

## Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal

Juana Galindo\*, Niurca González, Denia Delgado, Areadne Sosa, Yoandra Marrero, Rogelio González, Ana I. Aldana y Onidia Moreira

Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. \*Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto modulador de *Leucaena leucocephala* en la población de bacterias metanogénicas y otros grupos microbianos del rumen, se condujo un experimento bajo un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial (4 x 4, cuatro proporciones de leucaena y cuatro tiempos de fermentación) en condiciones *in vitro*. Los tratamientos consistieron en cuatro relaciones de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con leucaena, los cuales fueron: Tratamiento A=100:0, B=80:20, C=75:25 y D=70:30. Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0), a las 4, 8 y 12 h, después de iniciada la fermentación. Los conteos de bacterias metanogénicas fueron 40,22 38,42 13,98 y 12,46 x 10<sup>7</sup> ufc/mL para los tratamientos A, B, C y D, respectivamente. El modulador incrementó la población de bacterias celulolíticas en relación al tratamiento control sin suplementar y la mejor respuesta se encontró con las relaciones 80:20 y 70:30. Las poblaciones de hongos celulolíticos fueron 2,08 3,49 3,69 y 4,48 x 10<sup>5</sup> uft/mL para los tratamientos A, B, C y D, respectivamente. La población de protozoarios estuvo entre 1,50 a 2,75 x 10<sup>5</sup> células/mL bajo las condiciones experimentales desarrolladas. En todos los tratamientos con *L. leucocephala*, las poblaciones fueron significativamente más bajas, observándose la menor población para la relación 80:20. Se concluye que *Leucaena leucocephala* al 25% de la dieta es adecuada para reducir la población de bacterias metanogénicas ruminales sin comprometer la población total de bacterias celulolíticas.

**Palabras clave:** rumen, metanógenos bacterias celulolíticas, hongos, modulador

### Modulator effect of *Leucaena leucocephala* on the rumen microbiota

#### ABSTRACT

With the objective to evaluate the modulator effect of *Leucaena leucocephala* on the methanogenic bacteria and other microbial groups in the rumen was conducted a trial according to a completely randomized design in a factorial arrangement (4 x 4, four leucaena proportions and four times of fermentation), under *in vitro* conditions. The trial consisted of four star grass (*Cynodon nlemfuensis*) with leucaena ratios, which were: treatment A=100:0, B=80:20, C=75:25, and D=70:30. The sampling was performed before the incubation (0 hour), and at 4, 8, and 12 h of fermentation. The counts of methanogenic bacteria were 40.22, 38.42, 13.98, and 12.46 x 10<sup>7</sup> cfu/mL for the treatments A, B, C, and D, respectively. The modulator increased the population of cellulolytic bacteria, compared with the control without supplement, and the best response was found in the ratios 80:20 and 70:30. The populations of cellulolytic fungi were 2.08, 3.49, 3.69, and 4.48 x 10<sup>5</sup> tfu/mL for A, B, C, and D treatments, respectively. The protozoa population varied from 1.50 to 2.75 x 10<sup>5</sup> cell/mL, under the trial conditions. In all cases with *L. leucocephala* as modulator the populations were significantly small, but the smallest was found when the ratio 80:20 of star grass:modulator was used. It is concluded that the modulator from the fermentation with *L. leucocephala* is suitable for reducing the population of rumen methanogenic bacteria without affecting the total population of cellulolytic bacteria.

**Keywords:** rumen, methanogenic, cellulolytic bacteria, fungi, modulator.

## INTRODUCCIÓN

*Leucaena leucocephala* es una de las leguminosas más utilizadas en Cuba debido a su alto contenido en proteínas, minerales y vitaminas. Trabajos recientes desarrollados en el Instituto de Ciencia Animal destacan el contenido en polifenoles totales (5,84%) y taninos condensados totales (1,8 a 4%).

La inclusión de *L. leucocephala* en la dieta de los animales activa el crecimiento de los microorganismos celulolíticos del rumen, tanto bacterias como hongos. Los metabolitos secundarios presentes en esta especie actúan como agentes desfaunantes del órgano. Esto pudiera tener influencia en la ecología ruminal debido a que los metanógenos se adhieren directamente a los protozoos y cohabitan simbióticamente, lo que facilita la transferencia de H<sub>2</sub> entre especies

La producción de metano por los rumiantes tiene un impacto ambiental debido a que ese gas es uno de los que más contribuye al efecto invernadero al ser responsable del 18% de este fenómeno (Beauchemin y McGinn, 2005), además de representar una gran pérdida de la energía del alimento, lo que trae como consecuencia disminución en la productividad de estos animales

Por los aspectos anteriormente mencionados, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto modulador *in vitro* de la inclusión de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota del rumen

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tratamientos experimentales

Se evaluaron cuatro tratamientos según un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial (4 x 4, cuatro niveles de inclusión de leucaena y cuatro tiempos de fermentación *in vitro*). Los tratamientos experimentales se determinaron a partir de la inclusión de cuatro relaciones relaciones de pasto estrella (*Cynodon nlenfuensis*) con *Leucaena leucocephala*, como modulador, las cuales fueron: A) 100:0, B) 80:20, C) 75:25 y D) 70:30. La composición química del pasto estrella fue 7,26 74,57, 10,11, 0,42 y 0,18% de PB, FDN, ceniza, calcio y fósforo, respectivamente, mientras que leucaena obtuvo valores 26,45 47,37 12,01 1,45 y 0,30% de PB, FDN, ceniza, calcio y fósforo, respectivamente (AOAC, 1994).

### Procedimiento experimental

El experimento se condujo bajo condiciones *in vitro*, para lo cual se utilizó la técnica de Theodorou

*et al.* (1994), donde se emplearon botellas de 100 mL selladas para incubar las muestras de alimento en líquido ruminal y un medio buffer. El inoculo ruminal se obtuvo a partir de tres toros mestizos estabulados y canulados en rumen, alimentados con una dieta de forraje de pasto estrella, sin suplementación adicional y libre acceso al agua. Para conformar la mezcla a fermentar, se utilizó el pool de líquido ruminal de los tres toros con el propósito de eliminar el efecto animal.

Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0), a las 4, 8 y 12 h después de iniciada la fermentación. Se replicó cuatro veces en tiempo. Se utilizó la técnica de cultivo en tubos roll y bajo condiciones de anaerobiosis estricta. La siembra de bacterias viables totales, celulolíticas, metanogénicas y los hongos anaeróbicos se efectuaron en medios de cultivo selectivos (PNO 1-4). Se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40) en la fase gaseosa.

Los protozoos se contaron 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%. El análisis estadístico se realizó de acuerdo al diseño experimental empleado. Para comparar las medias se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan para P<0,05 en los casos necesarios.

## RESULTADOS

No se encontró interacción significativa entre las proporciones de *L. leucocephala* y las horas de fermentación *in vitro*. El empleo de la relación pasto estrella:modulador con leucaena (80:20) incrementó la población de bacterias viables totales. Los niveles de inclusión de 25 y 30% no modificaron este indicador (Cuadro 1).

En general, se encontró un incremento de los celulolíticos por efecto de la inclusión de *L. leucocephala* comparado con el tratamiento control obteniendo las mejores respuestas en las relaciones 80:20 y 70:30. No resulta clara la respuesta que se observó con la relación 75:25, que aún cuando fue superior al control, mantuvo valores intermedios entre los dos niveles mencionados con anterioridad (Cuadro 1). Por su parte, los hongos celulolíticos incrementaron su población cuando se incluyó el

modulador en todas las variantes empleadas, sin diferencias entre las mismas.

El nivel de inclusión de 20% del modulador (relación 80:20) no produjo modificaciones en la población de bacterias metanogénicas. Sin embargo, valores de inclusión de 25 y 30%, reducen de manera significativa el número total de metanógenos en el rumen. Los valores de las medias de bacterias metanogénicas fueron 40,22 38,42 13,98 y 12,46 x 10<sup>7</sup> ufc/mL para los tratamientos con 0, 20, 25 y 30% de inclusión del modulador, respectivamente

Las poblaciones de protozoos se encontraron entre 0,63 y 2,75 x 10<sup>5</sup> célula/mL a las 4 h de fermentación *in vitro*, bajo las condiciones experimentales desarrolladas. En todas las variantes en que se empleó el modulador con *L. leucocephala*, las poblaciones fueron significativamente más bajas; pero la menor población se encontró cuando se empleó la relación 80:20.

El tiempo de fermentación modificó la población de bacterias viables totales, celulolíticas y hongos anaerobios (Cuadro 2). Las bacterias viables totales incrementan su población a partir de las 4 h de fermentación, sin diferencias hasta las 8 h. Las celulolíticas, por su parte, se incrementan notablemente a las 8 h, mientras que los hongos siguen una tendencia similar, excepto que no se encontraron diferencias a las 4 h entre el tiempo antes de iniciar la fermentación (hora 0) y las 8 h.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible utilizar a *L. leucocephala* para formular productos moduladores de la fermentación ruminal capaces de reducir la población de metanógenos y modificar la presencia de otros grupos microbianos que habitan en ese complejo ecosistema. Es importante indicar que el empleo del modulador no compromete la microbiota responsable de fermentar la fibra, lo cual coincide con reportes de trabajos anteriormente

Cuadro 1. Efecto *in vitro* del nivel de incorporación de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal y pH. ufc: unidades formadoras de colonias, uft: unidades formadoras de talo.

Organismo	Relación gramínea:leucaena				EE
	100:0	80:20	75:25	70:30	
Bacterias viables totales, 10 <sup>12</sup> ufc/ mL	3,00bc†	3,75a	3,24b	2,93c	0,30
Bacterias celulolíticas, 10 <sup>7</sup> ufc/mL	1,96c	2,67a	2,52b	2,64a	0,16
Hongos celulolíticos, 10 <sup>5</sup> uft/mL	0,73b	1,25a	1,33a	1,50a	0,21
Bacterias metanogénicas, 10 <sup>7</sup> ufc/ mL	3,60a	3,51a	2,63b	2,52b	0,28
Protozoos, 10 <sup>5</sup> cél/mL	1,04c	0,47a	0,50ab	0,63ab	0,27
pH	7,01a	7,20bc	7,26bc	7,21bc	0,05

† Medias con letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05)

Cuadro 2. Efecto del tiempo de fermentación *in vitro* en la población de bacterias viables totales, celulolíticas y hongos anaerobios. ufc: unidades formadoras de colonias, uft: unidades formadoras de talo.

Organismo	0	4		8	EE
		h			
Bacterias viables totales, 10 <sup>12</sup> ufc/mL	2,96b	3,34a		3,27a	0,26
Bacterias celulolíticas, 10 <sup>7</sup> ufc/mL	2,21b	2,34b		2,77a	0,14
Hongos celulolíticos, 10 <sup>5</sup> uft/mL	0,74b	1,11ab		1,29a	0,18

† Medias con letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05)

realizados en Cuba por el colectivo de autores de la actual investigación, los que indicaron la existencia de interrelaciones entre las bacterias celulolíticas y las metanogénicas a nivel del rumen. Al respecto, Galindo *et al.* (2006) informaron que la fermentación completa de la celulosa hasta productos asimilables por los animales se efectúa por una población mixta integrada por microorganismos celulolíticos puros, especies microbianas que fermentan los glúcidos producidos por la hidrólisis de la celulosa, especies que degradan los compuestos como ácido succínico y ácido fórmico y bacterias metanogénicas. Estas utilizan el hidrógeno metabólico o el formiato para la producción de CH<sub>4</sub>.

La reducción en los metanógenos que propició el modulador con *L. leucocephala* pudiera colocar a los animales que lo consuman en un balance energético positivo, fundamentalmente, como resultado de menores pérdidas de energía por concepto de metano. Como indicaron Anderson *et al.* (2003) el metano no solamente es un contaminante ambiental sino que cualquier método que atenúe su producción en rumen tiene una repercusión en el metabolismo energético de los rumiantes.

La conversión anaeróbica de materia orgánica a CH<sub>4</sub> en el rumen involucra un consorcio de microorganismos donde los metanógenos intervienen en el paso final. Primeramente, las bacterias, hongos y protozoos hidrolizan las proteínas, polisacáridos y lípidos para producir aminoácidos y azúcares, y fermentan estos últimos a ácidos grasos de cadena corta, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El CH<sub>4</sub> se forma entonces por los metanógenos ruminales, usando H<sub>2</sub> (80%) y el formiato (18%) como sustratos (Demeyer y Fievez 2000).

Un aspecto de gran importancia y que constituye una hipótesis probable acerca de la reducción de la metanogénesis ruminal es la relación de los metanógenos con los protozoos del rumen, ya que los metanógenos que viven en el interior o adheridos a la superficie de los protozoos ciliados del rumen son responsables de más del 37% de las emisiones de metano. En ausencia de protozoos o cuando su población se deprime, las emisiones de metano del rumen se reducen alrededor de 13%. De ahí que el uso de plantas con poder defaunante es una vía real para disminuir los metanógenos, tal y como quedó demostrado.

## CONCLUSIONES

En esta investigación la inclusión de leucaena en fermentadores *in vitro* fue un agente modulador de la microbiota. Se redujo la población de protozoarios y de los organismos metanogénicos, mejorando la cantidad de los microorganismos digestores de celulosa sin que se afectara la cantidad total de bacterias presentes. De las experiencias *in vitro* se deduce que este efecto pudiera observarse *in vivo* en aquellos animales que reciban o pastoreen en bancos de leucaena.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo desean agradecer a la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el financiamiento de la presente investigación en el marco del Proyecto

## LITERATURA CITADA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1994. Official Methods of Analysis. 15<sup>ta</sup> ed. Washington, D.C.
- Anderson R.C., T.R. Callaway, J.A.S. Van Kessel, Y.S. Jung, T.S. Edrington y D.J. Nisbet. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Biores. Technol.*, 90: 59-66.
- Beauchemin K.A. y S.M. McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.*, 83: 653-560.
- Demeyer D.L. y V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. *Ann. Zootech.*, 49: 95-102.
- Galindo J., Y. Marrero, N. González y A. Sosa. 2006. Empleo de aditivos como activadores de la fermentación microbiana y controladores de desórdenes metabólicos ruminales. Mesa redonda. Memorias Congreso Intern. Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba.
- Theodorou M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan y J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 48: 185-192.