 x 150 mm) por triplicado con 9 mL de MCA sin antibióticos se les adicionó 150 µL del extracto soluble de las plantas e inoculó con un concentrado de protozoarios, tal y como fue descrito anteriormente, los medios fueron incubados a 39°C durante los tiempos 24; 48 y 72 h. Al finalizar cada tiempo de incubación, 0,5 mL de medio de cultivo fue retirado e inoculado por diluciones decimales hasta 10⁻¹² para bacterias totales en un medio de cultivo anaerobio a base de glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR, TABLA II) y hasta 10⁻¹⁰ para bacterias celulolíticas el mismo medio anterior, sólo que se

TABLA II
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO GCA
PARA CRECIMIENTO DE BACTERIAS TOTALES
Y CELULOLÍTICAS

Compuesto	Cantidad para 100 mL de medio de cultivo	
	Medio para BT	Medio para BC
Agua destilada, mL	52,42	57,60
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30,0	30,0
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5,0	5,0
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5,0	5,0
Carbonato de sodio, solución 8% ⁽⁴⁾ , mL	5,0	5,0
Solución sulfido-cisteína ⁽⁶⁾ , mL	2,0	2,0
Solución resazurina al 0.1% ⁽⁷⁾ , mL	0,1	0,1
Tripticasa-peptona, g	0,20	0,20
Extracto de levadura, g	0,10	0,10
Glucosa, g	0,06	
Celobiosa, g	0,06	
Almidón, g	0,06	
Papel celulosa		tira de 0.5 x 4.5 cm

BT, bacterias totales; BC, bacterias celulolíticas; (1), líquido ruminal clarificado previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 10.000 rpm, por 15 min a 4°C, esterilizado 20 min a 15 psi, 121°C; (2), conteniendo (por 1000 mL) 6 g K₂HPO₄; (3), conteniendo (por 1000 mL) 6 g KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO₄ y 1,6 g CaCl₂ H₂O; (4), 8 g carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5), 1,5 g acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6), 2,5 g L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2,5 g 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.

sustituyó la fuente de carbohidratos (GCA) por una tira de papel Whatman (Celulosa) [5]. Los tratamientos fueron preparados en condiciones de esterilidad e inoculados usando técnicas de anaerobiosis (flujo de CO₂) e incubados a 39°C; la técnica del número más probable se utilizó para determinar la concentración de bacterias, para la concentración de bacterias totales se determinó a las 48 h de incubación, dando como crecimiento positivo aquellos tubos de cultivo que mostraron turbidez, mientras que las bacterias celulolíticas se determinaron a los 10 días siendo positivo aquellos tubos donde se desintegró el papel whatman [9, 15].

Diseño experimental y análisis estadístico. Para este trabajo de investigación se aplicó un diseño completamente al azar. La evaluación de la capacidad desfaunante *in vitro* y el efecto sobre la concentración de bacterias totales y celulolíticas de las plantas se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, usando el análisis de varianza (procedimiento GLM) con datos de rangos independientes (Wilcoxon) del procedimiento SAS [35]. Todas las medias fueron comparadas por medio de la prueba de Tukey [36].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medios de cultivo anaerobios. El MCA mantuvo una concentración de $1,22 \times 10^4$ protozoarios por mL con una viabilidad del 88% hasta las 72 h de incubación, lo que permitió realizar las pruebas para evaluar la CD del extracto soluble de cada planta. Los resultados indican que existen diferencias ($P < 0,05$) en las concentraciones de protozoarios por mL de medio de cultivo, entre plantas y por tiempo de incubación (TABLA III). El extracto de *D. inoxia* tuvo una capacidad desfaunante nula (CDN) con una concentración hasta las 72 h de incubación de $1,61 \times 10^4$ protozoarios por mL de medio, valor similar al MCA ($P \geq 0,05$), sin embargo, el extracto de *B. cordata* tuvo una capacidad desfaunante media (CDM) al finalizar el tratamiento (72 h), mientras que *V. perymenioides* tuvo una CDM desde las 48 h de incubación. Por otro lado *C. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. piperita* tuvieron una CDM desde las 24 h de incubación, pero a las 48 h, las mismas plantas ya presentaban una capacidad desfaunante alta (CDA, $P < 0,05$) superior al resto de los tratamientos. Como se puede observar (TABLA III), estas plantas fueron las únicas que presentaron la mayor CDA ($P < 0,05$) en comparación al testigo (MCA), así como a los tratamientos con el extracto de *D. inoxia*, mientras que *B. cordata* y *V. perymenioides* al finalizar el periodo de incubación tuvieron CDM. Al respecto, se reportó que el extracto soluble de *V. perymenioides*, *Montanoa leucanta* y *B. cordata* tiene un efecto sobre la concentración de protozoarios del rumen a las 24 h de incubación indicando que dicho efecto fue debido a la presencia de compuestos (taninos, saponinas, entre otros drogas) presentes en las plantas evaluadas [12].

Respecto a la viabilidad de los protozoarios en los diferentes tiempos de incubación, en la TABLA IV se muestra la concentración de protozoarios en las diferentes horas de incubación,

TABLA III
EFFECTO DEL EXTRACTO SOLUBLE DE LAS PLANTAS
SOBRE LA CONCENTRACIÓN TOTAL
DE PROTOZOARIOS (10^4 mL^{-1})

Tratamiento	Hora de incubación			
	0	24	48	72
Testigo (MCA)	1,72a	1,70a	1,10a	1,22a
<i>B. cordata</i>	2,00a	1,92a	1,23a	0,31b
<i>C. ambrosioides</i>	1,72a	0,55b	0,06c	0c
<i>D. inoxia</i>	1,46a	1,23a	1,12a	1,61a
<i>M. vulgare</i>	1,66 ^a	0,37b	0,04c	0,04c
<i>M. piperita</i>	1,54a	0,47b	0,04c	0c
<i>V. perymenioides</i>	2,51a	1,50a	0,96ab	0,38b

a, b, c, d, e. Distinta letra en la misma columna son diferentes ($P < 0,05$).

por el efecto del extracto solubles de las plantas evaluadas. Desde las 24 h de incubación *C. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. leucanta* presentaron CDM donde la concentración de protozoarios fue menor ($P < 0,05$) con respecto al MCA. En los tratamientos con *B. cordata*, *D. inoxia* y *V. perymenioides* hubo CDN a las 48 h, mientras que sólo los extractos de *C. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. piperita* tuvieron una CDA ($P < 0,05$) diferentes al tratamiento testigo (MCA) y el tratamiento que contenía el extracto de *D. inoxia*. El tratamiento con *V. perymenioides* a las 72 h de incubación tuvo CDM manteniendo una concentración de protozoarios de $2,3 \times 10^3$ por mL de medio de cultivo. Los valores de pH en los diferentes tratamientos (TABLA IV) y periodos de incubación se mantuvieron entre 6,6 y 7,0 lo cual es aceptable para las condiciones del rumen, los valores normales de pH en el rumen de animales alimentados con dietas a base de forrajes oscilan entre 6,5 a 7,0 [8, 17]. Lo anterior establece que, el efecto desfaunante en la concentración y viabilidad de protozoarios en los tratamientos que presentaron la CD, no está relacionado con cambios en el pH en los medios de cultivo.

Se ha reportado la presencia de compuestos químicos secundarios con posible capacidad para eliminar protozoarios en algunas plantas evaluadas; por ejemplo en *C. ambrosioides*, que presentó en esta investigación una CDA a las 24 h de incubación, se han reportado compuestos antihelmínticos, antitripanosoma y amebicida identificados como monoterpenos (ascaridole), además de aceites esenciales; por otro lado, en *M. piperita* se han identificado más de 100 compuestos químicos con efecto bactericida, fungicida, antiviral y vermífugo, además de algunos aceites como mentol, mentona, metil-ésteres y monoterpenos (puleguna, piperitona, mentofurano y jasmona) [34]. Diferentes compuestos químicos se han reportado en las plantas *B. cordata* y *V. perymenioides*, que tuvieron CD hasta las 48 h de incubación y en *D. inoxia*, la cual tubo CDN hasta las 72 h de incubación ($P < 0,05$) similar al MCA; en estas últimas tres plantas se han reportado diversos compuestos químicos: por ejemplo, en *B. cordata* compuestos con capacidad analgésica, diurética y antiséptica [33, 34], compuestos con capacidad bactericida y amebicida [32], mientras que en *D. anoxia* se han identificado compuestos quími-

TABLA IV
CONCENTRACIÓN DE PROTOZOARIOS VIABLES Y pH
DE LOS MEDIOS DE CULTIVO ADICIONADOS CON LA
FRACCIÓN SOLUBLE DE LAS PLANTAS (10^4 mL^{-1})

Tratamiento	Tiempo de incubación, horas.			
	0	24	48	72
	<i>Concentración</i>			
Testigo (MCT)	1,60a	1,52a	1,11a	1,06a
<i>B. cordata</i>	1,90a	1,50a	1,00a	0,22b
<i>C. ambrosioides</i>	1,62a	0,48b	0,03b	0c
<i>D. inoxia</i>	1,34a	1,33a	1,29a	1,14a
<i>M. vulgare</i>	1,66a	0,33b	0,01b	0,02c
<i>M. piperita</i>	1,44a	0,44b	0,04b	0c
<i>V. perymenioides</i>	2,24a	1,30a	0,78ab	0,23b
	<i>pH</i>			
Testigo (MCT)	6,9	6,7	6,7	6,7
<i>B. cordata</i>	7,1	6,9	6,9	6,8
<i>C. ambrosioides</i>	6,8	6,7	6,5	6,6
<i>D. inoxia</i>	6,9	6,6	6,6	6,6
<i>M. vulgare</i>	6,9	6,7	6,5	6,6
<i>M. piperita</i>	6,9	6,8	6,7	6,7
<i>V. perymenioides</i>	7,0	6,6	6,7	6,7

a, b, c y d: distinta letra en la misma columna son diferentes ($P < 0,05$).

cos secundarios con efectos alucinógenos, además de sustancias con efecto desparasitante, principalmente contra amibas [3], compuestos como atropina, daturina, hiosciamina, hioscina, escopolamina [20], alta concentración de alcaloides (ácido cafeínico, clorogénico, para-cumárico y ferúlico), además de esteroides (campesterol, datura lactona y estigmasterolilla) y triterpenos en cantidades de 0,5 a 1,1% [4]. A pesar de toda esta amplia variedad de compuestos identificados, esta última planta no presentó CD en ningún periodo de incubación, por lo tanto es necesario identificar los compuestos químicos secundarios presentes en las plantas que tienen la capacidad de eliminar protozoarios del rumen. Por otro lado, en *M. vulgare* se han identificado compuestos como lactona diterpenica, saponinas, taninos, mucilagos, ácidos-fenoles (ácido caféico y clorogénico), además de colina, compuestos también encontrados en *D. anoxia*, pero sin embargo, sólo la primera planta tuvo CDA a las 48 de incubación ($P < 0,05$). Lo anterior, pone en duda que la CD se deba a la presencia de compuestos químicos tóxicos para los protozoarios [23], pero abre un línea de investigación que buscará indagar cuales son los compuestos en específico que tienen ese efecto antiprotozoario; lo anterior no coincide con la información científica donde se evaluó un extracto de saponina de la *Medicago sativa* y se reportó que hubo una reducción lineal en la concentración de ciliados de rumen 16,5 hasta $1,9 \times 10^4$ protozoarios por mL de fluido ruminal a medida que se aumentó la proporción del extracto de 0 a 4% [22]. En otros estudios se ha reportado la CD de plantas

como *Sesbania sesban* [30], *V. perymenioides*, *M. leucanta*, *B. cordata* y *B. vaccinioides* [12], al adicionar el extracto soluble de cada planta. Se ha evaluado la CD de algunas leguminosas y arbustivas forrajeras como: *S. sesban*, *Acacia angustissima*, *A. saligna*, *Chamaecysticus palmensis*, *Leucaena pallida* [30, 35] y *Sapindus saponaria* [10] en una dieta base (como principal fuente de proteína), y donde se ha reportado que no hay CD o una eliminación total de protozoarios del rumen, sólo reducciones en su concentración, similar a lo presentado en algunas plantas evaluadas en esta investigación, pero que no significa efecto desfaunante.

Efecto sobre concentración de bacterias totales y celulolíticas

En la TABLA V, la concentración de bacterias totales y celulolíticas, a partir de las 24 h de incubación fue menor ($P < 0,05$) en los tratamientos con los extractos de *C. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. piperita*, donde se observó un efecto negativo sobre la concentración con respecto al tratamiento testigo (MCA), mientras que entre las plantas (tratamientos con CDA) no hubo diferencia ($P > 0,05$) en la concentración de bacterias del rumen, por lo tanto, esto indica que, sustancias presentes en las plantas *C. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. piperita* tienen un posible efecto bactericida, aunque no hay reportes científicos que validen dichos resultados, con excepción de una evaluación de Ley de Coss [23], donde se reporta el mismo efecto de las mismas plantas.

TABLA V
EFFECTO DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LAS PLANTAS
CON CDA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS
TOTALES Y CELULOLÍTICAS

Tratamiento	Tratamiento		
	24	48	72
	<i>Bacterias totales (10^8 mL^{-1})</i>		
Testigo (MCT)	1,46a	1,51a	1,46a
<i>C. ambrosioides</i>	0,27b	0,03b	0,23b
<i>M. vulgare</i>	0,14b	0,31b	0,22b
<i>M. piperita</i>	0,8b	0,44b	0,22b
	<i>Bacterias celulolíticas (10^6 mL^{-1})</i>		
Testigo (MCT)	1,44a	1,21a	1,44a
<i>C. ambrosioides</i>	0,14b	0,33b	0,43b
<i>M. vulgare</i>	0,13b	0,32b	0,41b
<i>M. piperita</i>	0,13b	0,32b	0,34b

a, b: Distinta letra en la columna son diferentes ($P < 0,05$).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales permite concluir que las plantas evaluadas tienen diferente capacidad desfaunante, y que ésta no está directamente relacio-

nada con la concentración de compuestos químicos secundarios presentes en ellas. Sólo la fracción soluble de *C. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. piperita* tuvieron un efecto desfaunante (CDA), además redujeron la concentración de bacterias totales y celulolíticas del rumen lo que indica un posible efecto bacteriostático de los compuestos presentes en estas plantas. Mientras que *D. anoxia*, no tuvo CD a pesar de ser una planta con alto contenido de compuestos químicos secundarios.

Se recomienda seguir evaluando e identificando los compuestos químicos posiblemente tóxicos que están presentes en las plantas que tienen, aparte del efecto desfaunante, la capacidad de reducir la concentración de bacterias totales y celulolíticas presentes en el rumen.

AGRADECIMIENTO

Este experimento fue patrocinado por la Secretaría de Educación Pública mediante el Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) con el proyecto PROMEP/103.5/10/4666 con registro 06/AGV/PMP/070/11 intitulado "Plantas nativas con potencial uso forrajero que mitigan la producción de metano en el rumen".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BENNEKER, C.H.; VARGAS, J.E. Estudio del consumo voluntario de cinco procedencias de matarratón (*Glicidia sepium*) realizado con ovejas africanas alimentadas con tres dietas diferentes. 1994. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia. **Livestock Research for Rural.** 6(1). En Línea: <http://www.cipav.org.co/lrrd>. Septiembre 15, 2007.
- [2] BIRD, S. H.; ROMULO, B.; LENG, R. A. Effects of lucerne supplementation and defaunation on feed intake, digestibility, N retention and productivity of sheep fed straw based diets. **Anim. Feed Sci. Technol.** 45: 119-129. 1994.
- [3] BONDE, K. The genus *Datura*: From research subject to powerful hallucinogen. 2001. On Line: http://www.leda.lycaeam.org/Documents/The_Genus_Datura_From_Research_Subject_to_Power. April 10, 2010.
- [4] CHAUDHARY, L.; SRIVASTAVA, A. Performance of growing Murrah buffalo calves as affected by treatment with manoxol and the presence of ciliate protozoa in the rumen. **Anim. Feed Sci. Technol.** 51: 281-286. 1995.
- [5] COBOS, M. A.; YOKOYAMA, M. T. *Clostridium paraputrificum* variedad *Ruminantium*: colonisation *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Wallace, R. J.; Lahlou-Kassi, A (Eds). **Rumen Ecology Research Planning. Proceedings of a Workshop Held at LLRF.** Addis Ababa, 13-18 March. Ethiopia. Pp 151-161. 1995.
- [6] D'MELLO, J. P. F. Chemical constraints to use of tropical legumes in animal nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.** 38:237-261. 1992.
- [7] DEHORITY, B. A. Metabolism, nutrition and growth of rumen protozoa. **Rumen Microbiology.** Ed. Nottingham University Press. London. Pp 101-127. 2003a.
- [8] DEHORITY, B. A. Distribution, specificity and role of the rumen protozoa. **Rumen Microbiology.** Ed. Nottingham University Press. London. Pp 129-1155. 2003.
- [9] DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A.; GRIFO, A. P. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 2789-2792. 1989.
- [10] DÍAZ, A.; AVENDAÑO, M.; ESCOBAR, A. Evaluating of *Sapindus saponaria* as a defaunation agent and its effects on different ruminal digestion parameters. **Livest. Res. Rural.** 5:1-10. 1994.
- [11] DOMINGUEZ, B.; JEAN, G.; JOVANG, P.; MICHELANGCH, F.; CHEMELLO, M. E. In. Toxicity in MA- 104 cells and rumen protozoa of some phytotoxins. Their Effects on fermentation by faunated and defaunation rumen Inocula. **J. Agric. Food Chem.** 41: 2045-2050. 1993.
- [12] ESPINOSA, V. E. Evaluación de la capacidad desfaunante *in vitro* de leguminosas y arbustivas forrajeras. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. Tesis de Maestría. 70 pp. 1999.
- [13] FONDEVILA, M.; DEHORITY, B. A. Preliminary study on the requirement of *Entodinium exiguum* and *Entodinium caudatum* for live or dead bacteria when cultured *in vitro*. **Reprod. Nutr. Dev.** 41:41-45. 2001.
- [14] GALINDO, J.; ALDAMA, A.I.; MARRERO, Y.; GONZÁLEZ, N. Efecto de *Sapindus saponaria* en los géneros de protozoos y poblaciones de bacterias ruminales. **Rev. Cub. Cien. Agrí.** 34: 353-358. 2000.
- [15] HARRIGAN, W. F.; McCANCE, E. M. Tablas de probabilidad para la determinación del número de bacterias por la técnica de las diluciones. **Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos.** Ed. Academia. León, España. Pp 361-366. 1979.
- [16] HERRERA, H. J. G.; BARRERAS, A. S. Análisis estadístico de experimentos pecuarios **Manual de procedimientos** (Aplicaciones del programa SAS). Colegio de Postgraduados. Pp 109-151. 2005.
- [17] HOBSON, P. N.; JOUANY, J. P. Models mathematical and biological of the rumen function. In: Hobson, P. N. (Ed) **The rumen microbial ecosystem.** Elsevier Applied Sci. London, UK. Pp 461-551. 1988.
- [18] HUNGATE, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. **Bacteriol Rev.** 14:1-49. 1950.
- [19] ITABASHI, H.; KOBAYASHI, T.; MATSUMOTO, M. The effect of rumen ciliate protozoa on energy metabolism and

- some constituents in rumen fluid and blood plasma of goats. **Jap. J. Zootechnol. Sci.** 55 (4): 248–256. 1984.
- [20] JANTHANGVITH, J.; CHUMSRI, P.; KRAISINTU, K.; PONGPAN, A. Comparison of tropane alkaloid production by *Datura innoxia* and *Datura metel* varieties of White, soil, hydroponic, *in vitro* plant cultura and transformed root cultura. 2000. Mahidol University anual Research Abstracts. Online: <http://www.hahidol.ac.th/abstracts/annual1999/0355.thm>. January 20, 2010.
- [21] JOUANY, J. P.; DEMEYER, D.; GRAIN, J. Effect of defaunation the rumen. **Anim. Feed Sci. Technol.** 10:165-172. 1988.
- [22] KLITA, P. T.; MATHISON, G. W.; FENTON, T. W.; HARDIN, R. T. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. **J. Anim. Sci.** 74:1144-1156. 1996.
- [23] LEY DE COSS, A.; COBOS-PERALTA, M.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, D.; GUERRA-MEDINA, E. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y valuación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XXI (1): 43-49. 2011.
- [24] MATA, E. M. A.; HERNÁNDEZ, S. D.; COBOS, P. M. A.; ORTEGA, C. M. E.; MENDOZA, M. G. D.; ARCOS-GARCÍA, J. L. Comportamiento productivo y fermentación ruminal de corderos suplementados con harina de Cocoite (*Gliricidia Sepium*), Morera (*Morus Alba*) y Tulipán (*Hibiscus Rosa-Sinensis*). **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XVI (3): 249-256. 2006.
- [25] MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D. O. Isolation and Characterization of Proteolytic Ruminant Bacteria from Sheep and Goats Fed the Tannin-Containing Shrub Legume *Calliandra calothyrsus*. **Appl. Environm. Microbiol.** 65:307-3083. 1999.
- [26] MENDOZA, G. D.; BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. **J. Anim. Sci.** 71:1572-1578. 1993.
- [27] NAHED, J.; VILLAFUERTE, L.; GRANDE, D.; PEREZ-GIL, F.; ALEMAN, T.; CARMONA, J. Fodder shrub and tree species in the Highlands of southern México. **Anim. Feed Sci. Technol.** 68:213-223. 1997.
- [28] NAVAS-CAMACHO, A.; CORTES, E. J.; GUTIÉRREZ, A. Efecto de la reducción de la población de protozoarios ciliados sobre el funcionamiento ruminal en ovinos alimentados con tamo de trigo. Programa Nacional de Nutrición Animal. C.I. CORPOICA. Bogotá. Colombia. Pp 12-17. 2001.
- [29] NAVAS-CAMACHO, A.; LAREDO, M. A.; CUESTAS, A.; ORTEGA, O.; ROMERO, M. Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate ciliate protozoa from the rumen. **Proc. Soc. Nutr. Physiol.** 3:204-212. 1994.
- [30] NEWBOLD, C. J.; EL HASSAN, M. S.; WANG, J.; ORTEGA, M. E.; WALLACE, R. J. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. **Brit. J. Nutr.** 78:237-249. 1997.
- [31] OGIMOTO, K.; IMAI, S. Rumen Protozoa. **Atlas of rumen microbiology.** Japan Scientific Societies Press. Japan. Pp 230-232. 1981.
- [32] ORDAZ, P. Evaluación *in vitro* de la actividad amebicida de compuestos obtenidos de *Buddleia cordata* sobre varias especies de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. Tesis de Grado. 59 pp. 1996.
- [33] ORTIZ, Z. Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. Tesis de Grado. 75 pp. 1996.
- [34] SCHMELZER, G. H.; GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants. 2008. PROTA Foundation. On Line: <http://www.book.google.com.mx>. November 8, 2010.
- [35] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). User's guide: statistics, V.8, 2002.
- [36] STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. C.; DICKEY, D. A. Non-parametric Statistics. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach.** 3th Ed. Mc Graw-Hill. NY. Pp 562-588. 1997.
- [37] THI, H. N. N. Effect of *Sesbania grandiflora*, *Leucaena leucocephala*, *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ceiba pentandra* on intake, digestion and rumen environment of growing goats. 1998. 1998. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia. Livestock Research for Rural Development. 10(3):12-24. Online: <http://www.cipav.org.co/lrrd>. April 10, 2010.
- [38] USHIDA, K.; JOUANY, J. P.; THIVEND, P. Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. **Brit. J. Nutr.** 56:407-419. 1986.
- [39] VAN NEVEL, C. J.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. I. Digestion in defaunated and refaunated sheep fed soybean oil hydrolysate or crushed toasted soybeans. **Neth. J. Agri. Sci.** 41:205-219. 1993.
- [40] VARGAS, J.E. Efecto de tres follajes arbóreos sobre el consumo voluntario y algunos parámetros de funcionamiento ruminal en ovejas africanas. 1993. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia CIPAV. Livestock Research for Rural Development. 5(3):1-7-1993. En línea: <http://www.cipav.org.co/lrrd>. Septiembre 20, 2008.
- [41] VEIRA, D. M.; IVAN, M. Rumen Ciliate Protozoa: Effect on digestion in the stomach of sheep. **J. Dairy Sci.** 66: 1015–1022. 1983.