

FORMULACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO ANAEROBIO PARA PROTOZOARIOS RUMINALES Y EVALUACIÓN *IN VITRO* EN LA CAPACIDAD DESFAUNANTE DEL EXTRACTO DE PLANTAS

Formulation of an Anaerobic Culture Medium of Rumen Ciliate Protozoa and *in vitro* Evaluation in the Defaunant Capacity of the Extract of Plants

Alejandro Ley De Coss^{1*}, Mario Antonio Cobos Peralta², David Hernández Sánchez² y Enrique Guerra Medina³

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas. Cuerpo Académico de Ecosistemas y Sustentabilidad, Entronque Carretera Costera s/n, Huehuetán, Chiapas, México. CP. 36670. Fax: 01 (964) 62 70439. E-mail: aleycoss@gmail.com

² Especialidad de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México, México. ³ Departamento de Producción Agrícola, Universidad de Guadalajara, Autlan, Jalisco, México.

RESUMEN

Se evaluó la efectividad de un medio de cultivo anaerobio enriquecido con el extracto soluble de *Avena sativa* (Medio de cultivo testigo, MCT) para mantener viables a los protozoarios ciliados del rumen y para evaluar la capacidad desfaunante de los extractos solubles en agua de *Argemone mexicana*, *Baccharis vaccinioides*, *Hibiscus rosa-sinesis*, *Montanoa leucanta*, *Morus alba* y *Yucca schidigera*. La propiedad desfaunante se estimó inoculando 0,5 mL de un concentrado de protozoarios en 9,5 mL de MCT, al cual se adicionaron 150 µL del extracto soluble en agua de las plantas evaluadas más antibióticos, en un diseño completamente al azar. La cuantificación de protozoarios preservados en formaldehído y viables se hizo mediante el conteo directo a 40x en una cámara Neubauer, a las 0; 24; 48 y 72 h. El MCT mantuvo hasta las 72 h de incubación $7,5 \times 10^3$ protozoarios mL⁻¹ con 90% de viabilidad. La capacidad desfaunante se clasificó como capacidad desfaunante (CD) alta (CDA), mediana (CDM) y nula (CDN). En comparación con MCT, los tratamientos con extracto de *A. mexicana*, *B. vaccinioides* y *Y. schidigera* redujeron ($P < 0,05$) la cantidad de protozoarios a menos de 10^2 mL⁻¹ de medio desde las 24 h de incubación, indicando CDA, mientras que los tratamientos con *M. leucanta*, *M. alba*, mantuvieron los protozoarios por arriba de 10^3 mL⁻¹ que representó una CDM. El MCT mantiene una población óptima de protozoarios para hacer evaluaciones *in vitro* y con potencial de uso para evaluaciones futuras en estudios de desfaunación. El extracto de las plantas evaluadas tiene diferencias en la capacidad desfaunante durante el periodo de evaluación.

Palabras clave: Desfaunación, protozoarios, cultivo anaerobio, arbustos multipropósito.

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the effectiveness of an anaerobic culture medium enriched with the soluble extract of *Avena sativa* (control treatment, MCT) to support viable to ciliate rumen protozoa, and to evaluate the capacity defaunante of water-soluble extracts of *Argemone mexicana*, *Baccharis vaccinioides*, *Hibiscus rosa-sinesis*, *Montanoa leucanta*, *Morus alba* and *Yucca schidigera*. The defaunante property was estimated inoculating 0.5 mL of concentrated protozoa in 9.5 mL with MCT, which was added 150 µL of water-soluble extract of the evaluated plants plus antibiotic, in a design completely at random. The quantification of ciliate protozoa preserved in formaldehyde and viable it was done by means of the direct count to 40X in a Neubauer chamber, at 0, 24, 48 and 72 h. The MCT supported even the 72 h of incubation a concentration of protozoa of 7.5×10^3 mL⁻¹ culture media, with 90% of viability. Defaunante capacity (DC) was classified as high (DCA), media (DCM) and null (DCN). Compared with MCT, the extract of the plants *A. mexicana*, *B. vaccinioides* and *Y. schidigera* reduced ($P < 0.05$) the quantity of protozoa to less than 10^2 cell mL⁻¹ of culture medium from 12 h of incubation, it was DCA; whereas, the extract of the plants *M. leucanta*, *M. alba*, they supported the concentration of protozoa overhead of 10^3 cell mL⁻¹, it was DCM. The MCT kept an ideal population of rumen ciliate protozoa to do future *in vitro* evaluate studies of the DC. The extract evaluated of the plants has differences in the capacity defaunante during the period of evaluation.

Key words: Desfaunación, protozoa, anaerobic culture medium, multipurpose shrubs.

INTRODUCCIÓN

A los protozoarios ciliados del rumen se les atribuyen diversas funciones, pero también se les ha tratado de elimi-

nar del rumen para aclarar el debate que existe respecto a su función sobre la concentración y la actividad de las bacterias ruminales, así como en la productividad del animal [13, 23]. La falta de información respecto a la función de los protozoarios ciliados del rumen puede deberse a la falta de técnicas eficaces para eliminarlos, tanto en ambientes *in vitro* como *in vivo*. Las líneas de investigación que buscan esclarecer la función de los protozoarios han trabajado para cultivarlos y mantenerlos vivos fuera del ambiente ruminal, lo que ha permitido establecer tiempos de generación [10], requerimientos de nutrientes e identificar los factores de crecimiento esenciales para su cultivo *in vitro* [11, 23]. Diversas fuentes de alimentos, como las harinas de *Manihot esculenta*, *Musa spp.*, *Oryza sativa* [7], la paja de *Avena sativa* [3], la paja y el gluten de *Triticum aestivum* (específico para *Epidinium ecaudatum*) [27] y el heno de *Dactylis glomerata* (Orchard) [22] han sido utilizadas como fuente de energía en el crecimiento protozoarios aislados del ambiente ruminal. Por otra parte, en la búsqueda de técnicas para desfaunar rumiantes se han evaluado métodos físicos como el retiro del contenido ruminal y posterior lavado con ácido acético o láctico [21], métodos químicos como la adición de diocil sulfato de sodio (DSS) [1-3]; que en la mayoría de los casos han ocasionado problemas a la salud de los animales, incluso la muerte [24], sin que se logre reducir significativamente la concentración de protozoarios [35]. Otro agente químico que mostró actividad desfaunante fue el Secnidazol® con una efectividad del 100% a las 24 h de incubación [23].

En estudios *in vitro* se ha demostrado que, compuestos químicos presentes en leguminosas y plantas arbustivas multipropósito, que son consumidas por rumiantes, pueden llegar a reducir la concentración de protozoarios del rumen, pero en la mayoría de los casos, con poca eficacia [32]. Se ha reportado la presencia de compuestos naturales en plantas con efecto tóxico hacia los protozoarios, como alcaloides, terpenoides, inhibidores de proteasas y fenoles [12, 33]. A través de la desfaunación se espera mejoras en las variables productivas del animal, éstos han logrado el aumento en la concentración de bacterias totales cuando fueron desfaunados [18, 20], lo anterior está relacionado con cambios, posiblemente positivos, en la degradación y fermentación de los carbohidratos de la dieta y en la cantidad de ácidos grasos volátiles (AGV) [8], en la concentración de bacterias amilolíticas [19] y celulolíticas [29, 31] y mayor degradación de la fibra [4], mientras que cambios, reducción en el pH ruminal se ha reportado en animales desfaunados [33], aunque sin diferencia significativa con el pH ruminal de los animales faunados [30, 36]. Con base a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue formular un medio de cultivo anaerobio enriquecido con el extracto soluble de *A. sativa* que permita obtener y mantener concentraciones de 10^3 a 10^4 protozoarios/mL de medio, y evaluar *in vitro* la capacidad desfaunante de plantas utilizadas en la alimentación del ganado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones de la granja experimental y laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Texcoco, México.

Medio de cultivo y tratamientos

El medio de cultivo consistió en la adición a un medio anaerobio (TABLA I) recomendado por Cobos y Yokoyama [6], 150 μ L de extracto de *A. sativa*, 5 mL al 8% de acetato de sodio sugerido por Dehority [10], además 20000 UI de penicilina y 25 mg de estreptomina para mantener una población de 10^8 bacterias mL^{-1} de medio [14], esto último evitó la caída del pH y un posible efecto negativo de éste sobre el crecimiento de los protozoarios [10]. Este medio fue inoculado con 0,5 mL del concentrado de protozoarios, y sometido a un flujo de CO_2 en condiciones de asepsia [6]. Lo anterior representa el tratamiento 1 (medio de cultivo testigo, MCT). Los tratamientos 2; 3; 4; 5 y 6 fueron el MCT más 150 μ L de extracto soluble de las plantas *A. mexicana*, *B. vaccinioides*, *H. rosa-sinensis*, *M. leucantha*, *M. alba* y *Y. schidigera*, respectivamente.

TABLA I
COMPOSICIÓN DEL MEDIO CULTIVO ANAEROBIO (GCA-FR) PARA MANTENIMIENTO DE PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN

Compuesto	Cantidad para 100 mL de medio de cultivo
Agua destilada, mL	47,42
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30,00
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5,00
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5,00
Carbonato de sodio, solución 8% ⁽⁴⁾ , mL	5,00
Solución sulfido-cisteína ⁽⁵⁾ , mL	2,00
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁶⁾ , 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 K_2HPO_4 ; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO_4 y 1,6 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 2,5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH) + 2,5 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (en 100 mL de H_2O); (6) 0,1 mL de rezarsurina en un volumen final de 100 mL.

Obtención del extracto soluble de plantas

Mediante esta prueba se pretendió demostrar la capacidad desfaunante del extracto soluble de las plantas, las cuales fueron deshidratadas al aire libre, después fueron secadas por un período 72 horas en una estufa de secado (VWR International 1390FM, Sheldon Manufacturing, Inc. EUA) a 40°C hasta obtener una humedad constante de 10 a 20%, posteriormente 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 ambar hasta su posterior uso. Para la obtención del extracto soluble de las plantas evaluadas se depositaron 2 g en base seca de cada planta en tubos de ensayo de 18 x 150 mm y se agregaron 20 mL de agua destilada, después se agitaron en un vortex (Genie 2 G-560, Scientific Industries, EUA.) durante 3 min y se dejaron reposar por 30 min, el sobrenadante representó el extracto soluble.

Obtención del concentrado de protozoarios

Se obtuvo, mediante una sonda esofágica, 250 mL de fluido ruminal de *Ovis aries* (borrego criollo) alimentados con una dieta a base de 20% de carbohidratos solubles de fácil fermentación y 80% de paja de *A. sativa*. Posteriormente se depositaron 10 mL de fluido ruminal en un tubo de cultivo de 18x150 mm que contenía 9,0 mL de medio anaerobio (TABLA I), se dejó sedimentar la muestra durante 15 a 20 min en baño maría (Felisa FE-373, Fabricantes Feligneo, México) a 39°C, lo anterior reduce la muerte de protozoarios por enfriamiento. Se obtuvo un material precipitado (masa blanquecina) al retirar el sobrenadante, que representó el inóculo de protozoarios viables.

Inoculación y conteo de protozoarios

Tubos con 9,5 mL medio de cultivo testigo (por triplicado), se mantuvieron en baño maría a una temperatura de 39°C y se inocularon con 0,5 mL del inóculo de protozoarios viables, además de 150 µL de extracto soluble de cada planta evaluada, la inoculación se realizó bajo flujo de CO₂. Al concluir el tiempo de incubación (0; 24; 48 y 72 h) se homogenizaron los tubos de cultivos inoculados y con una pipeta Pasteur se retiró bajo flujo de CO₂, aproximadamente un mililitro de medio. Para determinar, *in vivo*, la cantidad de protozoarios, éste se realizó con un microscopio (Biológico Serie BX51, Olympus, EUA.) a una magnificación de 40X, determinando el número protozoarios en 5 cuadrículas de 1 mm² de ambos cuadros de la cámara Neubaüer (Hausser Scientific, Levy Hemacytomete, EUA). El cuadro de conteo de la cámara mide 1 x 1 mm y una profundidad de 0,1 mm, lo que hace un volumen de 0,1 mm³, es decir 0,1 µL, por tanto el número de protozoarios por mililitro de medio de cultivo se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula: Protozoarios mL⁻¹ = Promedio de la cuadrícula x 10⁴ [9, 10, 23]. Al momento de realizar el conteo, se diferenciaron entre protozoarios vivos y muertos, por lo que las muestras retiradas para realizar el conteo no fueron preservados en solución

(50:50) de formaldehído al 18,5% [9] con la finalidad de determinar el porcentaje de viabilidad en los medios de cultivo evaluados. Los conteos se realizaron, por triplicado, a cada repetición de los tratamientos y los resultados, previos al análisis estadístico fueron analizados en una hoja de cálculo para obtener la media de cada repetición. Un cuarto tubo con 19,5 mL de MCT más 450 µL de extracto de cada planta y 1,5 mL del inóculo de protozoarios, se retiraba bajo flujo de CO₂ una muestra de 2 mL del medio para determinar el pH con un potenciómetro (Orion A250, Orion Research, Inc. EUA) [6, 23].

Condiciones de cultivo

Los medios inoculados se incubaron (Felisa FE-133A, Fabricantes Feligneo, México) a una temperatura de 39°C y siempre al ser manipulados fue bajo flujo de CO₂. Los diferentes muestreos se realizaron de manera rápida y principalmente conservando temperatura y condiciones de anaerobiosis con la finalidad de reducir muerte de protozoarios. Cada 24 horas, a partir de la hora inicial se efectuó el conteo de protozoarios y mediciones de pH. Los tratamientos desfaunantes tuvieron un manejo similar al tratamiento testigo, pero en lugar de adicionar *A. sativa*, se adicionó 150 µL del extracto soluble de cada planta, adicionados únicamente a la hora inicial (0 h).

Efecto de la desfaunación sobre las bacterias totales y celulolíticas

Para estimar el efecto de las plantas con capacidad desfaunante alta sobre la población de bacterias totales y celulolíticas del rumen se prepararon medios de cultivo anaerobios para bacterias totales a base de Glucosa-Celobiosa-Almidón más fluido ruminal (GCA-FR, TABLA I) y para bacterias celulolíticas, el mismo medio, pero se substituyó el contenido de GCA por una tira de papel Whatman (celulosa) como fuente única de carbohidratos [6]. Los medios se inocularon con 0,5 mL de fluido extraído del tratamiento testigo (MCT) y los tratamientos, con el extracto de planta, donde hubo CDA a las 0; 24 y 48 h. Se realizó diluciones decimales hasta 10¹² para bacterias totales y hasta 10¹⁰ para bacterias celulolíticas, y se incubaron a 39°C. La lectura de crecimiento bacteriano se hizo a las 48 h para bacterias totales y a los 10 días para bacterias celulolíticas. Para estimar la cantidad de bacterias por mililitro de medio se utilizó la técnica del número más probable (NMP) [16].

Diseño y análisis estadístico

Para este trabajo de investigación se aplicó un diseño completamente al azar. La evaluación del medio de cultivo anaerobio, así como la capacidad desfaunante *in vitro* 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 [38]. Todas las medias fueron comparadas por medio de la prueba de Tukey [17, 39].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de protozoarios

El MCT mantuvo $7,5 \times 10^3$ protozoarios mL^{-1} con 90% de viabilidad hasta las 72 h de incubación, éste medio no es específico, ya que se identificaron protozoarios de las órdenes Entodiniomorfa (*Entodinium*) y Tricostomatida (Holotricos) que contrasta con los reportes de Fondevila y Dehority [14] y de Martín y col. [25], quienes reportaron una mayor presencia en los medios de cultivo de ciliados del género *Entodinium*. El análisis estadístico permitió identificar diferencias significativas ($P < 0,05$) en las cantidades de protozoarios, entre las plantas evaluadas y el tiempo de incubación (TABLAS II y III). La población de protozoarios observada durante los distintos periodos de incubación en el MCT, indica que éste mantuvo a los protozoarios viables hasta las 72 h de incubación. De las plantas evaluadas, tres presentaron una reducción significativa ($P < 0,05$) de protozoarios (*A. mexicana*, *B. vaccinioides* y *Y. schidigera*), mientras que dos especies (*H. rosa-sinensis* y *M. alba*) mantuvieron ($P > 0,05$) una cantidad similar a la observada en el MCT, se ha reportado que extractos de *B. vaccinioides* y *M. leucanta* tiene capacidad desfaunante desde las 24 h de incubación en medios de cultivo *in vitro* [8]. Aunque se podría indicar que la reducción de los protozoarios en dichas plantas se deba a la presencia de taninos y compuestos secundarios presentes en las plantas se ha reportado que la presencia de estos compuestos en *Gliricidia sepium*, *H. rosa-sinensis* y *M. alba* disminuyeron la población de protozoarios en rumiantes menores, sin que esto signifique un efecto desfaunante, ya que sólo se redujo la población en un 20% [26], por otro lado, se reportó que taninos presentes en *G. sepium* disminuyó la cantidad de protozoarios a menos del 5% [15]. Por lo anterior, más que la presencia de taninos y compuestos secundarios, se podría sugerir que es la concentración de estas sustancias lo que afecta el crecimiento de los protozoarios, aunque se ha reportado que las poblaciones del rumen se adaptan y metabolizan compuestos secundarios (taninos, saponinas, alcaloides, entre otros) presentes en las plantas forrajeras [28, 41].

Con la finalidad de no confundir un efecto desfaunante con la muerte de protozoarios por la falta de nutrientes, se clasificaron a las plantas evaluadas en las categorías de capacidad desfaunante nula (CDN), media (CDM) y alta (CDA), aquellas que mantuvieron una concentración mayor a 10^4 , menor a 10^3 , y menor a 10^2 protozoarios mL^{-1} , respectivamente. De esta manera, los datos obtenidos permitieron revelar que a las 24 h, ninguna de las especies evaluadas mostró CDM, ver TABLA II para ciliados totales y TABLA III para ciliados vivos. A las 48 h, *Y. schidigera* tuvo ($P < 0,05$) CDM y *A. mexicana* presentó CDA ($P < 0,05$). En los registros obtenidos a las 72 h de incubación, las dos especies mencionadas anteriormente y *B. vaccinioides* presentaron CDA ($P < 0,05$), mientras que *M. leucanta* y *M. alba* mantuvieron CDM.

TABLA II
EFECTO DEL EXTRACTO SOLUBLE DE LAS PLANTAS
SOBRE LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE
PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN (10^4 mL^{-1})

Tratamiento	Tiempo de incubación (hora)			
	0	24	48	72
<i>A. sativa</i> (Testigo)	1,8ab	1,72a	1,50a	0,91a
<i>A. mexicana</i>	1,9ab	0,76c	0,23d	0,07cd
<i>B. vaccinioides</i>	1,8ab	0,71c	0,57cd	0,09c
<i>H. rosa-sinensis</i>	1,8ab	1,52a	1,20ab	0,78a
<i>M. leucanta</i>	1,8ab	0,9bc	0,88b	0,38b
<i>M. alba</i>	2,0a	1,11b	0,92b	0,39ab
<i>Y. schidigera</i>	1,9ab	0,35d	0,17d	0,005d
EEM±	4,50	0,96	0,79	1,28

a, b, c y d: distinta letra en la misma columna son diferentes ($P < 0,05$); EEM±, error estándar de la media.

TABLA III
CONCENTRACIÓN DE PROTOZOARIOS CILIADOS
VIALES Y pH DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
ADICIONADOS CON LA FRACCIÓN SOLUBLE
DE LAS PLANTAS DE USOS MÚLTIPLES (10^4 mL^{-1})

Tratamiento	Tiempo de incubación (hora)			
	0	24	48	72
<i>Concentración</i>				
<i>A. sativa</i> (Testigo)	1,7ab	1,6a	1,3a	0,75a
<i>A. mexicana</i>	1,6b	0,66bc	0,13d	0,04c
<i>B. vaccinioides</i>	1,8ab	0,91b	0,82bc	0,13bc
<i>H. rosa-sinensis</i>	1,7ab	1,23a	1,13a	0,55a
<i>M. leucanta</i>	2,1a	1,42a	0,66cd	0,25b
<i>M. alba</i>	1,9ab	1,11ab	0,98b	0,59a
<i>Y. schidigera</i>	2,2a	0,13c	0,09d	0c
EEM±	3,93	0,91	0,93	0,69
<i>pH</i>				
<i>A. sativa</i> (Testigo)	6,9	6,7	6,7	6,7
<i>A. mexicana</i>	6,9	6,6	6,6	6,6
<i>B. vaccinioides</i>	7,0	6,9	6,9	6,9
<i>H. rosa-sinensis</i>	6,9	6,7	6,6	6,6
<i>M. leucanta</i>	7,1	6,8	6,7	6,6
<i>M. alba</i>	6,9	6,8	6,7	6,5
<i>Y. schidigera</i>	6,9	6,7	6,7	6,6

a, b, c y d: distinta letra en la misma columna son diferentes ($P < 0,05$); EEM±, error estándar de la media.

Efecto en la viabilidad de los protozoarios

En la mayoría de los estudios de desfaunación, la metodología para fijar y hacer el conteo de protozoarios, incluye el

tratamiento de la muestra con una solución, al 18,5% de formaldehído [9, 14], esto permite mantener la integridad de la célula por 30 días en refrigeración (Turbo Cooling System TBX88ZB01, General Electric, México) a temperatura ambiente, para su posterior lectura. Desafortunadamente, el formaldehído mata al instante a los protozoarios ciliados, de manera que no es posible distinguir qué porcentaje del total de éstos proliferan en la muestra analizada y cuales ya estaban muertos [23]. Es importante remarcar que, para identificar la capacidad desfaunante *in vitro* de plantas es más recomendable hacer los conteos sobre protozoarios viables y no sobre protozoarios totales. Esta técnica ya ha sido utilizada en trabajos de investigación donde han mantenido viabilidades por más de 30 días [10, 14]. Con base a lo anterior, en el presente estudio no se fijaron las muestras con esta solución para preservar y cuantificar con mayor exactitud a los protozoarios viables. Los resultados se presentan en la TABLA III. A las 24 h, *A. mexicana*, *B. vaccinioides* y *Y. schidigera* presentaron CDM, para las 48 h *M. leucanta* y *M. alba* presentaron CDM; sin embargo, fueron las primeras tres plantas que tuvieron CDA a las 48 h de incubación, para finalmente, a las 72 h de incubación se estableció CDA en la fracción soluble de *A. mexicana*, *B. vaccinioides* y *Y. schidigera*. De acuerdo a estos resultados se puede ver con más claridad el efecto desfaunante de algunas de las plantas evaluadas, ya que para *Y. schidigera* la viabilidad de los protozoarios fue, porcentualmente, de 60; 10; 5 y 0% a las 0; 24; 48 y 72 h, respectivamente, en comparación con el testigo, donde no hubo efecto desfaunante.

Incluir penicilina y estreptomycinina en los medios de cultivo [14] evitó el aumento de la población bacteriana a no más de 10^8 células por mililitro, lo que permitió mantener un pH estable de $6,8 \pm 0,2$ y la sobrevivencia de protozoarios ciliados [25]. De acuerdo a los valores de pH estimados en los diferentes tiempos de incubación (0; 14; 48 y 72 h) se estima que éste (TABLA III) se mantuvo en rangos óptimos para la fauna del rumen [5], por lo que la disminución en el porcentaje de viabilidad en los diferentes tratamientos no se asoció a una bajada del pH, el cual se ha reportado tiene efectos negativos sobre los protozoarios [25].

La capacidad desfaunante de las plantas evaluadas se asocia a que éstas contienen compuestos químicos tóxicos presentes de forma natural, por ejemplo en la *A. mexicana*, una planta tóxica para el ganado contiene alcaloides que atacan el sistema nervioso central, tales como berbecina, protopina, protopinahidroclorina, sanguinarina y dihydro-sanguinarina [37]. Por otro lado, en *B. vaccinioides* se ha reportado la presencia de taninos, saponinas, entre otros [12]. También se ha observado que, la fracción soluble en agua de *Y. schidigera* contiene un alto contenido de saponinas, resveratrol (3,4,5 trihidroxistilbeno), fenoles, 3,3,5,5, tetrahidroxi-4-metoxistilbeno y yucaols A y C [40], en un estudio *in vitro*, el extracto de saponina proveniente de ésta planta (dosis de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) la cantidad de protozoarios fue reducida drásticamente, aunque no se logró una eliminación total de la fauna del rumen [42]. En

un trabajo similar se evaluó un extracto de saponina de *Medicago sativa* y reportaron que hubo una reducción lineal en la concentración de ciliados de rumen $16,5$ a $1,9 \times 10^4$ protozoarios mL^{-1} de fluido ruminal a medida que se aumentó la proporción del extracto en la dieta (0 a 4%) [21]. En este estudio se estimó que, no todas las plantas tienen propiedades desfaunantes y que la disminución en la concentración de protozoarios, principalmente holotricos, puede estar más relacionada con la poca disponibilidad de nutrientes de las plantas, se ha reportado baja cantidad de protozoarios, principalmente de la orden Trichostomatida (holotricos) por la falta de azúcares simples en la dieta; sin embargo, se ha indicado mayor presencia de Entodiniomorfos [25], aunque esta mayor cantidad podría estar relacionada con la capacidad de este último grupo de tener y utilizar los carbohidratos de reserva (placas esqueléticas) que se encuentran dentro de su endoplasma [34].

La concentración de bacterias totales y celulolíticas no fueron afectadas ($P > 0,05$) por los tratamientos evaluados (TABLA IV). No existe información que indique el efecto sobre la flora ruminal de los extractos solubles de las plantas evaluadas. Eugene y col. [13] indicaron que, diferentes tratamientos para desfaunar, no cambian la concentración de bacterias celulolíticas; esta línea de investigación aún se encuentra en controversia para determinar el efecto de la desfaunación sobre variables microbiológicas y parámetros de producción del animal.

TABLA IV
EFECTO DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LAS PLANTAS
SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS
DEL RUMEN

Tratamiento	Tiempo de incubación (hora)		
	0	24	48
<i>Bacterias totales</i> (10^8 mL^{-1})			
<i>A. sativa</i> (Testigo)	1,20	1,8	1,56
<i>A. mexicana</i>	1,34	1,23	1,32
<i>B. vaccinioides</i>	1,34	1,45	1,45
<i>Y. schidigera</i>	0,86	0,95	1,95
<i>Bacterias celulolíticas</i> (10^6 mL^{-1})			
<i>A. sativa</i> (Testigo)	1,22	1,00	0,79
<i>A. mexicana</i>	1,00	0,98	0,45
<i>B. vaccinioides</i>	1,34	0,88	0,34
<i>Y. schidigera</i>	1,20	0,98	0,43

No hay diferencia significativa ($P < 0,05$) dentro de la misma columna.

CONCLUSIONES

Es posible mantener una población de protozoarios viables superior a 10^3 durante 72 h en un medio de cultivo anaerobio. Las plantas *A. mexicana*, *B. vaccinioides* y *Y. schidigera* tuvieron, desde las 48 ó 72 h de incubación, una CDA; mientras que las plantas *M. leucanta* y *M. alba* tuvieron CDM a las

48 y 72 h de incubación, sin llegar a una CDA. La CD de las plantas no estuvo relacionada con los cambios de pH en los medios de cultivo. Los tratamientos evaluados no afectaron las poblaciones de bacterias totales y celulolíticas del rumen. Se recomienda continuar estudiando el efecto sobre las poblaciones microbianas (protozoarios, hongos y bacterias) del rumen de los compuestos secundarios presentes en las fracciones soluble e insoluble de las plantas con potencial uso forrajero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABOU A, A. R.; BARTHEY, E. E.; BERUBE, R.; FINA, L. R.; MEYER, R. M.; HENRICKS, D; JULIUS, F. Simple method to remove completely ciliate protozoa of adult ruminants. **Appl. Microbiol.** 16: 1475–1477. 1968.
- [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] CHANDRAMONI, S. B.; TIWARI, M. C.; HAQUE, N.; LAL, N; JADHAO, B; KHAN, M. Y. Energy balance in faunated and defaunated sheep on a ration high in concentrate to roughage (good quality) ratio. **Pakistan J. of Nutr.** 1: 31-33. 2002.
- [4] CHENG, K. J.; FORSBERG, C. W.; MINATO, H.; COSTERTON, J. W. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: Tsuda, T.; Sasaki, Y.; Kawashima, R. (Eds), **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. Academic Press, Toronto, Canada. 595-624 pp. 1991.
- [5] COBOS, M. A. Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A. (Eds). **Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo**. Ed. Trillas. 498-516 pp. 2007.
- [6] 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. 151–161 pp. 1995.
- [7] COLEMAN, G. S. Cultivation of rumen Entodiniomorphid protozoa on tropical animal feeds. **Trop. Anim. Prod.** 6:11-14. 1981.
- [8] DEHORITY, B. A. Distribution, specificity and role of the rumen protozoa. **Rumen Microbiology**. Ed. Nottingham Univ Press. London. 129-155 pp. 2003.
- [9] DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Appl. Environ. Microbiol.** 48:182-185. 1984.
- [10] DEHORITY, B. A. Generation times of *Epidinium caudatum* and *Entodinium caudatum*, Determined *in vitro* by transferring at various time Intervals. **J. Anim. Sci.** 78:1189-1196. 1998.
- [11] DEHORITY, B. A. Metabolism, nutrition and growth of rumen protozoa. **Rumen Microbiology**. Ed. Nottingham University Press. London. 101-127 pp. 2003.
- [12] ESPINOSA, V. E. Evaluación de la capacidad defaunante *in vitro* de leguminosas y arbustivas forrajeras. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. Tesis de Grado. 66 pp. 1999.
- [13] EUGENE, M.; ARCHIMEDE, H.; MICHALET-DOREAU, B.; FONTY, G. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). **Anim. Res.** 53:187-200. 2004.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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. 361-366 pp. 1979.
- [17] HERRERA, H. J. G.; BARRERAS, A. S. Manual de procedimientos (Aplicaciones del programa SAS). **Análisis estadístico de experimentos pecuarios**. Colegio de Postgraduados. 109-151 pp. 2005.
- [18] 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. Zoot Sci.** 55 (4): 248–256. 1984.
- [19] JOUANY, J. P.; DEMEYER, D.; GRAIN, J.. Effect of defaunation the rumen. **Anim. Feed Sci. Technol.** 10:165-172. 1988.
- [20] KAYOULI, C.; DEMEYER, D. I.; VAN NEVEL, C. J.; DENDUOVEN, R. Effect of defaunation on straw digestion *in sacco* and o particle retention in the rumen. **Anim. Feed Sci. Technol.** 10: 165-172. 1984.
- [21] 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.
- [22] LEE, S. S.; HA, J. K.; CHENG, K. J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation

- tion of orchard grass cell walls and their interactions. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3807-3813. 2000.
- [23] LEY DE C, A. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. Tesis de Grado. 98 pp. 2003.
- [24] LOVELOCK, L. K. A.; BUCHANAN-SMITH, J. G.; FORSBERG, C. W. Difficulties in defaunation of the ovine rumen. **Can. J. Anim. Sci.** 62:299-303. 1982.
- [25] MARTIN, C.; DEVILLARD, E.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. **J. Anim. Sci.** 77:979-987. 1999.
- [26] 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 Tupilipán (*Hibiscus rosa-sinensis*). **Rev Científ. FCV-LUZ.** XVI (3): 249 -256. 2006.
- [27] MICHAŁOWSKI, T.; RYBICKA, K.; WERESZKA, K.; KASPEROWICZ, A. Ability of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for *in vitro* growth. **Acta Protozool.** 40:203-210. 2001.
- [28] MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D. O. Isolation and Characterization of Proteolytic Ruminal Bacteria from Sheep and Goats Fed the Tannin-Containing Shrub Legume *Calliandra calothyrsus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65:3075-3083. 1999.
- [29] MOORE, B. R.; DEHORITY, B. A. Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. **J. Anim. Sci.** 71: 3350-3358. 1993.
- [30] NAGARAJA, T. G.; TOWNE, G.; BEHARKA, A. A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:2410-2414. 1992.
- [31] NAVAS-CAMACHO, A.; CORTES, J. E.; 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. 7. 12-17 pp. 2001.
- [32] 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.
- [33] NEWBOLD, C. J.; EL HASSAN, S. M.; 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.
- [34] OGIMOTO, K.; IMAI, S. Rumen Protozoa. **Atlas of rumen microbiology.** Japan Scientific Societies Press. Japan. Pp 230. 1981.
- [35] OSDEMIR, M. M.; CINAR, M.; HALILOGLU, S.; ERYYYAVUZ, A. Effects of defaunation and dietary nitrogen source on sodium, potassium, iron and zinc in the rumen fluid, plasma and wool of lambs. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 30: 1-7. 2006.
- [36] ROWE, J.; DAVIES, A.; BROOME, A. W. Quantitative effects of defaunation on rumen fermentation and digestion in sheep. **Brit. J. Nutr.** 54:105-119. 1985.
- [37] SCHMELZER, G. H.; GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants. 2008. Plants Resources of Tropical Africa (Program). 105-108 pp. On Line: <http://book.google.com.mx>. November 8, 2010.
- [38] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). User's guide: statistics, V.6. 1999.
- [39] 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. 562-588 pp. 1997.
- [40] SEN, S.; MAKKAR, H. P.; MUETZEL, S.; BECKER, K. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. **Lett Appl Microbiol.** 27:35-38. 1998.
- [41] 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. Livestock Research for Rural Development. 10 (3):12-24. Centro para la investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia. On Line: <http://www.cipav.org.co/lrrd>. Septiembre 10, 2006.
- [42] WANG, Y.; MC ALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J.; RODE, L. M.; CHEEKE, R. P.; CHENG, K. J.. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (Rusitec). **Anim. Feed Sci. Technol.** 74:143-153.1988.