

EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA POBLACIÓN MICROBIAL DE METANÓGENOS Y METANOGENÉ- NESIS RUMINAL *IN VITRO*

Daniel-Alejandro zabala-Montesdeoca, Byron-Leonicio Díaz-Monroy, Sonia-Elisa Peñafiel-Acosta.

Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Panamericana Sur Km 1, Teléfono: 097192784, E-mail: holabyron@yahoo.es

Resumen

En el Departamento de Ciencias Biofisiológicas del Instituto de Ciencia Animal (ICA), Municipio “San José de las Lajas”, Provincia La Habana - Cuba, entre Septiembre 2008 a Enero 2009, se realizó la: “Evaluación de plantas proteicas y su efecto en la población microbial de metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*”, determinándose como las mejores plantas proteicas *Samanea saman*, *tithonia diversifolia* y *Albizia lebbek*, las cuales registraron las menores producciones de gas metano con valores de 4.31, 5.70 y 9.18 μL respectivamente; de estas plantas la que mejores resultados presentó en la ecología microbiana fue *Samanea saman* registrando una población de Bacterias Viabiles Totales de 34.22×10^{11} UFC/mL, densidades de Bacterias y Hongos Celulolíticos fue de 32.33×10^5 UFC/mL y 15.00×10^4 UPC/mL a las 8 horas de fermentación respectivamente; mientras que la densidad de Bacterias Metanogénicas registro una población de 11.33×10^{10} UFC/mL a la misma hora de evaluación. Por ello se recomienda utilizar la planta proteica *Samanea saman* para la implementación de bancos de proteína para bovinos en el trópico, a fin de disminuir la contaminación ambiental por gas metano y amoníaco, con un excelente incremento de bacterias y hongos celulolíticos que permitirán aprovechar de mejor manera los nutrientes aportados por los pastos.

palabras claves: Metanógenos, ruminal, plantas proteicas, metano

Abstract

The research entitled “Assessment of the protein plants and their effect in the microbial population of methanogens and ruminal methanogenesis *in vitro*” has been carried out at the Bio-Physiological Sciences department of the Animal Sciences Institute, “San José de las Lajas”, La Habana – Cuba, from September 2008 to January 2009. The plants which recorded lower methane gas outcome were *Samanea saman*, *tithonia diversifolia* y *Albizia lebbek*, with values of 4.31, 5.70 y 9.18 μL , respectively. Among the previous plants, *Samanea saman*, yielded the best results, registering a Total Viable Bacteria population of 34.22×10^{11} UFC/mL, Bacteria and Cellulolytic Fungus density of 32.33×10^5 UFC/mL and 15.00×10^4 UFC/mL respectively, after a 8-hour-long fermentation; whereas the Methanogenic Bacteria density recorded 11.33×10^{10} UFC/mL at the same time. Therefore, it is recommended that the protein plant *Samanea saman* should be used for implementing protein banks for cattle at the tropics, in order to reduce the environmental pollution caused by methane gas and ammoniac, with an outstanding increase of Bacteria and Cellulolytic Fungus, which will allow making the most of the nutrients provided by the grass.

Keywords: Methanogens, ruminal, proteic plants, methane

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las investigaciones en nutrición animal se han encaminado a optimizar la eficiencia productiva del ganado por manipulación de la comunidad microbiana que habita en el tracto gastrointestinal de estos animales (1). El empleo de los árboles y arbustos en la alimentación animal se halla en auge, considerando que pueden ser incluidos en los sistemas ganaderos proporcionando un servicio ambiental debido a que los animales disponen de mayor confort. La suplementación con estas plantas incrementa el valor nutritivo de la dieta que consumen los animales debido a su mayor contenido en proteínas, vitaminas y minerales.

Uno de los problemas más serios a los que se enfrenta el mundo es el calentamiento global debido al incremento de emisiones de gases que provocan el denominado efecto invernadero (GEI). El metano (CH_4) es un potente GEI, ya que su potencial de absorción de la radiación es aproximadamente 21 veces superior

al del CO_2 (5), si bien su concentración con respecto al CO_2 es muy baja, su contribución al efecto invernadero es importante, por lo que la disminución de su emisión puede ocasionar ventajas ecológicas considerables.

El CH_4 entérico que emiten los rumiantes no solo constituye un problema ecológico, sino que también ocasiona una pérdida considerable de la energía del alimento (6), y como consecuencia disminuye la productividad de estos animales, ya que entre el 2 y el 12% de la energía bruta de los alimentos consumidos por los animales, se pierde en forma de metano (4). De estudios precedentes se conoce que los metanógenos viven de manera endosimbiótica con los protozoos del rumen; es por ello que cualquier práctica que reduzca su población consecuentemente permitirá reducir los metanógenos y producción de metano en el rumen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y duración del Experimento

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Rumen del Departamento de Ciencias Biofisiológicas del Instituto de Ciencia Animal, ubicado en la carretera central a 47 ½ km ciudad de la Habana- Cuba. La duración del trabajo de investigación fue de 120 días. La validación de la investigación se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal (LABIMA), de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, ubicado en la panamericana sur km 1½ de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo-Ecuador, y tuvo una duración de 30 días. Las condiciones meteorológicas en las zonas de estudio se resumen en el cuadro 1.

PARÁMETROS	ICA – CUBA	ESPOCH - ECUADOR
Temperatura	26 °C	14 °C
Humedad	78%	60%
Vientos	15 km/h	22 km/h
Heliofanía	11 horas	10 horas

Cuadro 1. CONDICIONES METEOROLÓGICAS
Fuente: Estación Meteorológica ICA, (2008). FRN-ESPOCH, (2008).

Unidades experimentales

La investigación estuvo conformada por dos experimentos, detallados a continuación:

Primer experimento: “Evaluación de 11 plantas proteicas y su efecto en la metanogénesis ruminal *in vitro*”. Cada unidad experimental estuvo constituida por una botella de vidrio de 100 mL de capacidad, en donde se introdujo el líquido ruminal, pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), y la planta proteica evaluada, en relación pasto estrella: árbol evaluado 70:30, siendo necesarias un total de 144 botellas para la consecución de este experimento.

Segundo experimento: “Evaluación de las 3 mejores plantas proteicas y su efecto en la población de metanógenos ruminales *in vitro*”. Cada unidad experimental para el segundo experimento estuvo compuesta por una botella de vidrio de 100 mL de capacidad, en donde se introdujo el líquido ruminal, pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), y las tres mejores plantas proteicas evaluadas en el experimento uno (*Samanea saman*, *Albizia lebbek* y *tithonia diversifolia*), en relación pasto estrella: árbol evaluado 70:30, siendo necesarias un total de 36 botellas para la consecución de este experimento.

Tratamientos y diseño experimental

Primer experimento: Los tratamientos en este experimento estuvieron conformados por 11 plantas que fueron sometidas a digestión *in vitro* junto con el pasto estrella, las plantas integran el arboretum del Instituto de Ciencia Animal y son las siguientes:

<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Pithecellobium dulce</i>
<i>Gliricidia sepium</i>	<i>Cordia alba</i>
<i>Azadirachta indica</i>	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>
<i>Albizia lebbbeck</i>	<i>Guazuma ulmifolia</i>
<i>Moringa oleifera</i>	<i>tithonia diversifolia</i>
<i>Samanea saman</i>	

El diseño experimental empleado fue completamente al azar en arreglo factorial 12 x 4 (12 tratamientos; 4 horas de muestreo 4, 8, 12 y 24 horas), para los indicadores producción de gas y metano.

Segundo experimento: Se utilizaron las 3 mejores plantas que redujeron en mayor grado la producción de metano *in vitro* del primer experimento (*Samanea saman*, *Albizia lebbbeck* y *tithonia diversifolia*), que fueron sometidas a digestión *in vitro* junto con el pasto estrella en relación 30:70 comparados versus un grupo Control. El diseño experimental empleado fue completamente al azar en arreglo factorial 4 x 3 (4 tratamientos; 3 horas de muestreo 2, 4 y 8 horas), para los indicadores microbianos y fermentativos.

Análisis estadísticos y pruebas de significancia

Para los análisis estadísticos los datos fueron sometidos a los siguientes procedimientos:

Análisis de Varianza (ADEVA).

Separación de promedios por el método de rango múltiple de Duncan a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$.

Procedimiento experimental

Primer experimento: El experimento se condujo bajo condiciones *in vitro*, para lo cual se empleó la técnica de Theodorou, M. et al, (1994), y se utilizaron botellas de vidrio de 100 mL selladas con tapón de butilo y agrafe. En cada botella se introdujo la mezcla integrada por líquido de rumen y solución buffer en una relación de una parte de líquido ruminal, dos partes de solución buffer. El inóculo ruminal se obtuvo a partir de dos búfalos canulados en rumen, alimentados con una dieta de forraje de gramíneas sin suplementación adicional y libre acceso al agua. La muestra de líquido ruminal se recolectó a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío y se lo con-

servó en termos herméticamente cerrados hasta su traslado al laboratorio de microbiología y genética molecular del rumen, del Instituto de Ciencia Animal donde, posteriormente, se filtró a través de muselina. Para conformar la mezcla a fermentar, se utilizó el pool de líquido ruminal de los toros con el propósito de eliminar el efecto animal. El alimento base para la fermentación es pasto estrella, la misma es estimada a partir de un área sin pastorear del Instituto de Ciencia Animal. Para su preparación, se recolectaron hojas con sus pecíolos, de manera que semejen el bocado del animal. La muestra se secó en estufa a 60°C durante 48 horas. De las plantas seleccionadas para su evaluación como candidatas a reducir la producción de metano, se recogió las fracciones hojas + pecíolos + vainas verdes. La fracción a muestrear fue de 1 kg. Una vez que se obtuvo, se esparcieron las muestras sobre un plato de asfalto con el propósito de secarlas al sol durante 3 días consecutivos. Posteriormente se las molió con ayuda de un molino hasta un tamaño de partículas de 1mm.

Segundo experimento: Se empleó el mismo procedimiento que en el primer experimento. Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate, R. (1950), en tubos roll y bajo condiciones de anaerobiosis estricta. La siembra de bacterias viables totales, y celulolíticas se efectuarán en los medios de cultivo de Caldwell, D. y Bryant, M. (1996), modificado por Galindo, J. (1998). Para el conteo de las bacterias metanogénicas se empleó el mismo método; pero se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40), en la fase gaseosa. Los protozoos se preservaron en formol al 10% en una dilución 1:1 (v/v). Las muestras preservadas se guardaron en refrigerador a 4°C y se contaron, posteriormente, al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para ello los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0.01% en ácido acético glacial al 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMER EXPERIMENTO: EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA META-NOGÉNESIS RUMINAL *IN VITRO*

Producción de gas *in vitro*

La producción de gas *in vitro* al evaluar diferentes plantas proteicas respecto a la metanogénesis ruminal presentó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), de esta manera el grupo control en el cual se sometió a digestión únicamente al *Cynodon nlemfuensis* presentó la mayor producción de gas obteniéndose un promedio de 20.41 mL de gas, en tanto que las menores producciones de gas se registraron mediante la utilización de *Samanea saman* con un promedio de 8.17 ml de gas; *tithonia diversifolia* con una producción promedio de 10.75 mL de gas, seguida por *Azadirachta indica* con 12.25 mL de gas, presentando diferencias estadísticas no significativas con *Albizia lebbbeck* con un promedio de 12.33 ml de gas, las demás plantas proteicas presentaron producciones de gas superiores, por lo que no fueron consideradas para la segunda fase del estudio.

Producción de metano

Al evaluar la producción de gas metano *in vitro* de diferentes plantas proteicas respecto a la metanogénesis ruminal, estas presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), registrándose la mayor producción de gas metano en el grupo control donde se sometió a digestión únicamente al *Cynodon nlemfuensis* obteniéndose una producción de metano de 65.30 μL , mientras que las menores producciones de gas metano se obtuvieron con la utilización de *Samanea saman* con una producción promedio de 4.31 μL de gas metano, seguida de *tithonia diversifolia* con 5.70 μL de gas metano, a continuación *Azadirachta indica* con una producción de gas metano de 8.53 μL a pesar de su baja producción de gas metano esta planta es poco pala-

table para el animal por lo que *Albizia lebbbeck* con una producción de 9.18 μL de gas metano fue seleccionada para el segundo experimento de la investigación, las demás plantas proteicas presentaron producciones de gas metano superiores lo cual indica su baja actividad anti metanogénica *in vitro*, cuadro 2.

Galindo, J. (1998), informó el efecto de *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Gliricidia sepium*, *Sapindus saponaria* como plantas defaunantes de protozoos en las cuales se encontraron taninos condensos aislados a partir de hojas y pecíolos, las mismas que causaron el efecto deseado al disminuir la población protozoarica y metanogénica del rumen.

PLANTAS PROTEICAS	VARIABLES	
	PDN. GAS TOTAL (mL)	PDN. CH4 (μL)
<i>Samanea saman</i>	8,17 i	4,31 l
<i>tithonia diversifolia</i>	10,75 h	5,70 k
<i>Azadirachta indica</i>	12,25 g	8,53 j
<i>Albizia lebbbeck</i>	12,33 g	9,18 i
<i>Cordia alba</i>	13,50 f	11,71 h
<i>Leucaena leucocephala</i>	17,25 c	16,37 g
<i>Pithecellobium dulce</i>	12,83 fg	20,04 f
<i>Moringa oleifera</i>	19,17 b	25,28 e
<i>Gliricidia sepium</i>	16,00 de	29,03 d
<i>Guazuma ulmifolia</i>	16,75 cd	37,99 c
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	15,33 e	64,68 b
Control	20,41 a	65,30 a
Media	14,56	24,84
Probabilidad	0,0001	0,0001
% CV	8,60	1,17

Cuadro 2. PRODUCCIÓN DE GASES EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL "IN VITRO".

SEGUNDO EXPERIMENTO: EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA POBLACIÓN DE METANÓGENOS RUMINALES *IN VITRO*

Bacterias viables totales: Al determinar la densidad de bacterias viables totales en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal "in vitro", se encontraron diferencias estadísticas significativas obteniéndose la mayor densidad para *Albizia lebbbeck* con 42.77×10^{11} UFC/mL en tanto que las menores densidades de Bacterias Viables Totales se registraron mediante la utilización de *Samanea saman* con 34.22×10^{11} UFC/mL y *tithonia diversifolia* con 29.77×10^{11} UFC/mL hasta llegar a la menor densidad con el tratamiento control el mismo que registró un valor de 24.55×10^{11} UFC/mL, cuadro 3.

Los resultados obtenidos para esta variable en el tratamiento control posiblemente se deban a que en su totalidad la población de bacterias está representada por bacterias metanogénicas, en tanto que las poblaciones de bacterias de los tratamientos en los cuales se incluyó plantas proteicas demuestran mayores promedios por el hecho de que están representadas por bacterias celulolíticas en mayor cantidad con una marcada disminución de bacterias metanogénicas, que también se hallan contabilizadas dentro de la población total de bacterias.

PLANTAS PROTEICAS							
VARIABLES	Control	<i>Samanea saman</i>	<i>Albizia lebeck</i>	<i>tithonia diversifolia</i>	X	Prob.	CV (%)
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/mL	24,55 d	34,22 b	42,77 a	29,77 c	32,83	0,0001**	7,44

Cuadro 3. DENSIDAD DE BACTERIAS VIABLES TOTALES EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGENESIS RUMINAL "IN VITRO".

PLANTAS PROTEICAS DE ACUERDO AL TIEMPO															
Variables	2 Horas				4 Horas				8 Horas				X	Prob.	CV(%)
	C	SS	AL	TD	C	SS	AL	TD	C	SS	AL	TD			
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^9 UFC/mL	13,00b	23,66a	13,66b	14,33b	8,00c	26,00	15,66b	17,00b	7,66c	32,33a	20,33b	31,00a	18,56	0,0001**	9,24
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^{10} UFC/mL	74,00a	70,33a	13,66b	71,33a	78,33a	20,33c	41,33b	22,66c	84,66a	11,33c	20,66b	12,00c	48,31	0,0001**	3,98
Densidad de Hongos Celulolíticos, 1×10^4 UFC/mL	6,00a	7,66a	72,66a	6,33a	5,00c	11,00a	7,00bc	8,33b	4,00c	15,00a	8,33b	9,33b	7,86	0,0001**	9,72
Densidad de Protozoarios, 1×10^3 Especímenes/mL	91,8 a	63,07d	83,33b	72,20c	93,17a	53,50d	80,13b	62,73c	106,17a	33,27d	71,77b	52,83c	72,00	0,0001**	1,15

TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE ACUERDO AL TIPO DE PLANTA PROTEICA														
Variables	Control			<i>Samanea saman</i>			<i>Albizia lebeck</i>			<i>tithonia diversifolia</i>			Prob.	CV(%)
	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8		
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^9 UFC/mL	13,00a	8,00ab	7,66b	23,66a	26,00b	32,33a	13,66b	15,66ab	20,33a	14,33b	17,00b	31,00a	0,0001**	9,24
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^{10} UFC/mL	74,00b	78,33b	84,66a	70,33a	20,33b	11,33c	72,66a	41,33b	20,66c	71,33a	22,66b	12,00c	0,0001**	3,98
Densidad de Hongos Celulolíticos, 1×10^4 UFC/mL	6,00a	5,00a	4,00a	7,66a	11,00b	15,00a	6,33a	7,00a	8,33a	6,33b	8,33ab	9,33a	0,0001**	9,72
Densidad de Protozoarios, 1×10^3 Especímenes/mL	91,8b	93,17b	106,17a	63,07d	53,50b	33,27c	83,33a	80,13b	71,77c	72,20a	62,73b	52,83c	0,0001**	1,15

Cuadro 4. COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES MICROBIOLÓGICOS Y FERMENTATIVOS, EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGENESIS RUMINAL "IN VITRO", DE ACUERDO AL TIPO DE PLANTAS Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN.

C: Control; ss: *Samanea saman*; al: *Albizia lebeck*; td: *Tithonia diversifolia*; Según Duncan ($P < 0.05$ y $P < 0.01$); Prob: Probabilidad; CV (%): Porcentaje de Coeficiente de Variación; X: Media General; **: Diferencia altamente significativa entre promedios; *: Diferencia significativa entre promedios; ns: Diferencia no significativa entre promedios; Letras iguales no difieren estadísticamente.

Bacterias celulolíticas: La densidad de bacterias celulolíticas registró diferencias significativas ($P < 0.01$) dentro de los tratamientos de cada uno de los factores en estudio; asimismo se determinó interacción significativa entre factores, por lo que se exponen los siguientes resultados:

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias celulolíticas, en función al tipo de planta proteica dentro de cada hora de evaluación, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos en la densidad de bacterias celulolíticas dentro de cada periodo de tiempo evaluado; de esta manera al comparar la densidad de bacterias celulolíticas a las 2 horas, se determinó el mayor promedio mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* con 23.66×10^5 UFC/mL, seguido por las densidades de bacterias obtenidas mediante la incorporación *in vitro* de *tithonia diversifolia*, *Albizia lebeck* así como en el grupo control en donde se determinaron densidades de 14.33, 13.66 y 13.00×10^5 UFC/mL respectivamente, cuadro 4. Por su parte a las 4 horas de evaluación, la densidad de bacterias celulolíticas obtenida mediante la incorporación de plantas proteicas *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de bacterias celulolíticas mediante el empleo de *Samanea saman* alcanzando un promedio de 26.00×10^5 UFC/mL, seguida por los promedios obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *tithonia diversifolia* y *Albizia lebeck* con promedios de 17.00 y 15.66×10^5 UFC/mL respectivamente, en última instancia el grupo control presentó la menor densidad de bacterias celulolíticas con 8.00×10^5 UFC/mL. Finalmente, a las 8 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a las comparaciones anteriormente realizadas, determinándose los mayores promedios mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* y *tithonia diversifolia* con 32.33 y 31.00×10^5 UFC/mL de bacterias

celulolíticas; posteriormente se ubicaron los promedios de densidades de bacterias celulolíticas mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebeck* y por otro lado el grupo control en donde se determinaron densidades de 20.33 y 7.66×10^5 UFC/mL respectivamente.

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias celulolíticas, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de planta proteica, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de planta proteica evaluada y grupo control; de esta manera al comparar la densidad de bacterias celulolíticas dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 2 horas con 13.00×10^5 UFC/mL, seguido por las densidades de bacterias obtenidas a las 4 y 8 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 8.00 y 7.66×10^5 UFC/mL respectivamente.

Por su parte, mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* la densidad de bacterias celulolíticas difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de bacterias celulolíticas a las 8 horas alcanzando un promedio de 32.33×10^5 UFC/mL; seguida por los promedios obtenidos a las 4 y 2 horas de evaluación con promedios de 26.00 y 23.66×10^5 UFC/mL correspondientemente, lo cual indica un incremento en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo. Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebeck* se determinaron diferencias estadísticas: es así que a las 8 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 20.33×10^5 UFC de bacterias celulolíticas/mL, seguida por las densidades de bacterias obtenidas a las 4 y 2 horas de evaluación donde se determinaron promedios de 15.66 y 13.66×10^5 UFC/mL en su orden.

Finalmente, al incorporar de manera *in vitro* la planta proteica *tithonia diversifolia* existe un comportamiento similar a las comparaciones anteriormente realizadas con la incorporación de plantas proteicas, determinándose el mayor promedio de bacterias a las 8 horas de evaluación con 31.00×10^5 UFC/mL de bacterias celulolíticas; posteriormente se ubicó el promedio de densidad de bacterias celulolíticas a las 4 horas con 17.00×10^5 UFC/mL y con el menor promedio la densidad de bacterias alcanzada a las 2 horas de evaluación con 14.33×10^5 UFC/mL.

Bacterias metanogénicas: Dentro de la cuantificación de bacterias metanogénicas se registraron diferencias significativas ($P < 0.01$), entre los tratamientos de los dos factores evaluados, determinándose además interacción

significativa entre factores, encontrándose los siguientes resultados:

En el contraste de promedios de la densidad de bacterias metanogénicas, en función al tipo de planta proteica dentro de cada hora de evaluación, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada periodo de tiempo evaluado: de esta manera al comparar la densidad de bacterias metanogénicas a las 2 horas no se determinaron diferencias estadísticas. Es así que los promedios obtenidos en el grupo control y mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, *Albizia lebbbeck* y *tithonia diversifolia* presentaron densidades de bacterias metanogénicas de 74.00, 70.33, 72.66 y 71.33x10¹⁰ UFC/mL respectivamente.

A las 4 horas de evaluación, las densidades de bacterias metanogénicas obtenida mediante la incorporación de plantas proteicas *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de bacterias metanogénicas obtenida en el grupo control donde no se utilizaron plantas proteicas con un promedio de 78.33x10¹⁰ UFC/mL; y determinándose una mayor eficiencia en la reducción de bacterias metanogénicas mediante el empleo de *Samanea saman* y *tithonia diversifolia* con un promedio de 20.33 y 22.66x10¹⁰ UFC/mL, seguidas por el promedio obtenido mediante la utilización *in vitro* de *Albizia lebbbeck* con un promedio de 41.33x10¹⁰ UFC/mL. Por otro lado, a las 8 horas de evaluación existe un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada, determinándose las mayores eficiencias en reducción de bacterias metanogénicas mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* y *tithonia diversifolia* con 11.33 y 12.00x10¹⁰ UFC/mL; posteriormente en orden de eficiencia se ubicó el promedio de densidad de bacterias metanogénicas mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbbeck* con un promedio de 20.66x10¹⁰ UFC/mL; y finalmente con la mayor densidad de este tipo de bacterias se encuentra el grupo control en donde se determinó una densidad de 84.66x10¹⁰ UFC/mL respectivamente.

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias metanogénicas, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de planta proteica, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de planta proteica evaluada y grupo control; de esta manera al comparar la densidad de bacterias metanogénicas dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 8 horas con 84.66x10¹⁰ UFC/mL, seguido por las densidades de bacterias obtenidas a las 4 y 2 horas de evaluación en las cuales se

determinaron densidades de 78.33 y 74.00x10¹⁰ UFC/mL respectivamente. Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, las densidades de bacterias metanogénicas difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de bacterias metanogénicas a las 2 horas alcanzando un promedio de 70.33x10¹⁰ UFC/mL; seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 20.33x10¹⁰ UFC/mL; mientras que el menor promedio se registró a las 8 horas con 11.33x10¹⁰ UFC/mL, lo cual indica un descenso en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo. Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbbeck* se determinaron diferencias estadísticas; es así que a las 2 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 72.66x10¹⁰ UFC de bacterias metanogénicas/mL; seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 41.33x10¹⁰ UFC/mL; mientras que el menor promedio se registró a las 8 horas con 20.66x10¹⁰ UFC/mL, lo cual indica un descenso en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo.

Asimismo al incorporar de manera *in vitro* la planta proteica *tithonia diversifolia* existe un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada con la incorporación de plantas proteicas, determinándose el mayor promedio de bacterias a las 2 horas de evaluación con 71.33x10¹⁰ UFC/mL de bacterias metanogénicas posteriormente se ubicó el promedio de densidad de bacterias metanogénicas a las 4 horas con 22.66x10¹⁰ UFC/mL; y con el menor promedio la densidad de bacterias alcanzada a las 8 horas de evaluación con 12.00x10¹⁰ UFC/mL.

Hongos celulolíticos: La densidad de hongos celulolíticos registró diferencias significativas ($P < 0.01$), dentro de los tratamientos de los factores en estudio;

asimismo se determinó interacción significativa entre factores, por lo que se exponen los siguientes resultados:

En la densidad de hongos celulolíticos, en función al tipo de planta proteica dentro de cada hora de evaluación, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos en la densidad de hongos celulolíticos dentro de cada periodo de tiempo evaluado: de esta manera al comparar la densidad de hongos celulolíticos a las 2 horas de evaluación los promedios son estadísticamente iguales, registrándose promedios de 6.00, 7.66, 6.33 y 6.33x10⁴ UFC/mL para los grupos de unidades experimentales correspondientes al grupo control y aplicación *in vitro* de *Samanea saman*, *Albizia lebbbeck* y *tithonia diversifolia* respectivamente.

Por su parte, a las 4 horas de evaluación, la densidad de hongos celulolíticos obtenida mediante la incorporación de plantas proteicas *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de hongos celulolíticos mediante el empleo de *Samanea saman* alcanzando un promedio de 11.00x10⁴ UFC/mL, seguida por los promedios obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *tithonia diversifolia* y *Albizia lebbbeck* con promedios de 8.33 y 7.00x10⁴ UPC/mL respectivamente; en última instancia el grupo control presentó la menor densidad de hongos celulolíticos con 5.00x10⁴ UFC/mL.

Finalmente a las 8 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada, determinándose el mayor promedio mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* alcanzando un promedio de 15.00x10⁴ UFC/mL, seguida por los promedios obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *tithonia diversifolia* y *Albizia lebbbeck* con promedios de 9.33 y 8.33x10⁴ UFC/mL respectivamente; en

última instancia el grupo control presentó la menor densidad de hongos celulolíticos a esta hora de evaluación con 4.00x10⁴ UFC/mL.

Al comparar los promedios de la densidad de hongos celulolíticos, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de planta proteica, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de planta proteica evaluada y grupo control; de esta manera al comparar la densidad de hongos celulolíticos dentro del grupo control, se determinó un comportamiento que no difiere en función del tiempo, registrando promedios de 6.00, 5.00 y 4.00x10⁴ UFC/mL a las 2, 4 y 8 horas.

Por su parte, mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* la densidad de hongos celulolíticos difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de hongos celulolíticos a las 8 horas alcanzando un promedio de 15.00x10⁴ UFC/mL; posteriormente se ubicó el promedio de densidad de hongos celulolíticos a las 4 horas con 11.00x10¹⁰ UFC/mL; y con el menor promedio la densidad de hongos alcanzada a las 2 horas de evaluación con 7.66x10¹⁰ UFC/mL, lo cual indica que la población de hongos celulolíticos se incrementa con el transcurso del tiempo. Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbbeck* se determinó un comportamiento que no difiere en función del tiempo, registrando promedios de 6.33, 7.00 y 8.33x10⁴ UFC/mL a las 2, 4 y 8 horas. Por otro lado al incorporar de manera *in vitro* la planta proteica *tithonia diversifolia*, se determinó el mayor promedio de hongos a las 8 horas de evaluación con 9.33x10⁴ UFC/mL; posteriormente se ubicó el promedio de densidad de hongos celulolíticos a las 4 horas con 8.33x10⁴ UFC/mL; y con el menor promedio la densidad de hongos alcanzada a las 2 horas de evaluación con 6.33x10⁴ UFC/mL.

protozoarios: En la cuantificación de protozoarios se registraron diferencias significativas ($P < 0.01$), entre los tratamientos de los dos factores evaluados, determinándose además interacción significativa entre factores, encontrándose los siguientes resultados: para la población de protozoarios en función al tipo de planta proteica dentro de cada hora de evaluación, se determinaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada periodo de tiempo evaluado. De esta manera al comparar la densidad de protozoarios a las 2 horas se determinaron diferencias estadísticas: es así que la menor cantidad de protozoarios se determinaron me-

diante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* alcanzando un promedio de 63.07×10^3 especímenes/mL; seguido por la densidad de protozoarios obtenida mediante la incorporación *in vitro* de *tithonia diversifolia* con un promedio de 72.20×10^3 especímenes/mL; posteriormente con menor eficiencia en la reducción de protozoarios la densidad obtenida mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbbeck* con 83.33×10^3 especímenes/mL; y finalmente con la mayor población de protozoarios el grupo control con un promedio de 91.80×10^3 especímenes/mL. A las 4 horas de evaluación, las densidades de protozoarios obtenidas mediante la incorporación de plantas proteicas *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de protozoarios obtenida en el grupo control donde no se utilizaron plantas proteicas con un promedio de 93.17×10^3 especímenes/mL; y determinándose una mayor eficiencia en la reducción de protozoarios mediante el empleo de *Samanea saman* con un promedio de 53.50×10^3 especímenes/mL, seguida por el promedio obtenido mediante la utilización *in vitro* de *tithonia diversifolia* con un promedio de 62.73×10^3 especímenes/mL; posteriormente en orden de menor eficiencia en cuanto a reducción de protozoarios se ubicó el promedio obtenido mediante la utilización *in vitro* de *Albizia lebbbeck* con 80.13×10^3 especímenes/mL. Por otro lado, a las 8 horas de evaluación se determinó la mayor eficiencia en la reducción de protozoarios mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman* con un promedio de 33.27×10^3 especímenes/mL; seguida por el promedio obtenido mediante la utilización *in vitro* de *tithonia diversifolia* con un promedio de 52.82×10^3 especímenes/mL posteriormente en orden de menor eficiencia en cuanto a reducción de protozoarios se ubicó el promedio obtenido mediante la utilización *in vitro* de *Albizia lebbbeck* con 71.77×10^3 especímenes/mL; finalmente con la mayor población de protozoarios el grupo control presentó una densidad de 106.17×10^3 especímenes/mL a esta hora de evaluación.

Al comparar los promedios de la densidad de protozoarios, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de planta proteica, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de planta proteica evaluada y grupo control; de esta manera al comparar la densidad de protozoarios dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 8 horas con 106.17×10^3 especímenes/mL; seguido por las densidades de protozoarios obtenidas a las 4 y 2 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 93.17 y 91.80×10^3 especímenes/mL respectivamente. Por otro lado, mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea*

saman las densidades de protozoarios difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de protozoarios a las 2 horas alcanzando un promedio de 63.07×10^3 especímenes/mL seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 53.50×10^3 especímenes/mL; mientras que el menor promedio se registró a las 8 horas con 33.27×10^3 especímenes/mL, lo cual indica un descenso en la población de protozoarios a medida que transcurre el tiempo. Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbbeck* se determinaron diferencias estadísticas: es así que a las 2 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 83.33×10^3 especímenes de protozoarios/mL seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 80.13×10^3 especímenes/mL mientras que el menor promedio se registró a las 8 horas con 71.77×10^3 especímenes/mL lo que indica un descenso en la población de protozoarios en el paso del tiempo de fermentación. Finalmente al incorporar de manera *in vitro* la planta proteica *tithonia diversifolia*, existe un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada, determinándose el mayor promedio de protozoarios a las 2 horas de evaluación con 72.20×10^3 especímenes/mL; posteriormente se ubicó el promedio de densidad de protozoarios a las 4 horas con 62.73×10^3 especímenes/mL; y con el menor promedio la densidad de protozoarios alcanzada a las 8 horas de evaluación con 52.83×10^3 especímenes/mL.

Conclusiones Y recomendaciones

Se determinó un efecto significativo en la reducción de la producción de gas total y gas metano *in vitro*, mediante la utilización de *Samanea saman*, *tithonia diversifolia* y *Albizia lebbbeck*.

La utilización de *Samanea saman* en la digestibilidad *in vitro* permitió dismi-

nuir la población de protozoos y bacterias metanogénicas con la consecuente proliferación de bacterias y hongos celulolíticos.

Por otro lado la producción de amoniaco disminuyó al incorporar plantas proteicas *in vitro* dentro del proceso de digestibilidad del pasto estrella en el transcurso del tiempo.

Por lo que se recomienda utilizar la planta proteica *Samanea saman* para la implementación de bancos de proteína para bovinos en el trópico, a fin de disminuir la contaminación ambiental por gas metano y amoniaco, con un excelente incremento de bacterias y hongos celulolíticos que permitirán aprovechar de mejor manera los nutrientes aportados por los pastos.

Referencias

- Galindo J. & Marrero Y. 2005. Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 39: 439 - 450.
- Galindo J. 1998. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje [Tesis de Doctorado]. La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal; 1998.
- Hungate RG. 1950. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. Rev. Bacterial 14 (1): 1-49.
- Johnson DE, Johnson KA, Ward GM, Branine ME. 2001. Ruminants and other animals, Chapter 8. En: Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment. Edit. M.A.K. Khalil. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1-112.
- Moss AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. Ann. zootech. 49: 231-253.
- Soliva CR, Meile L, Hindrichsen IK, Kreuser M, Machmuller A. 2004. Myristic acid supports the immediate inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. Anaerobe. 10 (5): 269 -276.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. Anim. Feed. Sci. Tech. 48(3-4): 185 -187.