



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**"EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA
POBLACIÓN MICROBIAL DE METANÓGENOS Y
METANOGÉNESIS RUMINAL *IN VITRO*"**

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR

DANIEL ALEJANDRO ZABALA MONTESDEOCA

Riobamba-Ecuador

2010

Esta Tesis fue aprobada por el siguiente Tribunal

Dr. Luis Rafael Fiallos Ortega. Ph.D.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.Cs. Byron Leoncio Díaz Monroy.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. M.Cs. Sonia Elisa Peñafiel Acosta.

ASESOR DE TESIS

Riobamba, 12 de enero del 2010

AGRADECIMIENTO

A mi madre, por el apoyo incondicional y espiritual y a toda mi familia que puso un granito de arena para este logro. A Karla que con paciencia y cariño colaboro en la realización de este trabajo.

Al Instituto de Ciencia Animal (ICA), de la Republica de Cuba, por haberme permitido formarme en sus aulas como un profesional de la rama agropecuaria.

A los miembros del tribunal de tesis Ing. Byron Díaz M, Director de Tesis; a la Dra. Sonia Peñafiel, Asesor; y de manera muy especial a mi Tutora de tesis en el ICA la Dra. Juana Galindo, quienes pusieron todo su aval profesional para el cumplimiento del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación, y todo mi esfuerzo profesional dedico a DIOS, que ha sido mi ayuda en los momentos más difíciles, a mi MADRE por su abnegada dedicación y ayuda para llegar a cumplir mi sueño.

A mis tíos César y Jorge quienes con sus consejos y ayuda, me dieron las fuerzas para llegar a este triunfo profesional.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
A. FORMACIÓN DE METANO EN EL RUMEN	3
B. ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN EL CONTROL DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL EN EL TRÓPICO	8
C. PLANTAS PROTEICAS UTILIZADAS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES	10
1. <u>Leucaena leucocephala</u>	10
2. <u>Gliricidia sepium</u>	11
3. <u>Azadirachta indica</u>	12
4. <u>Albizia lebbeck</u>	13
5. <u>Moringa oleífera</u>	14
6. <u>Samanea saman</u>	14
7. <u>Pithecellobium dulce</u>	15
8. <u>Cordia alba</u>	16
9. <u>Enterolobium cyclocarpum</u>	17
10. <u>Guazuma ulmifolia</u>	17
11. <u>Tithonia diversifolia</u>	18
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	21
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	21
1. <u>Primer experimento</u>	21
2. <u>Segundo experimento</u>	22
3. <u>Experimento de validación</u>	22
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	22
1. <u>Materiales</u>	22
2. <u>Equipos</u>	23

3. <u>Instalaciones</u>	23
4. <u>Reactivos</u>	23
D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	24
1. <u>Primer experimento</u>	24
2. <u>Segundo experimento</u>	26
3. <u>Experimento de validación</u>	27
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	27
1. <u>Primer experimento</u>	27
2. <u>Segundo experimento</u>	27
a. Microbiológicas y fermentativas	27
b. Análisis bromatológicos	27
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	27
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	28
1. <u>Primer experimento</u>	28
a. Preparación de la muestra de alimento base	29
b. Colecta de las plantas proteicas y preparación para el estudio	29
2. <u>Segundo experimento</u>	30
3. <u>Experimento de validación</u>	30
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	31
A. EVALUACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PLANTAS PROTÉICAS UTILIZADAS PARA LA REDUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DE METANÓGENOS RUMINALES IN VITRO	31
1. <u>Composición bromatológica</u>	31
2. <u>Tamizaje fitoquímico</u>	33
B. EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA METANOGENESIS RUMINAL IN VITRO	36
1. <u>Producción de gas in vitro</u>	36
2. <u>Producción de metano</u>	38
C. EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA POBLACIÓN DE METANÓGENOS RUMINALES IN VITRO	40
1. <u>Bacterias viables totales</u>	40
2. <u>Bacterias celulolíticas</u>	43
3. <u>Bacterias metanogénicas</u>	49

4. <u>Hongos celulolíticos</u>	54
5. <u>Protozoarios</u>	58
6. <u>pH</u>	64
7. <u>Producción de Amoníaco</u>	65
D. COSTOS DE LA INCORPORACION DE PLANTAS PROTEICAS EN LA PRODUCCION DE BOVINOS	68
V. <u>CONCLUSIONES</u>	70
VI. <u>RECOMENDACIONES</u>	71
VII. <u>LITERATURA CITADA</u>	72
ANEXOS	

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 lebbbeck*, 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 Viables Totales de 34.22×10^{11} UFC/ml, la densidad 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 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 amoníaco, con un excelente incremento de bacterias y hongos celulolíticos que permitirán aprovechar de mejor manera los nutrientes aportados por los pastos.

ABSTRACT

At the Biophysiological Sciences Department of the Animal Science Institute (ICA), Municipality San José de las Lajas, La Habana Province – Cuba, from September 2008 to January 2009, the evaluation of proteic plants and their effect in the microbial population of metanogens and ruminal metanogénesis in vitro was carried out, determining as the best proteic plants the *Samanea saman*, *Tithonia diversifolia* and *Albizia lebbbeck* which recorded lower methane gas productions with values of 4.31, 5.70 and 9.18 μl respectively; of these plants those which presented the best results in the microbial ecology was *Samanea saman* recording a population of Total Viable Bacteria of 34.22×10^{11} UFC/ml, the Bacteria and Cellulolytic Fungi density was 32.33×10^5 UFC/ml and 15.00×10^4 UPC/ml at 8 hours fermentation respectively; while the Metanogenic Bacteria recorded a population of 11.33×10^{11} UFC/ml at the same evaluation hour. It is therefore recommended to use the proteic *Samanea saman* plant to implement protein banks for bovines in tropical areas to diminish the environmental pollution by methane gas and ammonium with an excellent bacteria and cellulolytic fungi increment permitting to take advantage in the best way of the way of the nutrients contributed by pastures.

LISTA DE CUADROS

No.		Pág.
1.	BACTERIAS METANOGÉNICAS AISLADAS DEL RUMEN.	7
2.	CONDICIONES METEOROLOGICAS.	21
3.	ESQUEMA DEL PRIMER EXPERIMENTO.	25
4.	ESQUEMA DEL SEGUNDO EXPERIMENTO	26
5.	ADEVA PARA EL PRIMER EXPERIMENTO.	28
6.	ADEVA PARA EL SEGUNDO EXPERIMENTO.	28
7.	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PLANTAS PROTEICAS EVALUADAS.	32
8.	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE ALGUNAS DE LAS PLANTAS EVALUADAS.	34
9.	PRODUCCIÓN DE GASES EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL "IN VITRO".	37
10.	PRODUCCIÓN DE GASES DE ACUERDO AL TIEMPO DE FERMENTACIÓN "IN VITRO".	37
11.	DENSIDAD DE BACTERIAS VIABLES TOTALES EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL "IN VITRO".	41
12.	DENSIDAD DE BACTERIAS VIABLES TOTALES DE ACUERDO AL TIEMPO DE FERMENTACIÓN "IN VITRO".	43
13.	VALIDACIÓN DEL EFECTO DE LA PLANTA PROTEICA <i>Samanea saman</i> EN LA POBLACIÓN MICROBIAL DE METANÓGENOS Y METANOGÉNESIS RUMINAL <i>IN VITRO</i> .	43
14.	COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES MICROBIOLÓGICOS Y FERMENTATIVOS, EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL "IN VITRO", DE ACUERDO AL TIPO DE PLANTAS Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN.	45
15.	COSTO DE ESTABLECIMIENTO DE BANCO DE PROTEINA PARA LA SUPLEMENTACIÓN DE BOVINOS.	69

LISTA DE GRÁFICOS

No.		Pág.
1.	Flujo de carbono a metano y dióxido de carbono en el rumen.	4
2.	Producción de gas Total y gas Metano en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> ".	39
3.	Densidad de Bacterias Viables Totales en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> ".	42
4.	Densidad de Bacterias Celulolíticas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> ".	47
5.	Comportamiento de la densidad de Bacterias Celulolíticas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> " de acuerdo al tiempo de fermentación.	48
6.	Densidad de Bacterias Metanogénicas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> ".	52
7.	Comportamiento de la densidad de Bacterias Metanogénicas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> " de acuerdo al tiempo de fermentación.	53
8.	Densidad de Hongos Celulolíticos en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> ".	55
9.	Comportamiento de la densidad de Hongos Celulolíticos en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> " de acuerdo al tiempo de fermentación.	56
10.	Densidad de Protozoarios en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> ".	61
11.	Comportamiento de la densidad de Protozoarios en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> " de acuerdo al tiempo de fermentación.	62
12.	Producción de amoniaco en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal " <i>in vitro</i> " de acuerdo al tiempo de fermentación.	67

LISTA DE ANEXOS

No.

1. Análisis de varianza de la producción de gases en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal "*in vitro*".
2. Análisis de varianza de los indicadores microbiológicos y fermentativos dentro de la evaluación de plantas proteicas sobre la población de metanógenos ruminales "*in vitro*".

I. INTRODUCCIÓN

La producción de rumiantes aporta con diferentes productos que constituyen fuentes de proteína animal destinada a la alimentación humana, lo que ha permitido su desarrollo dentro de la rama agropecuaria considerando además que son capaces de digerir alimentos fibrosos, razón por la cual no compiten con monogástricos incluyendo el hombre, característica relacionada a las particularidades del sistema digestivo que le permiten una relación simbiótica con una de las comunidades microbianas más densas y activas de la naturaleza. 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 (Galindo, J y Marrero, Y. 2005).

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 incrementan el valor nutritivo de la dieta que consumen los animales debido a su mayor contenido en proteínas, vitaminas y minerales, así como metabolitos secundarios, específicamente polifenoles totales, taninos y saponinas que ejercen efectos defaunantes del rumen especialmente de protozoos lo que consecuentemente provoca la eliminación de bacterias metanógenas del rumen.

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 (CH₄), es un potente GEI, ya que su potencial de absorción de la radiación es aproximadamente 21 veces superior al del CO₂ (Moss, A. et al. 2000), si bien su concentración con respecto al CO₂ es muy baja, su contribución al efecto invernadero es importante, por lo que la disminución de su emisión puede ocasionar ventajas ecológicas considerables. Las emisiones de metano procedentes del tracto gastrointestinal de los animales domésticos se consideran como una fuente antropogénica y representa alrededor del 70% de las emisiones totales de este gas a la atmósfera. El CH₄ entérico que

emiten los rumiantes no sólo constituye un problema ecológico, sino que también ocasiona una pérdida considerable de la energía del alimento (Soliva, C. et al. 2004), y como consecuencia disminuye la productividad de estos animales, ya que alrededor del 2 al 12% de la energía bruta de los alimentos consumidos por los animales, se pierde en forma de metano (Johnson, D. y Johnson, K. 2001).

Numerosas investigaciones encaminadas a estudiar el proceso de formación de metano en el rumen y los factores que intervienen, han coincidido en que el nivel de alimentación, las características físico – químicas de la dieta, los tipos de alimentos y su digestibilidad, así como la presencia de protozoos influyen en la cantidad de metano que se produce. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones son muy costosas para las condiciones de explotación de la ganadería comercial, siendo una alternativa viable la suplementación de los animales con follaje de árboles que presentan determinados metabolitos secundarios capaces de reducir la población de protozoos. De estudios precedentes se conoce que los metanógenos viven de manera endosimbiótica con los protozoos del rumen, es así que cualquier práctica que reduzca su población, consecuentemente permitirá reducir los metanógenos y producción de metano en el rumen, por lo que en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la composición química de plantas proteicas, con capacidad antiprotozoarica en el rumen.
- Evaluar el efecto microbiológico y fermentativo de diferentes plantas proteicas sobre la producción de gas y en la metanogénesis ruminal in vitro.
- Establecer los costos de la utilización de plantas proteicas, en los sistemas de ganadería comercial.
- Validar la tecnología en dos países de diferente condición ecológica (Cuba – Ecuador).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. FORMACIÓN DE METANO EN EL RUMEN

La formación de metano en el rumen es una consecuencia inevitable de la fermentación de los carbohidratos por los microorganismos que allí habitan. La metanogénesis en el rumen se distingue de la de otros hábitats, debido a ciertas particularidades determinadas por las características fisiológicas de este órgano (Zinder, S. 1992). Este proceso es resultado de las interacciones microbianas que allí se establecen debido a que las bacterias metanogénicas utilizan, para la formación de metano, los productos finales de la fermentación de otro grupo de microorganismos ruminales (Demeyer, D. y Fievez, V. 2000).

La principal vía de excreción del metano producido en el rumen es la eructación, mientras que el metano producido en las partes bajas del tracto digestivo se expulsa a través de los pulmones y del recto. Para lograr reducir la producción de metano en el rumen es necesario tener un conocimiento profundo acerca de las vías de su producción así como de los microorganismos y factores que intervienen en este proceso. Ello permitirá diseñar estrategias que conduzcan a cumplir con éste propósito. La metanogénesis es un componente importante del ciclo del carbono en la naturaleza y es un proceso que en la actualidad se encuentra bajo numerosas y profundas investigaciones. El mecanismo exacto no está bien determinado, pero si está claro que es una ruta metabólica única, donde ocurre una reducción de grupos metilo a metano (Dawson, K. et al. 1990).

Todos los metanógenos comparten estas reacciones bioquímicas, aunque los electrones para el paso reductivo se obtienen por la oxidación de H₂, formiato, metanol, metilaminas o acetato, en dependencia del sustrato y las especies bacterianas que se involucran en el proceso (Machmüller, A. y Kreuzer, M. 1999).

La principal diferencia entre la producción de metano en el rumen y otros sistemas anaerobios es que los rumiantes degluten suficiente saliva y agua, de forma tal, que el tiempo de retención es menor de un día. Este corto tiempo de retención no permite el crecimiento de organismos consumidores de ácido de crecimiento lento: acetógenos productores de H₂ (oxidán sustratos como etanol, butirato o

propionato y disponen de electrones por reducción de H^+ a H_2), y metanógenos acetotróficos (metanógenos capaces de descarboxilar acetato a CH_4 y CO_2). Por tanto, los ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato, no se utilizan como sustrato para la metanogénesis ruminal (Zinder, S. 1992). (Gráfico 1). Estos compuestos son absorbidos como nutrientes por el animal.

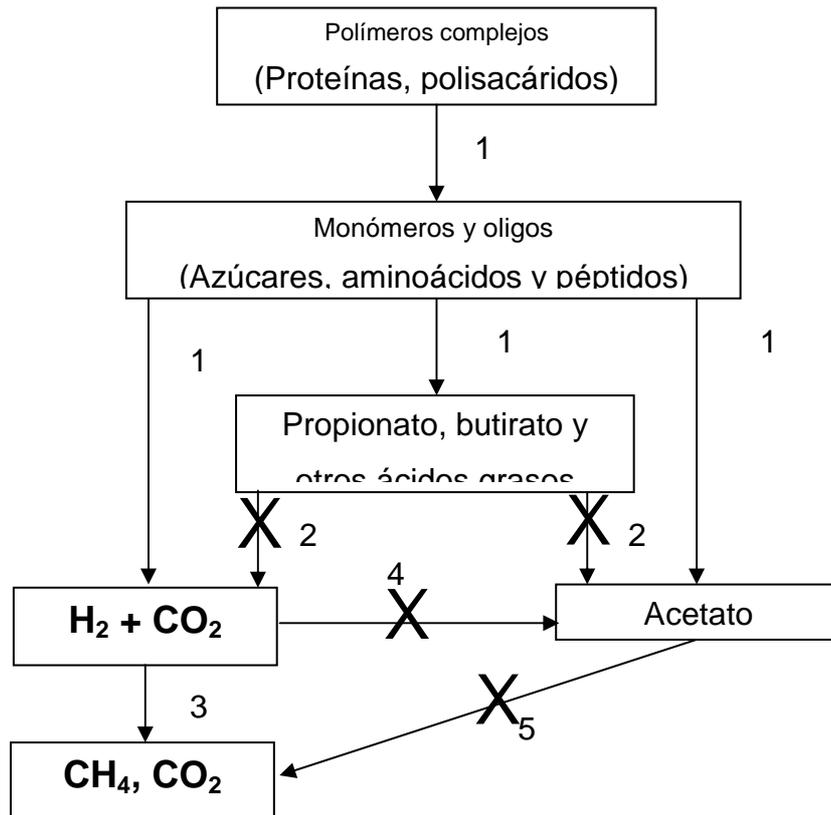


Gráfico 1. Flujo de carbono a metano y dióxido de carbono en el rumen.

Grupos microbianos involucrados: (1) anaerobios fermentativos, (2) acetógenos productores de H_2 , (3) metanógenos consumidores de H_2 , (4) acetógenos consumidores de H_2 y (5) metanógenos acetotróficos. X: Ruta Bloqueada.

Como consecuencia de lo anterior, en el rumen, la mayoría del metano se sintetiza a partir de H_2 y CO_2 . Otros sustratos potenciales pueden ser el formiato, metilaminas y metanol resultante de la demetilación de polímeros de plantas (Zinder, S. 1992).

La conversión anaeróbica de materia orgánica a CH_4 , 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_2 y CO_2 . El CH_4 se forma entonces por los metanógenos ruminales, usando H_2 (80%), y el formiato (18%), como sustratos. (Bryant, M. 1999).

De acuerdo con la estequiometría de la fermentación ruminal es posible calcular las producciones de metano, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y ATP que se obtienen con diferentes raciones. Por cada mol de hexosa que se fermenta se producen 0,58 moles de metano (para el almidón y la celulosa pueden ser 162 g en peso seco), (Carro, M. et al. 2006).

La producción de metano en el rumen tiene un efecto significativo en los productos finales de la fermentación. Las bajas presiones parciales de hidrógeno creadas por los metanógenos causan un cambio termodinámico en la producción de este elemento por los microorganismos fermentativos en un proceso de transferencia interespecífica de hidrógeno lo que resulta en la producción de H_2 y acetato como principales intermediarios del consorcio (Bryant, M. 1999).

Cuando las concentraciones de hidrógeno se incrementan producto de un acortamiento en el tiempo de retención (incrementando la tasa de dilución), o sobrecargando el sistema con materia orgánica de fácil degradación, los electrones del NADH generados en la fermentación se utilizan en el catabolismo del piruvato a productos reducidos especialmente propionato más que acetato, CO_2 y H_2 . Se incrementan también el ácido butírico, el valérico y el caproico, y en casos más extremos, se puede ver una formación significativa de otros productos reducidos como etanol y lactato.

En un sistema metanogénico que opera eficientemente, en el cual las presiones parciales de H_2 se mantienen a muy bajos niveles, la mayoría de los carbohidratos se fermentan vía formación de acetato, CO_2 y H_2 y sin mayores producciones de otros ácidos grasos (Wallace, R. y Newbold, C. 1993). Un ejemplo de los anterior lo constituye la influencia de los metanógenos en la fermentación de la celulosa por *Ruminococcus albus*. Esta bacteria produce etanol, acetato, H_2 , CO_2 y en ocasiones formiato, en cultivo puro; sin embargo, en el rumen al crecer junto a

metanógenos que utilizan rápidamente el H₂, no se produce etanol (Wallace, R. y Newbold, C. 1993).

Las bacterias metanogénicas son organismos anaeróbicos estrictos, y requieren condiciones libres de oxígeno y un potencial redox menor que -330mM . La mayoría tiene tiempos de duplicación que van desde varias horas a varios días. Todos estos factores imposibilitaron el estudio de los metanógenos en cultivos puros hasta mediados de la década del 70, cuando el desarrollo de técnicas anaeróbicas perfeccionadas y cámaras de anaerobiosis seguras, facilitaron el crecimiento, aislamiento y manipulación de las bacterias metanogénicas.

Estos microorganismos se encuentran a pH moderados, con un óptimo entre 6 y 8. El rango de temperatura para este grupo es amplio, con un óptimo de 35 a 40°C para las especies mesófilas y 60°C para las termófilas. Actualmente estas bacterias se mantienen, en condiciones adecuadas, en varios laboratorios del mundo y se utilizan en las investigaciones sobre sus procesos metabólicos.

Muestran diversidad en cuanto a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. En ellas están representadas todas las formas y morfologías básicas como cocos, bacilos y espirilos, tanto en formas individuales o agrupadas como el caso de las sarcinas (McAllister, T. et al. 1996).

Aunque en los diferentes hábitats anaeróbicos, se han identificado alrededor de 70 especies de microorganismos metanogénicos pertenecientes a 21 géneros, solo 7 especies han sido aisladas del rumen. Cuadro1. (McAllister, T. et al. 1996).

Cuadro 1. BACTERIAS METANOGÉNICAS AISLADAS DEL RUMEN.

Especies	Referencia
<i>Methanobacterium formicicum</i>	Oppermann et al. 1957, Jarvis et al. 2000
<i>Methanobacterium bryantii</i>	Evans y Joblin citados por Joblin 2004
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	Lovley et al. 1984, Miller et al. 1986 y Smith y Hungate 1958
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Joblin y Pacheco, citados por Joblin 2004
<i>Methanomicrobium mobile</i>	Paynter y Hungate 1968 y Jarvis et al. 2000
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Beijer 1952 y Patterson, Hespell 1979 y Jarvis et al. 2000
<i>Methanoculleus olentangyi</i>	Joblin et al. citados por Joblin 2004

Fuente: McAllister, T. et al, (1996).

Los metanógenos son capaces de establecer una relación mutualista con los protozoos anaerobios que habitan en el rumen, muchos de estos últimos producen H₂ como producto final del metabolismo y contienen organelos llamados hidrogenosomas, los cuales convierten el piruvato a acetil CoA, CO₂ y H₂. Esta simbiosis se descubrió mediante microscopía de fluorescencia (Zinder, S. 1992).

Muchos metanógenos contienen altas cantidades del transportador de electrones fluorescente, cofactor F₄₂₀, que causa la fluorescencia azul verdosa de las células cuando se iluminan con luz cercana a los 420 nm, al observarse bajo un microscopio epifluorescente. Las bacterias azul-verdosas fluorescentes, es decir metanógenos, pueden aparecer adheridos a la superficie de los protozoos del rumen o en su interior como endosimbionte. En algunos casos, el endosimbionte metanógeno ha sido aislado del protozoario, confirmándose su identidad (Zinder, S. 1992). Se cree que la interacción entre los protozoos y los metanógenos se parece a la transferencia de electrones inter-especie, ya que permite al protozoario disponer de sus electrones como H₂ (Zinder, S. 1992). 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 las emisiones de metano del rumen se

reducen alrededor de un 13%, esto varía con la dieta (Johnson, D. y Johnson, K. 1995).

De estas aseveraciones se deduce que el empleo de agentes anti protozoarios es un factor que reduce la población de metanógenos, la metanogénesis ruminal y, consecuentemente, las emisiones de este gas a la atmósfera. Se han evaluado diferentes productos químicos con el propósito de reducir la población de protozoos en el rumen. Sin embargo, el uso de plantas con poder defaunante es la vía más económica para las condiciones de Cuba (Galindo, J. y Marrero, Y. 2005).

B. ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN EL CONTROL DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL EN EL TRÓPICO

Para lograr este propósito se han desarrollado mundialmente, numerosas estrategias que permiten reducir la metanogénesis ruminal mediante métodos químicos y biotecnológicos (Mc Allister, T. et al. 1996).

Se conoce que muchos agentes químicos son capaces de inhibir la producción de metano. Varios autores han probado la adición de compuestos halogenados homólogos del metano, y han resultado efectivos. Entre estos compuestos se encuentran el hidrato de cloral (1-4 g/d/carnero), los derivados de ácido 2,4-bis (triclorometil), benzol [1,3] dioxin-6-carboxílicos, los que se han reportado como potentes inhibidores de metano (Davwson, K. et al. 1990). Otro inhibidor muy específico es el ácido 2-bromoetanosulfónico (BES), un sustituto de la coenzima F₄₂₀ (Miller-Wester, T. et al. 2002).

En la década del noventa se encontró un nuevo compuesto, un complejo de bromo-clorometano y α -ciclodextrina, que inhibía la producción de metano en el rumen significativamente. Algunos de estos productos han sido empleados en animales en producción (Harrison, G. et al. 1998).

Los compuestos halogenados y otros como sulfitos, nitratos y ácidos grasos de cadena larga tienen un efecto tóxico directo en las bacterias metanogénicas. Cuando el inhibidor de metano tiene un efecto tóxico en la población de bacterias

metanogénicas, el hidrógeno que se acumula en el rumen disminuye la tasa de fermentación, especialmente la degradación de la pared celular de la planta, las proteínas, así como se inhibe parcialmente la síntesis de proteína microbiana (Galindo, J. 1998).

Otras sustancias muy utilizadas en los últimos años, en la inhibición de la metanogénesis, son los antibióticos ionóforos (Beauchemin, K. y McGinn, S. 2006). Estos compuestos incrementan, significativamente, la producción de propionato (+ 25% de la proporción molar de propionato), a expensas de la producción de acetato y butirato y disminuyen la liberación de hidrógeno de ciertos compuestos como el formiato. En correlación, disminuyen la producción de metano. Dentro de los ionóforos se han puesto en práctica especialmente el monensín y el lasalocid. El primero es un antibiótico poliéter carboxílico producido por *Streptomyces cinnamonesis*. Además de incrementar la proporción molar de propionato en el rumen, este compuesto, es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias metanogénicas (Demeyer, D. y Fievez, V. 2000). Las investigaciones desarrolladas en este campo confirman que los ácidos grasos libres, particularmente los insaturados de cadena larga, inhiben la metanogénesis.

No obstante, éstas investigaciones se encuentran en progreso a nivel mundial y los resultados que se han obtenido hasta el presente son contradictorios ya que el empleo de ácidos grasos saturados puede ser capaz de ejercer similar efecto, entonces cabe hacer la siguiente pregunta: ¿Son las fuentes de ácidos grasos saturados o las de insaturados capaces de ejercer efecto reductor de la metanogénesis ruminal? (Glover, N.1997).

Es evidente que métodos sencillos, como son, la suplementación con leguminosas, pueden ser capaces de producir resultados alentadores. Las leguminosas constituyen una fuente valiosa de proteínas, ricas en aminoácidos, minerales y vitaminas, las que son altamente requeridas por los microorganismos celulolíticos para su crecimiento y actividad enzimática (Carmona, J. et al. 2005).

C. PLANTAS PROTEICAS UTILIZADAS EN LA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

1. Leucaena leucocephala

Forma. Árbol o arbusto caducifolio o perennifolio, de 3 a 6 m (hasta 12 m), de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm (Yantasath, K. et al. 1995).

Copa / Hojas. Copa redondeada, ligeramente abierta y rala. Hojas alternas, bipinnadas, de 9 a 25 cm de largo, verde grisáceas; folíolos 11 a 24 pares, de 8 a 15 mm de largo, elípticos y algo oblicuos (Yantasath, K. et al. 1995).

Tronco / Ramas. Tronco usualmente torcido y se bifurca a diferentes alturas. Ramas cilíndricas ascendentes. Desarrolla muchas ramas finas cuando crece aislado (Yantasath, K. et al. 1995).

Corteza. Externa lisa a ligeramente fisurada, grisnegrucza, con abundantes lenticelas longitudinales protuberantes. Interna de color crema-amarillento, fibroso, amarga, con olor a ajo. Grosor total: 3 a 4 mm (Yantasath, K. et al. 1995).

Flor(es). Cabezuelas, con 100 a 180 flores blancas, de 1.2 a 2.5 cm de diámetro; flor de 4.1 a 5.3 mm de largo; pétalos libres; cáliz de 2.3 a 3.1 mm. (Yantasath, K. et al. 1995).

Fruto(s). Vainas oblongas, estipitadas, en capítulos florales de 30 o más vainas, de 11 a 25 cm de largo por 1.2 a 2.3 cm de ancho, verdes cuando tiernas y cafés cuando maduras; conteniendo de 15 a 30 semillas. (Yantasath, K. et al. 1995).

Semilla(s). Semillas ligeramente elípticas de 0.5 a 1 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho, aplanadas, color café brillante, dispuestas transversalmente en la vaina. La semilla está cubierta por una cera que retarda la absorción de agua durante la germinación. (Yantasath, K. et al. 1995).

Raíz. Profunda y extendida. La raíz primaria penetra en las capas profundas del suelo y aprovecha el agua y los minerales por debajo de la zona a la que llegan las raíces de muchas plantas agrícolas. (Yantasath, K. et al. 1995).

Hábitat. Prospera en ambientes adversos. Se adapta muy bien a las tierras bajas, crece desde sitios secos con 350 mm/año hasta húmedos con 2,300 mm/año y temperatura media anual de 22 a 30 °C. Es necesario un período seco de 4 a 6 meses. Crece en una amplia variedad de suelos, desde neutros, hasta alcalinos, siempre y cuando sean suelos bien drenados, no compactados ni ácidos. Los mejores resultados se obtienen en suelos con pH de 6.5 a 7.5. Suelos inferiores a 5.5 pH no son recomendables. (Yantasath, K. et al. 1995).

2. Gliricidia sepium

Conocido comúnmente como gliricidia, madre de cacao, mata-ratón, madero negro y mother of cocoa (en inglés), es un árbol caducifolio de tamaño pequeño o mediano y sin espinas, con un tronco corto y una copa esparcida e irregular.

Copa / Hojas. Copa irregular. Amplia cobertura del follaje. Hojas compuestas, alternas, e imparipinnadas. Miden de 12 a 30 cm de largo (incluyendo el pecíolo). Compuestas por 7 a 25 folíolos opuestos de 3 a 8 cm de largo por 2 a 4 cm de ancho, ovados a elípticos, con el margen entero (Glover, N. 1997).

Tronco / Ramas. Tronco un poco torcido. Ramas ascendentes y luego horizontales. La forma del árbol es variable, desde erecta y recta en algunas procedencias, hasta retorcida y muy ramificada, con tallos múltiples originados cerca de la base (Glover, N. 1997).

Corteza. *Externa* es escamosa a ligeramente fisurada, pardo amarillenta a pardo grisácea y la interna es de color crema amarillenta, fibrosa, con olor y sabor a rábano. Grosor total es de 8 a 10 mm (Glover, N. 1997).

Flor(es). Las flores son rosadas y se agrupan en racimos densos de 10 a 20 cm de largo, situados en las axilas de las hojas caídas. Cada racimo tiene de 15 a 50 flores zigomorfas, de 2 a 3 cm de largo, dulcemente perfumadas. Corola en forma de mariposa. (Glover, N. 1997).

Semilla(s). Las semillas son pardo-amarillentas, de 7.9 a 18 mm de largo por 12 a 15 mm de ancho, casi redondas, aplanadas, de superficie lisa. El hilo es relativamente uniforme, con temperaturas de 20 a 30 °C, precipitaciones anuales

de 500 a 2.300 mm y 5 meses de período seco. Crece igualmente en suelos derivados de material calcáreo, ígneo o volcánico (Glover, N. 1997).

Tolera una gran variedad de suelos, menos aquellos que tengan deficiencias serias de drenaje interno. Se adapta tanto a suelos húmedos como a secos. Se desarrolla en una gran variedad de suelos que van desde arenas puras, regosoles pedregosos no estratificados, hasta vertisoles negros profundos en su rango natural y ha sido cultivado en suelos desde arcillosos hasta franco-arenosos (Glover, N. 1997).

3. Azadirachta indica

Árbol siempre verde de 8 - 12 m de altura, de copa densa y tronco corto y robusto, con la corteza castaño rojiza o grisácea, fisurada y exfoliándose con la edad. Hojas pinnadas, de 15-35 cm de longitud, con 3 - 9 pares de folíolos opuestos o casi opuestos, de ovado-lanceolados a lanceolados, falcados, de 5 - 9 x 1,5 - 3,5 cm, con la base asimétrica, el margen aserrado y el ápice largamente acuminado. Inflorescencias paniculiformes, axilares, con brácteas y bractéolas lanceoladas, más o menos pubescentes. Flores pequeñas, blancas, fragantes, sobre pedicelos de unos 2 mm de largo. Cáliz diminuto, con 5 lóbulos, pubescente, ciliado en el margen; corola con 5 pétalos libres, linear-espátulados, de 4-6 mm de largo, pubescentes. Tubo estaminal cilíndrico, terminado en 10 apéndices laciniados o redondeados; anteras estrechamente elípticas, ligeramente exsertas. Disco anular, fusionado a la base del ovario. Ovario trilobular, con 2 rudimentos seminales en cada lóculo; estilo terminado en 3 lóbulos estigmáticos. Drupa elipsoide, de 1,5-1,8 cm de largo, amarillenta, conteniendo 1-2 semillas (Pennington, T. 1998).

Se multiplica por semillas, que deben limpiarse y no almacenarse demasiado tiempo, pues desciende el porcentaje de germinación. También puede multiplicarse por esquejes. No soporta el frío ni las heladas. Muy resistente a las sequías una vez está bien establecido. Requiere suelos mejor profundos, arenosos, que drenen bien, con pH de 6 a 8. Su madera es parecida a la caoba, de buena calidad y duradera, utilizándose con los mismos fines. La corteza se emplea en medicina popular local como febrífugo, y de ella se obtienen taninos,

fibras y resinas. Sus hojas se emplean como forraje para el ganado y de ellas se obtiene una sustancia empleada para la fabricación de insecticidas naturales. De sus semillas se obtiene un aceite con múltiples usos (Pennington, T. 1998).

4. Albizia lebeck

Forma. Arbol robusto, caducifolio, de 6 a 12 m (hasta 30 m), de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 45 cm (hasta 1 m). (Mendieta, R. 1998).

Copa / Hojas. Copa redonda, extendida en forma de paraguas, es muy grande y amplia cuando está en sitios abiertos; en bosques cerrados o en plantaciones es alta y estrecha. Hojas alternas, bipinnadas de 15 a 40 cm de largo, con 2 a 4 pares de pinnas laterales y 4 a 9 pares de folíolos oblongos, margen liso; haz verde mate, envés verde claro, follaje de aspecto plumoso (Mendieta, R. 1998).

Tronco / Ramas. En la madurez las ramas se inclinan hacia abajo y el tronco se vuelve macizo y sólido (Mendieta, R. 1998).

Corteza. *Externa* de color gris más o menos lisa, después se agrieta y se pone áspera. *Interna* es de color rosado y de sabor amargo (Mendieta, R. 1998).

Flor(es). Racimos florales (umbelas o cabezuelas), con muchas flores extendidas, color crema y muy fragantes. Los racimos son solitarios o en grupos de 2 a 4. La flor mide de 3 a 4 cm de largo; corola blanca, angosta, tubular; cáliz tubular y veloso (Mendieta, R. 1998).

Fruto(s). Vaina plana, ancha, con puntas cortas en ambos extremos, de color pajizo, de 10 a 20 cm de largo por 2.5 a 4 cm de ancho, con una hilera de varias semillas, abultada y deprimida en cada semilla (Mendieta, R. 1998).

Semilla(s). Semillas oblongas, achatadas, color castaño, de 1 cm de largo.

Raíz. Desarrolla un buen sistema radical superficial y extendido, logra romper el suelo endurecido y provee de canales para drenar y airear (Mendieta, R. 1998).

5. Moringa oleífera

Conocido comúnmente como reseda, árbol de rábano (horseradish tree), árbol de bequeta (drumstick tree), árbol de los espárragos, árbol de las perlas, árbol "ben" y por varios otros nombres, es un árbol siempre verde o decíduo de tamaño pequeño y crecimiento acelerado que usualmente alcanza de 10 a 12 m de alto. Tiene una copa abierta y esparcida de ramas inclinadas y frágiles, un follaje plumoso de hojas pinadas en tres, y una corteza gruesa, blanquecina y de aspecto corchozo. Se valora principalmente por sus frutas, hojas, flores, raíces, todas comestibles, y por el aceite (también comestible), obtenido de las semillas. Se usa extensamente en la medicina tradicional en las áreas en donde es nativo y en donde ha sido introducido (Eilert, U. et al. 2000).

El reseda es nativo al sur de Asia, en donde crece al pie de los Himalayas desde el noreste de Paquistán hasta el norte de Bengala del Oeste (la India). Ha sido introducido a y se ha naturalizado en otras partes de la India, Paquistán, Afganistán, Bangladesh, Sri Lanka, el sudeste de Asia, Asia occidental, la península Arábica, África del este y oeste, el sur de la Florida, todas las Indias Occidentales, y desde México a Perú, Paraguay y Brasil (Eilert, U. et al. 2000).

6. Samanea saman

Es un árbol grande, dominante, de copa grande y simétrica. Puede utilizarse ventajosamente como árbol de sombra, ya que sus folíolos, parecidos al helecho, se cierran por la noche, lo que permite que el agua pase a través hasta la cubierta herbácea a sus pies. Las legumbres largas y negras son muy apreciadas para forraje. Es rico en taninos. Resiste el desrame y puede mantenerse a la altura que haga falta mediante una poda razonable (Villanueva, G. 1994).

Las vainas son un importante suplemento como forraje para el ganado durante la estación seca. La madera es de alta calidad para muchos propósitos, y también proporciona leña y carbón de calidad. Las hojas son relativamente no palatables por lo que no se usan como forraje a pesar de su elevado valor nutritivo y digestibilidad (Villanueva, G. 1994).

Las atractivas flores rosas hacen de este árbol una elección popular como ornamental, aunque cuando se planta a lo largo de carreteras su extenso sistema radical puede levantar y dañar la superficie de la carretera. Las flores también atraen abejas y son una buena fuente de néctar para la producción de miel (Villanueva, G. 1994).

El uso de vainas como suplemento de forraje ha mostrado incrementar la producción de leche y ganancia en peso en vacas de doble propósito (Villanueva, G. 1994).

7. Pithecellobium dulce

Forma. Árbol o arbusto, espinoso, perennifolio, de 15 a 20 m de altura y con un diámetro a la altura del pecho de 80 cm (hasta 1 m), con ramas provistas de espinas (Roskoski, J. et al. 1999).

Copa / Hojas. Copa piramidal o alargada, ancha y extendida (diámetro de 30 m), muy frondosa. Hojas en espiral, aglomeradas, bipinnadas, de 2 a 7 cm de largo, con un par de folíolos primarios, cada uno con un par de folíolos secundarios sésiles; haz verde pálido mate (Roskoski, J. et al. 1999).

Tronco / Ramas. Tronco derecho. Ramas delgadas y ascendentes provistas de espinas. Corteza. Externa lisa o ligeramente fisurada, gris plomiza a gris morena con bandas horizontales protuberantes y lenticelas pálidas en líneas longitudinales. Interna de color crema claro, se torna pardo rosado con el tiempo, fibrosa, con ligero olor a ajo (Roskoski, J. et al. 1999).

Flor(es). Inflorescencias axilares de 5 a 30 cm de largo, panículas péndulas de cabezuelas tomentosas, cada cabezuela sobre una rama de 2 a 5 mm; cabezuelas de 1 a 1.5 cm de diámetro; flores pequeñas ligeramente perfumadas, actinomorfas, blanco-cremosas o verdes (Roskoski, J. et al. 1999).

Fruto(s). Vainas delgadas de hasta 20 cm largo por 10 a 15 mm de ancho, enroscadas, tomentosas, péndulas, rojizas o rosadas, constreñidas entre las semillas y dehiscentes. Se abren por ambos lados para liberar numerosas semillas (Roskoski, J. et al. 1999).

Semilla(s). Semillas de 7 a 12 mm de largo, ovoides aplanadas, morenas, rodeadas de un arilo dulce, blancuzco o rosado. Testa delgada y permeable al agua. Raíz. Sistema radical extenso sobre todo en aquellas áreas donde la precipitación es baja (Roskoski, J. et al. 1999).

Hábitat. Prospera en terrenos planos u ondulados. Es frecuente a la orilla de cauces de arroyos temporales, de carreteras y avenidas y en las viviendas. Crece en una amplia variedad de condiciones climáticas. Clima entre tropical y subtropical, con precipitaciones de 450 a 1,650 mm. Suelos: somero, pobre, pedregosos (basalto), negro-rocoso, aluvial, arenoso, calizo-rocoso, amarillo-arenoso profundo, café-grisáceo, litosol, arcilla negra, eriales de todo tipo (Roskoski, J. et al. 1999).

8. Cordia alba

El uso principal de la madera es para leña y postes. Se utiliza también para pequeños trabajos de carpintería, fabricación de culatas para escopetas, mangos para herramientas, trojas, barandal/tapesco de carretas, vigas. En cercas vivas es usado para forraje, aunque no es apta como dieta única. Las hojas además se utilizan en medicina casera como emolientes y las flores para la tos y como sudorífico (Pennington, T. 1998).

En algunos lugares se usa como sombra u ornato por sus flores muy vistosas. Los frutos de color blanco son dulces y comestibles, con un jugo mucilaginoso que se emplea como pegamento (Pennington, T. 1998).

Se encuentra más comúnmente como regeneración natural en potreros y charrales. Es plantada principalmente en cercas vivas, por lo cual su gran capacidad de rebrote después de podar y buena producción de biomasa comestible la hacen muy apta para producción de leña y forraje. Con poda produce follaje aún durante toda la época seca (Pennington, T. 1998).

Puede servir para la parte baja de rompevientos, en control de erosión y protección de fuentes de agua. También ofrece opciones para la restauración ecológica del bosque seco (Pennington, T. 1998).

9. Enterolobium cyclocarpum

Forma. Árbol grande y llamativo, caducifolio, de 20 a 30 m (hasta 45 m), de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 3 m (Rao, P. 1994).

Copa / Hojas. Copa hemisférica. El follaje es abundante, dando a la amplia copa una forma más ancha que alta. Libre de competencia por luz y puede alcanzar grandes diámetros. Hojas bipinnadas con 4 a 15 pares de pinnas opuestas, miden de 15 a 40 cm de largo; folíolos numerosos (15 a 30 pares por pinna), de color verde brillante que se pliegan durante la noche (Rao, P. 1994).

Tronco / Ramas. Tronco derecho y a veces con pequeños contrafuertes en la base. Ramas ascendentes (Rao, P. 1994).

Corteza. Externa lisa a granulosa y a veces ligeramente fisurada, gris clara a gris pardusca, con abundantes lenticelas alargadas, suberificadas, dispuestas longitudinalmente. Interna de color crema rosado, granulosa, con exudado pegajoso y dulzón. Grosor: 2 a 3 cm (Rao, P. 1994).

Flor(es). En pequeñas cabezuelas pedunculadas axilares, de 1.5 a 2 cm de diámetro, sobre pedúnculos de 1.5 a 3.5 cm de largo. Flores actinomorfas, cáliz verde y tubular; corola verde clara, de 5 a 6 mm de largo (Rao, P. 1994).

Fruto(s). Fruto característico de la especie. Consiste en una vaina circular indehisciente, de 7 a 15 cm de diámetro, aplanada y enroscada, leñosa, moreno oscura, brillante, de sabor dulce. Contiene de (5), 10 a 15 (20), semillas (Rao, P. 1994).

Semilla(s). Semillas grandes, ovoides y aplanadas, de 2.3 por 1.5 cm, morenas y brillantes con una línea pálida con la forma del contorno de la semilla, rodeadas por una pulpa esponjosa y fibrosa de olor y sabor dulce (Rao, P. 1994).

10. Guazuma ulmifolia

Forma. Árbol mediano o arbusto, caducifolio, de 2 a 15 m (hasta 25 m), de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 30 a 40 cm (hasta 80 cm), normalmente

de menor talla (8 m). En algunos casos se desarrolla como arbusto muy ramificado y en otros como un árbol monopódico (Pennington, T. 1998).

Copa / Hojas. Copa abierta, redondeada y extendida. Hojas alternas, simples; láminas de 3 a 13 cm de largo por 1.5 a 6.5 cm de ancho, ovadas o lanceoladas, con el margen aserrado; verde oscuras y rasposas en el haz y verde grisáceas amarillentas y sedosas en el envés (Pennington, T. 1998).

Tronco / Ramas. Tronco más o menos recto, produciendo a veces chupones, frecuentemente ramificado a baja altura (desde la base). Ramas largas muy extendidas, horizontales o ligeramente colgantes (Pennington, T. 1998).

Corteza. *Externa* ligeramente fisurada, desprendiéndose en pequeños pedazos, pardo grisácea. *Interna* de color amarillento cambiando a pardo rojizo o rosado, fibrosa, dulce a ligeramente astringente. Grosor total: 5 a 12 mm (Pennington, T. 1998).

Flor(es). En panículas de 2 a 5 cm de largo, flores actinomorfas pequeñas, blancas y amarillas con tintes castaños, con olor dulce, de 5 mm de diámetro; cáliz vellosos de 2 a 3 lóbulos, sépalos verdosos y pétalos de color crema. (Pennington, T. 1998).

Fruto(s). Cápsula de 3 a 4 cm de largo, en infrutescencias de 10 cm, ovoide, 5-valvada, abriéndose tardíamente, con numerosas protuberancias cónicas en la superficie, moreno oscura a negra cuando está madura, olor y sabor dulce (Pennington, T. 1998).

Semilla(s). Semillas numerosas (entre 40 a 80), de menos de 1 mm, duras, redondeadas, pardas. Los frutos se abren en el ápice o irregularmente por poros (Pennington, T. 1998).

11. Tithonia diversifolia

Tamaño: De hasta 4 m de alto. Tallo: Erecto, ramificado, las ramas tiernas cubiertas de pelillos, que con la edad se pierden. Sus hojas son alternas,

pecioladas, de hasta 20 cm de largo y de ancho, generalmente profundamente divididas en 3 a 5 lóbulos, con dientes redondeados en el margen, con la base a veces algo truncada pero ensiguada haciéndose muy angosta a lo largo del pecíolo, en cuya base se amplía en 2 lóbulos pequeños, la cara superior cubierta de pelos de base hinchada, generalmente con abundantes pelillos (a veces sin pelillos), y con puntos glandulares en la cara inferior (Pennington, T. 1998).

Inflorescencia: Varias cabezuelas grandes, agrupadas, o bien éstas solitarias, sobre pedúnculos fuertes (de hasta 20 cm de largo, y a veces cubiertos de pelillos), hinchados abajo de de la cabezuela (Pennington, T. 1998).

Cabezuela/Flores: Cabezuela: es una inflorescencia formada por pequeñas flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo convexo, provisto en su superficie de brácteas (páleas), rígidas, puntiagudas, de hasta 11 mm de largo (con algunos pelillos en su superficie), que abrazan a las flores del disco; el conjunto de flores está rodeado por fuera por el involucre anchamente acampanado (de hasta 4 cm de ancho), constituido por numerosas brácteas (dispuestas en 4 series), anchamente ovales y generalmente con el ápice anchamente redondeado, o bien las brácteas exteriores ovadas a redondeadas y con el ápice más o menos agudo, a veces cubiertas de pelillos (Pennington, T. 1998).

Flores liguladas: 12 a 14, ubicadas en la periferia de la cabezuela; la corola de hasta 6 cm de largo, es un tubo en la base y a manera de cinta hacia el ápice, semejando un pétalo de una flor sencilla, de color amarillo brillante o anaranjado, con 2 o 3 dientes en el ápice. Flores del disco: numerosas, hermafroditas, ubicadas en la parte central; la corola de hasta 8 mm de largo, es un tubo delgado que hacia la parte superior se ensancha ("garganta"), y se divide en 5 lóbulos, de color amarillo; los estambres alternos con los lóbulos de la corola, sus filamentos libres e insertos sobre el tubo de la corola, las anteras soldadas entre sí formando un tubo alrededor del estilo, con la base aflechada; el ovario ínfero (Pennington, T. 1998).

Frutos y semillas: El fruto es seco y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla, se le conoce como aquenio (o cipsela), es oblongo, de hasta 6 mm de largo, cubierto de pelillos recostados sobre su superficie, en el ápice del fruto se

presenta una estructura llamada vilano que consiste en 2 aristas (raramente ausentes), desiguales, de hasta 4 mm de largo y además de 6 a 10 escamas de hasta 2.5 mm de largo, unidas en la base e irregularmente divididas en su margen superior en segmentos muy angostos (Pennington, T. 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Rumen del Departamento de Ciencias Biofisiológicas. Instituto de Ciencia Animal, ubicado en la carretera central a 47 ½ Km ciudad de la Habana- Cuba.

La validación de la investigación se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal (LABIMA), de Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, ubicado en la panamericana sur Km 1½ de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo-Ecuador. Cuadro 2.

Cuadro 2. CONDICIONES METEOROLOGICAS

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

Fuente: Estación Meteorológica ICA. (2008). FRN-ESPOCH. (2008).

El tiempo de duración del experimento en la Habana fue de 120 días, mientras que la duración del trabajo de validación en Riobamba fue de 30 días.

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

La investigación estuvo conformada por dos experimentos, los mismos que se describen a continuación:

1. 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.

2. 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 lebbeck* y *Tithonia diversifolia*), en relación pasto estrella: árbol evaluado 70:30, siendo necesarias un total de 36 botellas para la consecución de este experimento.

3. Experimento de validación

La unidad experimental estuvo constituida por una botella de vidrio de 100 ml de capacidad, en donde se introdujo el líquido ruminal, Ray grass (*Lolium perenne*), y la mejor planta proteica determinada en el experimento dos (*Samanea saman*), en relación Ray grass: árbol evaluado 70:30, siendo necesarias un total de 18 botellas para la consecución de este experimento.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

1. Materiales

- a) Dos búfalos canulados en rumen.
- b) Forraje verde de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*).
- c) Botellas de cristal.
- d) Pipetas, probetas, y otros utensilios de laboratorio.
- e) Tubos roll y tapones.

- f) Las 11 plantas a evaluar.
- g) Un bovino canulado.
- h) Forraje verde de Ray grass.

2. Equipos

- a) Balanza analítica.
- b) Baños de incubación.
- c) Incubadoras.
- d) Autoclave.
- e) Máquina sembradora de tubos roll.
- f) Computadora.
- g) Impresora.
- h) Cámara de Fotos.

3. Instalaciones

- a) Laboratorios.
- b) Establos.
- c) Comederos.
- d) Bebederos.

4. Reactivos

- a) Hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4).
- b) Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4).
- c) Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$).
- d) Cloruro de sodio (NaCl).
- e) Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).
- f) Cloruro de calcio ($CaCl_2$).
- g) Sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$).
- h) Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).
- i) Cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$).
- j) Cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$).
- k) Resazurina.

- l) Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).
- m) Hemina.
- n) Solución de Hidróxido de sodio al 0.02% (NaOH).
- o) Acetato de sodio · 3H₂O (CH_3COONa).

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Primer experimento

Los tratamientos en este experimento estuvieron conformados por 11 plantas que fueron sometidas a digestión in vitro junto con el pasto estrella en relación 30:70.

Estas plantas fueron comparadas versus un tratamiento control en donde únicamente se incluyó el pasto estrella y líquido ruminal. Las plantas fueron seleccionadas a partir de estudios previos desarrollados por Galindo, J. et al. (2005), referentes al papel de determinados metabolitos secundarios de los vegetales en la población de protozoos del rumen e integran el arboretum del Instituto de Ciencia Animal y son las siguientes:

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1. <i>Leucaena leucocephala</i> | 7. <i>Pithecellobium dulce</i> |
| 2. <i>Gliricidia sepium</i> | 8. <i>Cordia alba</i> |
| 3. <i>Azadirachta indica</i> | 9. <i>Enterolobium cyclocarpum</i> |
| 4. <i>Albizia lebbek</i> | 10. <i>Guazuma ulmifolia</i> |
| 5. <i>Moringa oleífera</i> | 11. <i>Tithonia diversifolia</i> |
| 6. <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. Cuadro 3.

Cuadro 3. ESQUEMA DEL PRIMER EXPERIMENTO.

PLANTAS PROTÉICAS	HORAS	CÓDIGO	TUE	REPETICIONES	TOTAL
<i>Leucaena leucocephala</i>	4	LL 4	1	3	3
	8	LL 8	1	3	3
	12	LL 12	1	3	3
	24	LL 24	1	3	3
<i>Gliricidia sepium</i>	4	GS 4	1	3	3
	8	GS 8	1	3	3
	12	GS 12	1	3	3
	24	GS 24	1	3	3
<i>Azadirachta indica</i>	4	AI 4	1	3	3
	8	AI 8	1	3	3
	12	AI 12	1	3	3
	24	AI 24	1	3	3
<i>Albizia lebbek</i>	4	AL 4	1	3	3
	8	AL 8	1	3	3
	12	AL 12	1	3	3
	24	AL 24	1	3	3
<i>Moringa oleífera</i>	4	MO 4	1	3	3
	8	MO 8	1	3	3
	12	MO 12	1	3	3
	24	MO 24	1	3	3
<i>Samanea saman</i>	4	SS 4	1	3	3
	8	SS 8	1	3	3
	12	SS 12	1	3	3
	24	SS 24	1	3	3
<i>Pithecellobium dulce</i>	4	PD 4	1	3	3
	8	PD 8	1	3	3
	12	PD 12	1	3	3
	24	PD 24	1	3	3
<i>Cordia alba</i>	4	CA 4	1	3	3
	8	CA 8	1	3	3
	12	CA 12	1	3	3
	24	CA 24	1	3	3
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	4	EC 4	1	3	3
	8	EC 8	1	3	3
	12	EC 12	1	3	3
	24	EC 24	1	3	3
<i>Guazuma ulmifolia</i>	4	GU 4	1	3	3
	8	GU 8	1	3	3
	12	GU 12	1	3	3
	24	GU 24	1	3	3
<i>Tithonia diversifolia</i>	4	TD 4	1	3	3
	8	TD 8	1	3	3
	12	TD 12	1	3	3
	24	TD 24	1	3	3
Control	4	C 4	1	3	3
	8	C 8	1	3	3
	12	C 12	1	3	3
	24	C 24	1	3	3
TOTAL BOTELLAS					144

Fuente: Zabala, D. 2008.

El experimento respondió al siguiente el modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable en estudio

μ = media poblacional

α_i = efecto del factor A (Plantas proteicas)

β_j = efecto del factor B (Horas de evaluación)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre A y B

ε_{ijk} = efecto del error experimental

2. Segundo experimento

Se utilizó 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 microbiológicos y fermentativos. Cuadro 4.

Cuadro 4. ESQUEMA DEL SEGUNDO EXPERIMENTO.

PLANTAS PROTÉICAS	HORAS	CÓDIGO	TUE	REPETICIONES	TOTAL
<i>Albizia lebbbeck</i>	2	AL 2	1	3	3
	4	AL 4	1	3	3
	8	AL 8	1	3	3
<i>Samanea saman</i>	2	SS 2	1	3	3
	4	SS 4	1	3	3
	8	SS 8	1	3	3
<i>Tithonia diversifolia</i>	2	TD2	1	3	3
	4	TD 4	1	3	3
	8	TD 8	1	3	3
Control	2	C 2	1	3	3
	4	C 4	1	3	3
	8	C 8	1	3	3
TOTAL BOTELLAS					36

Fuente: Zabala, D. 2008.

El experimento respondió al siguiente el modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable en estudio

μ = media poblacional

α_i = efecto del factor A (Plantas proteicas)

β_j = efecto del factor B (Horas de evaluación)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre A y B

ϵ_{ijk} = efecto del error experimental

3. Experimento de validación

No se utilizó diseño experimental remitiéndose únicamente a la evaluación de la planta que arrojó los mejores resultados en las variables evaluadas en el segundo experimento (*Samanea saman*), evaluándose a las 2, 4 y 8 horas.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

1. Primer experimento

- Producción de gas in vitro
- Producción de metano

2. Segundo experimento

a. Microbiológicas y fermentativas

- Densidad de Bacterias viables totales
- Densidad de Bacterias celulolíticas
- Densidad de Bacterias metanogénicas
- Densidad de Hongos celulolíticos
- Densidad de Protozoos
- pH
- Producción de amoníaco

b. Análisis bromatológicos

- Proteína bruta
- FDN
- FDA
- Cenizas
- Tamizaje fitoquímico

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Para el análisis estadístico 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 $P < 0.05$ y $P < 0.01$.

Los cuadros del ADEVA para cada uno de los experimentos se describen en el cuadro 5 y 6:

Cuadro 5. ADEVA PARA EL PRIMER EXPERIMENTO.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total	143
Factor A	11
Factor B	3
Interacción AxB	33
Error	96

Fuente: Zabala, D. (2008).

Cuadro 6. ADEVA PARA EL SEGUNDO EXPERIMENTO.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total	35
Factor A	3
Factor B	2
Interacción AxB	6
Error	24

Fuente: Zabala, D. (2008).

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. 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 utilizó 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 conservó 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.

a. Preparación de la muestra de alimento base

El alimento base para la fermentación es pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). La misma se obtuvo a partir de un área sin pastorear del Instituto de Ciencia Animal. Para su preparación, se recolectó hojas con sus pecíolos, de manera que semeje el bocado del animal. La muestra se secó en estufa a 60°C durante 48 horas.

b. Colecta de las plantas proteicas y preparación para el estudio

De las plantas seleccionadas para su evaluación como candidatas a reducir la producción de metano, se recogió las fracciones hojas + pecíolos + vainas verdes. Las mismas proceden del arboretum perteneciente al Instituto de Ciencia Animal, municipio San José de las Lajas, provincia La Habana. El suelo fercialítico, ondulado, con 4.84 % de materia orgánica, 0.26 de nitrógeno total, 40.59 ppm de fósforo, 4.60 de calcio, 0.46 de magnesio y pH de 6.34.

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. El pasto base y las plantas proteicas se almacenaron en frascos de cristal hasta su posterior utilización en el experimento.

Una muestra de aproximadamente 100 g se fue entregada al laboratorio de Química Analítica para determinar su composición bromatológica según (AOAC, 1995).

2. 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%.

3. Experimento de validación

En el experimento de validación en el Ecuador, se aplicó el tratamiento que dio mejores resultados en la disminución de producción de metano correspondiente a la planta proteica *Samanea saman*, para la obtención del líquido ruminal se utilizó un bovino Holstein que tuvo como alimento base el Ray grass (*Lolium perenne*), el mismo que reemplazó al pasto estrella puesto que en las condiciones climáticas en la que se realizó la validación no se produce dicho pasto.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. EVALUACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PLANTAS PROTÉICAS UTILIZADAS PARA LA REDUCCIÓN DE LA POBLACIÓN DE METANÓGENOS RUMINALES *IN VITRO*

1. Composición bromatológica

El contenido de materia seca en las 11 plantas proteicas evaluadas alcanzó un promedio de 86.98 ± 2.43 %, determinándose el mayor valor para *Albizia lebbbeck* con 91.54 % mientras que el menor valor fue determinado en la *Azadirachta indica* que presentó el 83.08 % de materia seca, registrándose un rango de 8.46 % entre los valores extremos para esta característica en las plantas evaluadas. Cuadro 7.

Los valores registrados en la presente investigación son superiores a los descritos por Pinto, R. et al. (2003), quien indica que el porcentaje de materia seca de *Albizia lebbbeck* es del 50,82%, el mismo que puede variar dependiendo de las condiciones experimentales, edad, estado fenológico, etc.

En el Cuadro 7, se expone el contenido de proteína bruta presente en las plantas proteicas evaluadas, obteniéndose un promedio de 20.21 ± 4.39 %, registrándose el mayor valor para esta característica en la *Leucaena leucocephala* con el 29.47 % de proteína mientras que el menor valor 14.25 % fue determinado en la *Azadirachta indica*, los demás valores de proteína se distribuyeron en un rango de 15.22 %.

Cuadro 7. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PLANTAS PROTEICAS EVALUADAS.

Especie	COMPOSICIÓN (%)						
	MS	PB	FND	FAD	C	Ca	P
<i>Samanea saman</i>	86.23	18.15	41.45	29.51	6.92	1.26	0.32
<i>Albizia lebeck</i>	91.54	17.18	49.86	34.69	6.54	1.17	0.20
<i>Azadirachta indica</i>	83.08	14.25	41.00	28.92	3.92	2.28	0.28
<i>Tithonia diversifolia</i>	85.30	23.95	33.43	29.54	5.81	2.14	0.35
<i>Cordia alba</i>	86.89	18.78	38.43	29.16	5.65	1.32	0.23
<i>Leucaena leucocephala</i>	88.38	29.47	39.96	19.26	8.91	1.18	0.08
<i>Pithecellobium dulce</i>	86.12	19.15	37.42	28.15	7.12	2.23	0.45
<i>Moringa oleífera</i>	87.37	22.60	35.73	25.54	9.57	1.28	0.08
<i>Gliricidia sepium</i>	86.19	23.83	42.83	24.96	11.39	1.48	0.34
<i>Guazuma ulmifolia</i>	85.15	19.36	52.65	41.12	9.74	2.10	0.41
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	90.56	15.59	63.94	42.99	11.80	0.97	0.20
Estadístico	MS	PB	FND	FAD	C	Ca	P
Media	86,98	20,21	43,34	30,35	7,94	1,58	0,27
Desviación estándar	2,43	4,39	8,89	6,92	2,52	0,50	0,12
Varianza de la muestra	5,90	19,27	78,96	47,94	6,33	0,25	0,01
Rango	8,46	15,22	30,51	23,73	7,88	1,31	0,37
Mínimo	83,08	14,25	33,43	19,26	3,92	0,97	0,08
Máximo	91,54	29,47	63,94	42,99	11,80	2,28	0,45

Fuente: Zabala, D. (2008).

MS: Materia Seca **PB:** Proteína Bruta **FND:** Fibra Neutro Detergente **FAD:** Fibra Ácido Detergente **C:** Ceniza **Ca:** Calcio **P:** Fósforo

Al respecto el contenido de proteína bruta en la *Leucaena leucocephala* es importante puesto que de acuerdo a lo descrito por Durán, F. (2009), es muy adecuada para rumiantes como suplemento de proteínas, con forrajes ricos en fibra bruta o sobrantes de cosechas, por otra parte menciona que esta planta contiene un mejor cuadro de aminoácidos que la alfalfa y en alto contenido de minerales.

El propósito de incluir a *Azadirachta indica* en la evaluación se debió, únicamente a su contenido en metabolitos secundarios que pudieran tener efectos en la reducción de la producción de metano y estratégicamente ser fuente de los

referidos metabolitos para su empleo como aditivo. Es evidente que esta planta no tiene interés como alimento animal y de hecho no es aceptado por el ganado.

El contenido de fibra neutro detergente y fibra ácido detergente en las plantas proteicas evaluadas registró promedios de 43.34 ± 8.89 y 30.35 ± 6.92 % en su orden, determinándose que el mayor contenido de la fibra neutro detergente y fibra ácido detergente en el *Enterolobium cyclocarpum* con promedios de 63.94 y 42.99 % respectivamente. Cuadro 7.

Pinto, R. et al. (2003), al evaluar la composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros manifiesta que el mayor contenido de FAD y FND se presento en el *Enterolobium cyclocarpum* con valores de 33,11% y 49,88% respectivamente, sin embargo dichos valores son inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

Por su parte el contenido de Ceniza, Calcio y Fósforo registraron promedios de 7.94 ± 2.52 , 1.58 ± 0.50 y 0.27 ± 0.12 % correspondientemente en el grupo de plantas evaluadas, registrándose el mayor contenido de cenizas en el *Enterolobium cyclocarpum* con 11.80 %, mientras que el Calcio registró un mayor promedio en la *Azadirachta indica* con 2.28 % y el fósforo fue superior en el *Pithecellobium dulce* alcanzando un promedio de 0.45 %. Cuadro 7.

2. Tamizaje fitoquímico

En el cuadro 8, se presenta el tamizaje fitoquímico de las plantas proteicas evaluadas en la presente investigación, en donde todas las plantas presentan cantidades apreciables y moderadas de metabolitos secundarios. El contenido de metabolitos secundarios ante las pruebas cualitativas del tamizaje de estos árboles y arbustos indicaron una alta presencia (+++), de taninos en *Azadirachta indica*, *Leucaena leucocephala* y *Enterolobium cyclocarpum*, moderadas cantidades de este metabolito en *Samanea saman*, *Guazuma ulmifolia*, *Moringa oleifera* y *Tithonia diversifolia*. Ninguna de las plantas se destacó por la presencia de altas cantidades de saponinas. Las más sobresalientes fueron *Albizia lebeck*, *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Gliricidia sepium*, las que

presentaron moderada respuesta (++), aunque en el resto se detectó baja (+), presencia de este metabolito.

Cuadro 8. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE ALGUNAS DE LAS PLANTAS EVALUADAS.

Planta proteica	Grado de positividad							
	Taninos	Flavonoides	Saponinas	Triterpenos	Esteroides	Antocianidinas	Reductores	Alcaloides
<i>Samanea saman</i>	++	+	+	++	++	+	+	+++
<i>Albizia lebbek</i>	+	+	++	+	+	+	++	+++
<i>Azadirachta indica</i>	+++	+	+	+	+	+	++	+++
<i>Tithonia diversifolia</i>	++	++	+	+	++	+	+++	++
<i>Leucaena leucocephala</i>	+++	+	++	++	++	+	+++	+++
<i>Pithecellobium dulce</i>	+	-	+	+	+	-	+	++
<i>Moringa oleífera</i>	++	-	+	+++	-	-	+	++
<i>Gliricidia sepium</i>	+	+	++	+	+	+	ND	-
<i>Guazuma ulmifolia</i>	++	-	+	+++	-	-	+	++
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	+++	+	++	+	+	-	++	++

Fuente: Zabala, D. (2008).

(+++) alto; (++) moderado; (+)bajo; (-) no presencia; ND- No detectado

En un análisis de metabolitos secundarios en *Tithonia diversifolia*, realizado por Rosales, M. (1992), no se encontraron ni fenoles ni taninos, mientras que Vargas, J. (1994), encontró un bajo contenido de fenoles y ausencia de saponinas, estas últimas son de gran importancia puesto que en la actualidad son utilizadas como aditivos en la nutrición animal principalmente para reducir las emisiones de amoníaco y los olores de las excretas. La baja presencia de flavonoides, triterpenos, esteroides y antocianidinas fue variable entre las diferentes plantas

mientras que en *Moringa oleifera* y *Guazuma ulmifolia* no se detectó la presencia (-), de flavonoides, esteroides y antocianidinas.

Por su parte los metabolitos reductores registraron una alta presencia (+++), en *Leucaena leucocephala* y *Tithonia diversifolia* mientras que los Alcaloides presentan alta positividad (+++), en *Samanea saman*, *Albizia lebeck*, *Azadirachta indica*, *Leucaena leucocephala* y moderada respuesta (++) , en *Tithonia diversifolia*, *Pithecellobium dulce*, *Moringa oleifera*, *Guazuma ulmifolia* y *Enterolobium cyclocarpum*. Cuadro 8.

Sotelo, A. et al, (1996), en *Albizia lebeck* observó una cantidad importante de alcaloides las mismas que coinciden con las registradas en la presente investigación, sin embargo, los niveles en todas las plantas evaluadas fueron similares a las concentraciones características de numerosas especies silvestres que no causan toxicidad.

De acuerdo a estos resultados es importante que las plantas proteicas evaluadas presenten una cantidad moderada de metabolitos a fin de disminuir la población de protozoarios y conjuntamente la población de metanógenos ruminales ya que la conversión anaeróbica de materia orgánica a CH₄, en el rumen se 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, fermentando a estos últimos a ácidos grasos de cadena corta, H₂ y CO₂. El CH₄ se forma entonces por los metanógenos ruminales, usando H₂ (80%), y el formiato (18%), como sustratos (Bryant, M. 1999 y Demeyer, D y Fievez, V. 2000). Con respecto a lo antedicho entre los metabolitos secundarios que ejercen poder reductor de la población protozoaria se encuentran los polifenoles totales, taninos condensados y las saponinas, los mismos que ejercen un mecanismo antiprotozoarico consistente en la formación de complejos irreversibles con colesterol. El colesterol y otros esteroides son componentes de las membranas celulares de todos los organismos excepto los eucariontes (bacterias), de aquí la reducción del número de protozoos del rumen observada al incluir metabolitos en la dieta.

Por otro lado un grupo de metabolitos como la antocianidinas, y alcaloides cumplen diversas funciones en las plantas, como defensas naturales contra bacterias y hongos, suelen producir efectos fisiológicos en los animales, es por eso que la mayoría de plantas medicinales, tóxicas y alucinógenas deben sus efectos a la actividad biológica de los alcaloides.

Así mismo los taninos previenen infecciones y aumentan la distribución de nitrógeno no amónico y de los aminoácidos esenciales desde el rumen. La concentración de los taninos en la dieta, con un rango de valores medidos que varían entre 0 - 12 % de ms, presentan respuesta lineal y positiva en la formación de complejos taninos-proteínas.

B. EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA METANOGENÉISIS RUMINAL *IN VITRO*

1. Producción de gas in vitro

La producción de gas *in vitro* al evaluar diferentes plantas proteicas sobre 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. Cuadro 9.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la producción total de gas es de considerar que el metano forma parte de esta producción, por lo que la eficiencia de las plantas proteicas sobre la producción de gas metano se traducirá en una menor producción de gas total, en función a estos resultados las plantas seleccionadas para conformar la segunda fase son: *Samanea saman*, *Tithonia diversifolia* y *Albizia lebbbeck* para ser comparadas con un grupo control.

Cuadro 9. PRODUCCIÓN DE GASES EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGENÉISIS RUMINAL “*IN VITRO*”.

PLANTAS PROTEICAS	VARIABLES	
	PDN. GAS TOTAL (ml)	PDN. CH ₄ (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 oleífera</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

Fuente: Zabala, D. (2008).

En el cuadro 10, se describe el comportamiento de la producción de gas total en relación al Factor B del experimento correspondiente al tiempo de fermentación, debido a que los factores en estudio no presentaron interacción significativa, por lo que fueron analizados en forma independiente.

Cuadro 10. PRODUCCIÓN DE GASES DE ACUERDO AL TIEMPO DE FERMENTACIÓN “*IN VITRO*”.

VARIABLES	TIEMPO DE FERMENTACIÓN (Horas)				X	Prob.	CV (%)
	4	8	12	24			
Producción de Gas Total (ml)	22,44 a	10,53 C	8,22 d	17,56 b	14,69	0,0001**	8,60
Producción de CH ₄ (μL)	24,65 c	25,16 A	24,82 b	24,74 bc	24,84	0,0001**	1,17

Fuente: Zabala, D. (2008).

De acuerdo a lo antedicho la producción de gas total “*in vitro*” al evaluar plantas proteicas en función al tiempo de fermentación presento diferencias estadísticas (P<0.01), por lo que se obtiene la mayor producción de gas total a las 4 horas con 22.44 ml, descendiendo a 10.53 y 8.22 ml a las 8 y 12 horas de fermentación, en

tanto que se determinó un incremento de gas total a las 24 horas de fermentación ascendiendo a 17.56 ml, por lo que las plantas proteicas evaluadas producen una reducción del gas total hasta las 12 horas en forma paulatina para incrementarse hasta las 24 horas lo que posiblemente estaría relacionado con la producción de ácidos grasos volátiles que se incrementan con la disminución de las bacterias metanogénicas. Cuadro 10.

2. Producción de metano

Al evaluar la producción de gas metano *in vitro* de diferentes plantas proteicas sobre 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 μ l, mientras que las menores producciones de gas metano se obtuvieron con la utilización de *Samanea saman* con una producción promedio de 4.31 μ l de gas metano, seguida de *Tithonia diversifolia* con 5.70 μ l de gas metano, a continuación *Azadirachta indica* con una producción de gas metano de 8.53 μ l a pesar de su baja producción de gas metano esta planta es poco palatable para el animal por lo que *Albizia lebbek* con una producción de 9.18 μ l 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 9. Gráfico 2.

Barry, T y Mc Nabb, W. (1999), señala que el consumo de *Azadirachta indica* en ovinos se vio limitado por el contenido de taninos condensos, debido a que estos pueden tener efectos positivos y negativos sobre el valor nutritivo de los forrajes según la concentración en la que se encuentren. Así, a altas concentraciones, 6-10% de la MS deprimen el consumo voluntario y la palatabilidad de las especies forrajeras. También reducen la digestibilidad de la materia seca, de la materia orgánica, de la fibra, de la proteína, y de los carbohidratos y por consiguiente afectan negativamente el desempeño productivo de los animales.

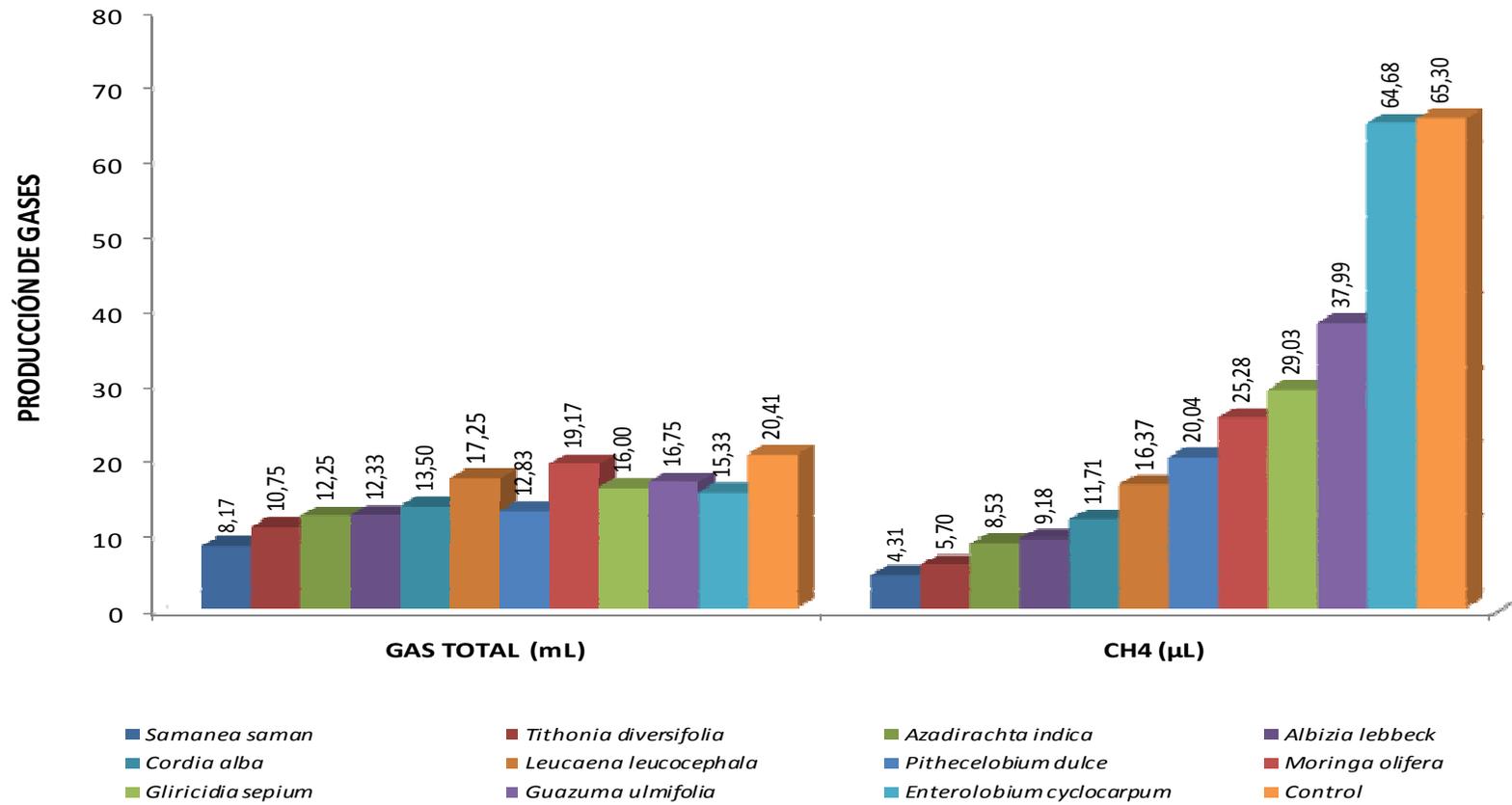


Gráfico 2. Producción de gas Total y gas Metano en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

Investigaciones de los últimos años demostraron que la producción de metano estaba inversamente relacionada con el nivel de consumo voluntario de alimentos (Blaxter, K y Clapperton, J. 1995), en donde se puede ver que animales consumiendo dietas basadas en silaje de maíz o ryegrass anual, a niveles de mantenimiento o a 3 veces el nivel de mantenimiento, disminuían sus emisiones de metano en un 39 y 22% con silaje de maíz y ryegrass anual, respectivamente (Kurihara, M y Terada, F. 2001). Johnson, D y Johnson, K. (2000), concluyeron que el porcentaje de energía bruta del alimento perdido como metano disminuía 1.6 unidades porcentuales por cada unidad de incremento del consumo por encima del nivel de mantenimiento. Asimismo, la tasa de fermentación de los sustratos es importante: aquellos alimentos que se degradan a tasas más lentas (caso de los carbohidratos estructurales como la celulosa), producen más metano que aquellos que se fermentan a tasas más rápidas (McCrabb, G. 2002).

En cuanto a las horas de evaluación dentro del proceso de fermentación la producción de gas metano registra un incremento en la producción a partir de las 4 a 8 horas de evaluación donde se incrementa de 24.65 a 25.16 μl de gas metano, disminuyendo paulatinamente entre las 12 y 24 horas de fermentación obteniéndose producciones de 24.82 y 24.74 μl al final respectivamente, por lo que en la presente investigación quedó demostrado que la mayoría de las plantas evaluadas, en relación al grupo control son capaces de reducir la producción de metano en el rumen, incrementando su efecto entre las 12 y 24 horas de fermentación. Cuadro 10.

C. EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS Y SU EFECTO EN LA POBLACIÓN DE METANÓGENOS RUMINALES *IN VITRO*

1. 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 lebbek* 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

34.22x10¹¹ UFC/ml y *Tithonia diversifolia* con 29.77x10¹¹ UFC/ml hasta llegar a la menor densidad con el tratamiento control el mismo que registró un valor de 24.55 x 10¹¹ UFC/ml. Cuadro 11. Gráfico 3.

Galindo, J. (2001). Al evaluar el Efecto de *Albizia lebbbeck* en la población protozoaria y organismos celulolíticos ruminales, reporta que la mencionada planta no produjo modificaciones en la población y actividad de las bacterias ruminales, es así que esta planta no tiene una influencia en las poblaciones de bacterias viables totales, metanogénicas y celulolíticas, lo cual difiere con los resultados reportados en la presente investigación los mismos que demuestran que al incorporar *Albizia lebbbeck* en la dieta la población microbiana se ve afectada dependiendo del grupo microbiano estudiado.

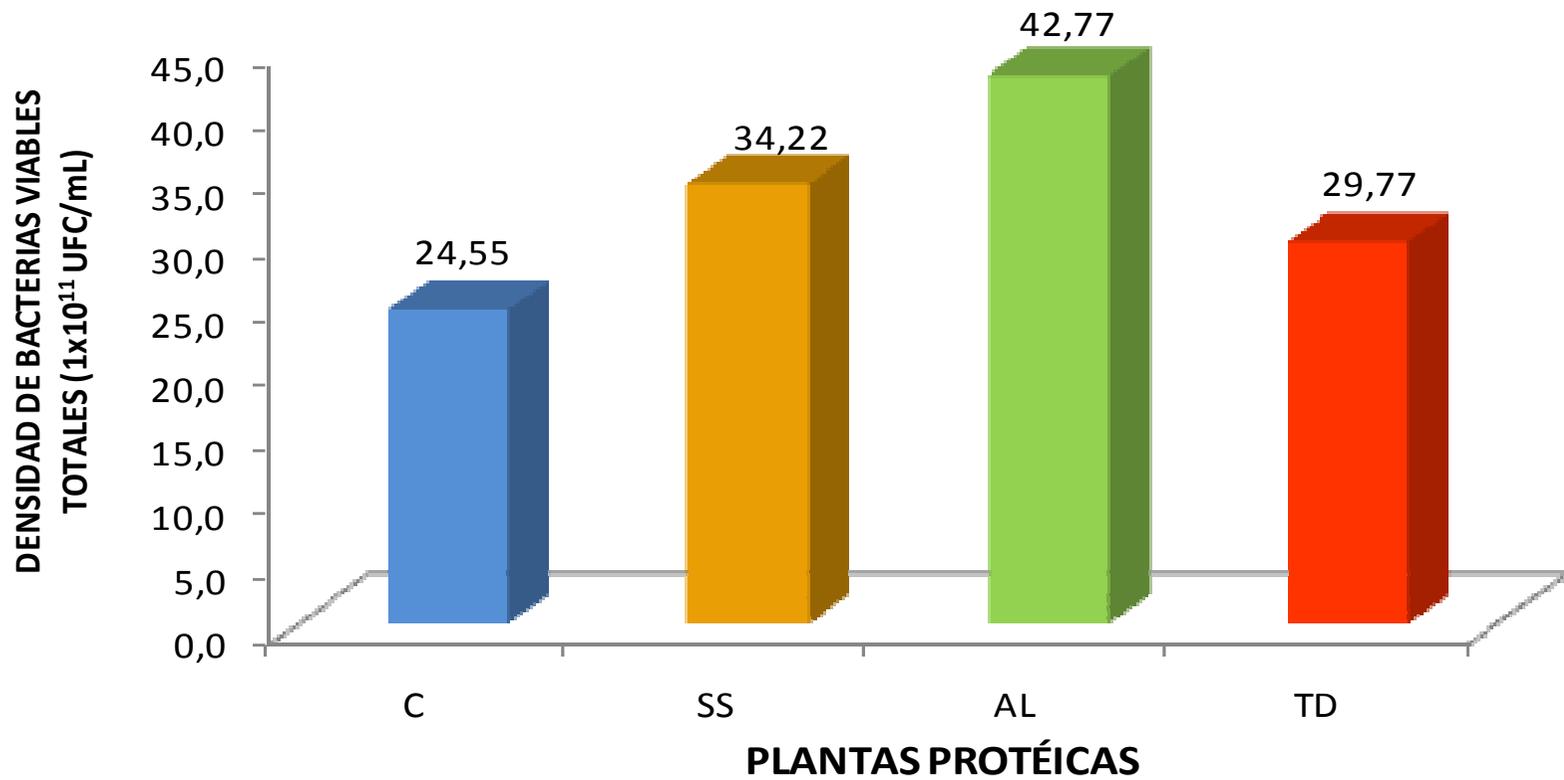
Los resultados obtenidos para esta variable en el tratamiento control posiblemente se deban a que en su totalidad la población de bacterias esté representada por bacterias metanogénicas, en tanto que las poblaciones de bacterias de los tratamientos en los cuales se incluyó plantas proteicas demuestran 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.

Cuadro 11. DENSIDAD DE BACTERIAS VIABLES TOTALES EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGENÉNESIS RUMINAL “IN VITRO”.

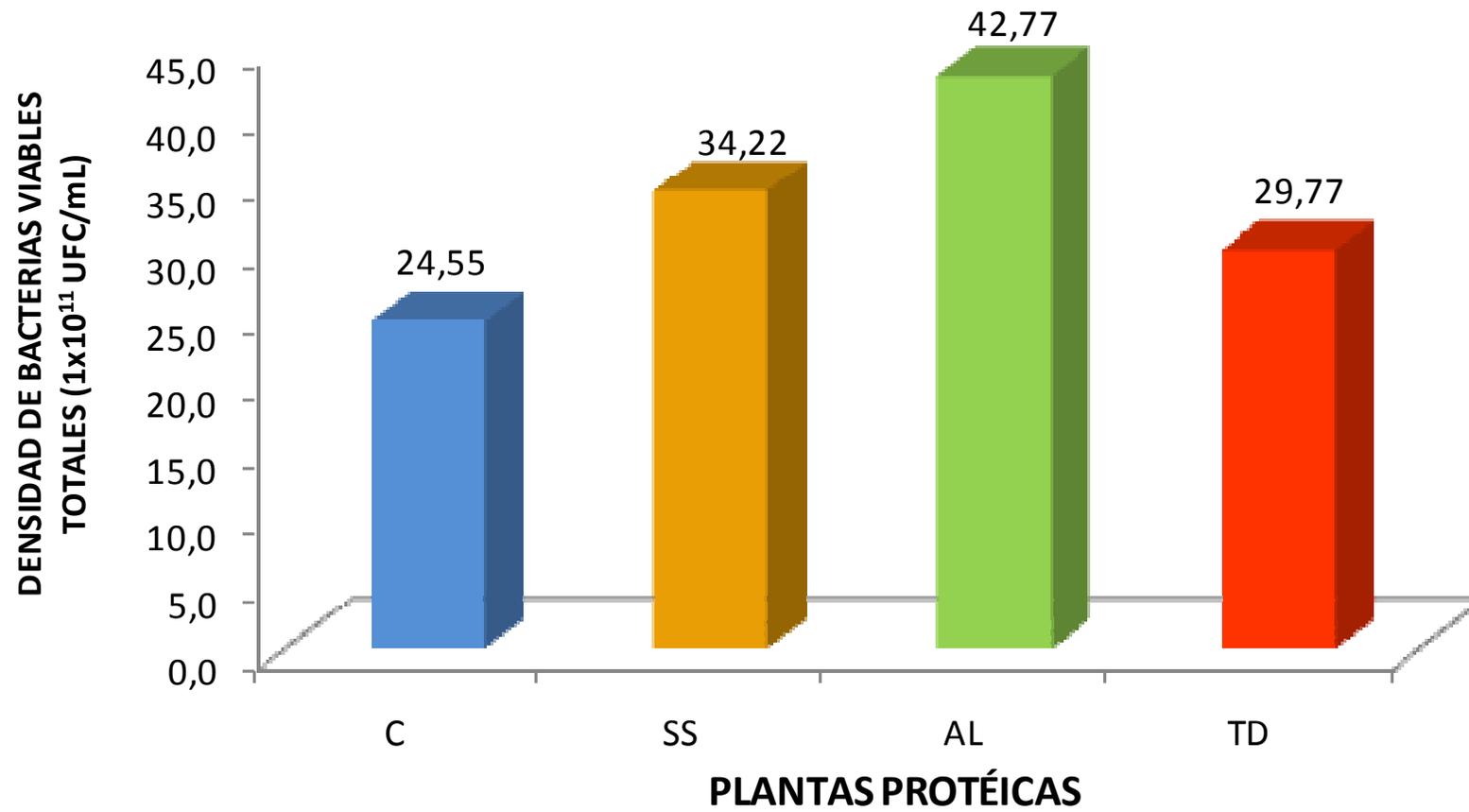
VARIABLES	PLANTAS PROTEICAS				X	Prob.	CV (%)
	Control	<i>Samanea saman</i>	<i>Albizia lebbbeck</i>	<i>Tithonia diversifolia</i>			
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1 x 10 ¹¹ UFC/mL	24,55 d	34,22 b	42,77 a	29,77 c	32,83	0,0001 **	7,44

Fuente: Zabala, D. (2008).

Debido a que no se determinó interacción significativa entre los factores de estudio, al determinar la densidad de bacterias viables totales de acuerdo al tiempo de fermentación “in vitro”, no se encontraron diferencias estadísticas significativas, de tal manera que se obtuvieron densidades de 33.16, 33.00 y 32.33 x 10¹¹ UFC/ml para las 2, 4 y 8 horas de fermentación, sin embargo de



SS: Samanea saman TD: Tithonia diversifolia AL: Albizia lebeck C: Control



SS: *Samanea saman* TD: *Tithonia diversifolia* AL: *Albizia lebeck* C: Control

Gráfico 3. Densidad de Bacterias Viables Totales en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

manera general se aprecia una disminución de la población bacteriana a medida que se incrementa el tiempo de fermentación. Cuadro 12.

Cuadro 12. DENSIDAD DE BACTERIAS VIABLES TOTALES DE ACUERDO AL TIEMPO DE FERMENTACIÓN “*IN VITRO*”.

VARIABLES	TIEMPO DE FERMENTACIÓN			X	Prob.	CV (%)
	2	4	8			
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/mL	33,16 a	33,00 a	32,33 a	32,83	0,8486	7,44

Fuente: Zabala, D. (2008).

Por su parte en la validación del efecto de *Samanea saman*, sobre la población de bacterias viables totales se determinó que a medida que transcurre el tiempo la población se incrementa, es así que a la hora 2 se registró una población de 33.50×10^{11} UFC/ml, incrementándose a 35.60 y 37.30×10^{11} UFC/ml a las 4 y 8 horas respectivamente, obteniendo un comportamiento similar a la población de bacterias determinadas en el experimento realizado en Cuba, lo que demuestra su efecto sobre la población microbiana del rumen. Cuadro 13.

Cuadro 13. VALIDACIÓN DEL EFECTO DE LA PLANTA PROTEICA *Samanea saman* EN LA POBLACIÓN MICROBIAL DE METANÓGENOS Y METANOGENESIS RUMINAL *IN VITRO*.

VARIABLES	HORAS DE EVALUACIÓN		
	2 Horas	4 Horas	8 Horas
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/ml	33,50	35,60	37,30
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^5 UFC/ml	23,33	25,67	34,67
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^{10} UFC/ml	82,67	32,00	13,33
Densidad de Hongos Celulolíticos, 1×10^4 UPC/ml	8,33	11,20	16,33
Densidad de Protozoarios, 1×10^3 Especímenes/ml	68,00	52,30	31,18
pH	6.8	6.4	6.4

Fuente: Zabala, D. (2008).

2. 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, así mismo 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 determinó 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 lebbbeck* 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 14.

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 lebbbeck* 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. Cuadro 14.

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 lebbbeck* y por otro lado grupo control en donde se determinaron densidades de 20.33 y 7.66×10^5 UFC/ml respectivamente. Cuadro 14.

Valiño, E. (1999), manifiesta que al suplementar con 15 y 30 % de la MS con *Tithonia diversifolia* en la dieta para rumiantes, este produce un marcado efecto defaunante de protozoarios y metanógenos, al tiempo que propicia una mayor

Cuadro 14. COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES MICROBIOLÓGICOS Y FERMENTATIVOS, EN LA EVALUACIÓN DE PLANTAS PROTEICAS SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL “*IN VITRO*”, DE ACUERDO AL TIPO DE PLANTAS Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN.

VARIABLES	PLANTAS PROTEICAS DE ACUERDO AL TIEMPO												X	Prob.	CV (%)
	2 Horas				4 Horas				8 Horas						
	C	SS	AL	TD	C	SS	AL	TD	C	SS	AL	TD			
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^5 UFC/ml	13,00 b	23,66 a	13,66 b	14,33 b	8,00 c	26,00 a	15,66 b	17,00 b	7,66 c	32,33 a	20,33 b	31,00 a	18,56	0,0001**	9,24
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^{10} UFC/ml	74,00 a	70,33 a	72,66 a	71,33 a	78,33 a	20,33 c	41,33 b	22,66 c	84,66 a	11,33 c	20,66 b	12,00 c	48,31	0,0001**	3,98
Densidad de Hongos Celulolíticos, 1×10^4 UPC/ml	6,00 a	7,66 a	6,33 a	6,33 a	5,00 c	11,00 a	7,00 bc	8,33 b	4,00 c	15,00 a	8,33 b	9,33 b	7,86	0,0001**	9,72
Densidad de Protozoarios, 1×10^3 Especímenes/ml	91,8 a	63,07 d	83,33 b	72,20 c	93,17 a	53,50 d	80,13 b	62,73 c	106,17 a	33,27 d	71,77 b	52,82 c	72,00	0,0001**	1,15
pH	6,56 a	6,63 a	6,53 a	6,63 a	6,26 ab	6,36 a	6,17 b	6,27 ab	6,86 a	6,63 b	6,63 b	6,73 ab	6,53	0,0007**	0,88
Producción de NH_3 , mmol/l	15,59 a	14,59 a	14,93 a	14,68 a	16,23 a	11,99 b	13,05 b	12,50 b	16,74 a	10,82 b	11,90 b	11,82 b	13,74	0,0001**	4,2

VARIABLES	TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE ACUERDO AL TIPO DE PLANTA PROTEICA												Prob.	CV (%)
	Control			Samanea saman			Albizia lebbeck			Tithonia diversifolia				
	2	4	8	2	4	8	2	4	8	2	4	8		
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^5 UFC/ml	13,00 a	8,00 ab	7,66 b	23,66 b	26,00 b	32,33 a	13,66 b	15,66 ab	20,33 a	14,33 b	17,00 b	31,00 a	0,0001**	9,24
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^{10} UFC/ml	74,00 b	78,33 b	84,66 a	70,33 a	20,33 b	11,33 c	72,66 a	41,33 b	20,66 c	71,33 a	22,66 b	12,00 c	0,0001**	3,98
Densidad de Hongos Celulolíticos, 1×10^4 UPC/ml	6,00 a	5,00 a	4,00 a	7,66 c	11,00 b	15,00 a	6,33 a	7,00 a	8,33 a	6,33 b	8,33 ab	9,33 a	0,0001**	9,72
Densidad de Protozoarios, 1×10^3 Especímenes/ml	91,80 b	93,17 b	106,17 a	63,07 a	53,50 b	33,27 c	83,33 a	80,13 b	71,77 c	72,20 a	62,73 b	52,83 c	0,0001**	1,15
pH	6,56 b	6,26 c	6,86 a	6,63 a	6,36 b	6,63 a	6,53 a	6,17 b	6,63 a	6,63 a	6,27 b	6,73 a	0,0001**	0,88
Producción de NH_3 , mmol/l	15,59 a	16,23 a	16,74 a	14,59 a	11,99 b	10,82 b	14,93 a	13,05 b	11,90 b	14,68 a	12,50 b	11,82 b	0,0001**	4,2

C: Control **SS:** *Samanea saman*. **AL:** *Albizia lebbeck*. **TD:** *Tithonia diversifolia*.

Letras iguales no difieren estadísticamente. 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.

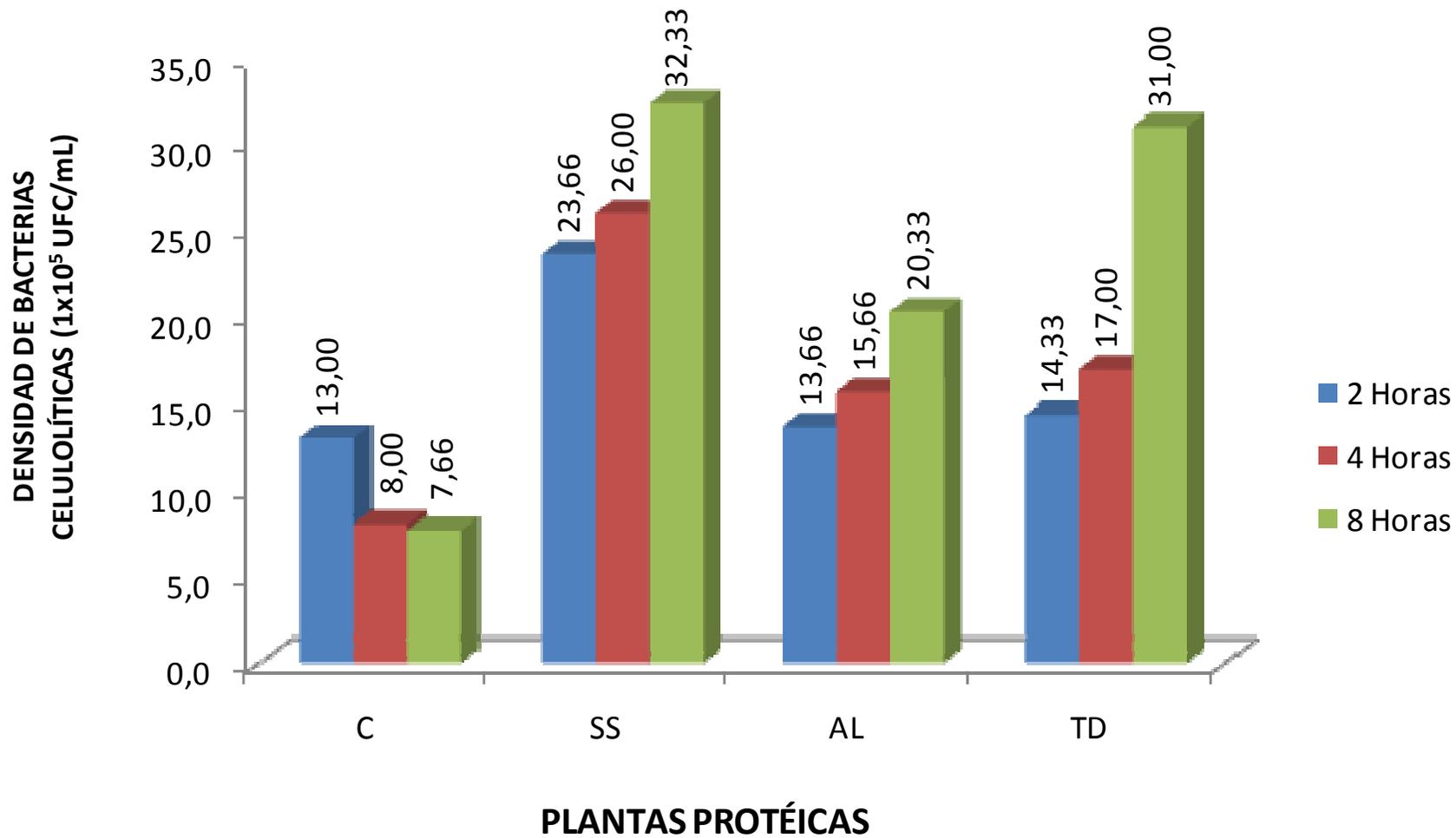
población de bacterias y hongos celulolíticos ruminales, lo cual puede incrementar la celulolisis ruminal, la degradación de la fracción fibrosa y, consecuentemente, el consumo de los animales.

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 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 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. Cuadro 14. Gráficos 4 y 5.

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. Cuadro 14. Gráficos 4 y 5.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbek* 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. Cuadro 14. Gráficos 4 y 5.

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



SS: *Samanea saman* TD: *Tithonia diversifolia* AL: *Albizia lebeck* C: Control

Gráfico 4. Densidad de Bacterias Celulolíticas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

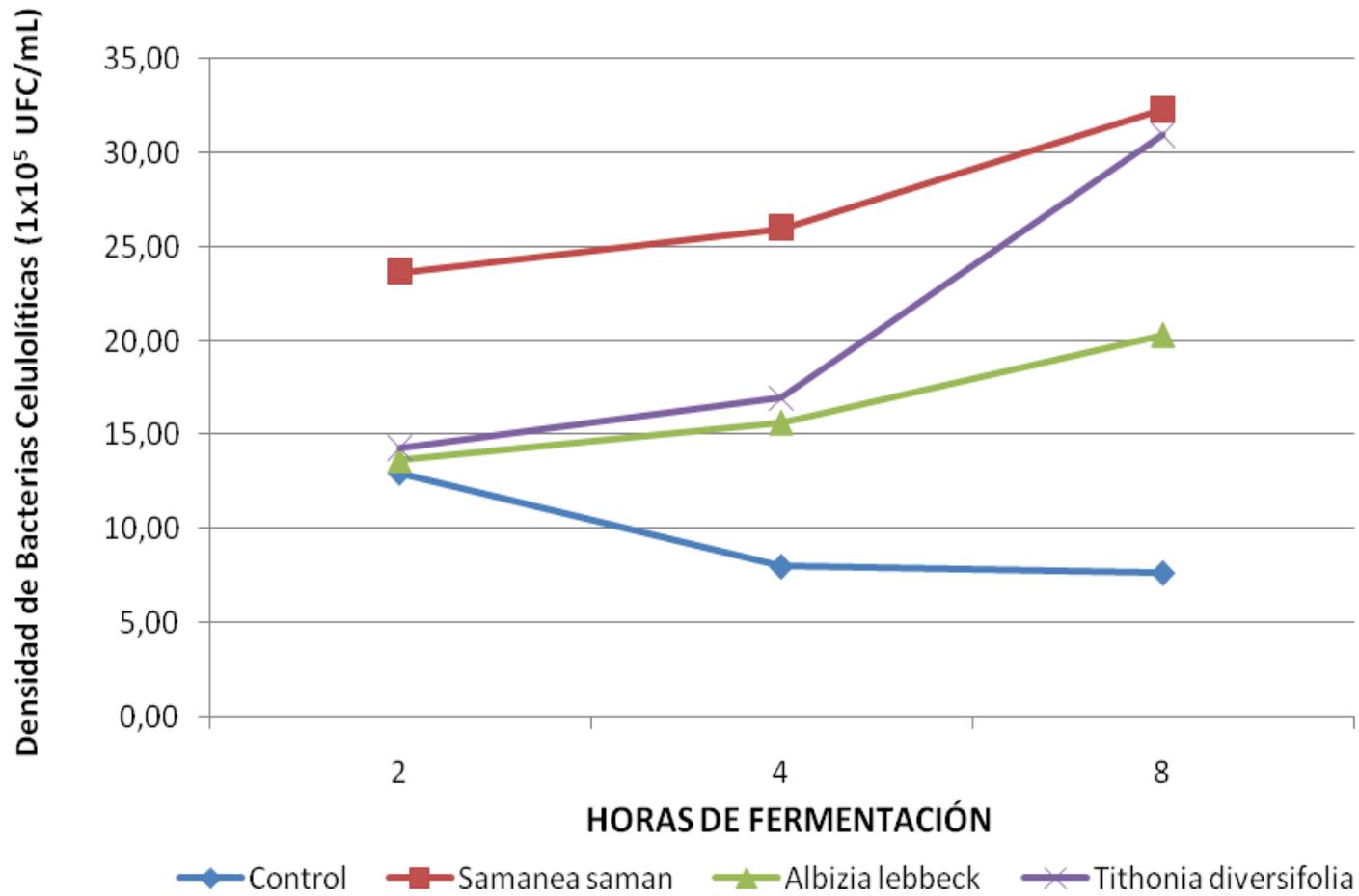


Gráfico 5. Comportamiento de la densidad de Bacterias Celulolíticas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*” de acuerdo al tiempo de fermentación.

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. Cuadro 14. Gráficos 4 y 5.

Galindo, J. et al. (2005), evaluaron el efecto de incluir 0, 20, 25 y 30% de un activador con núcleo activo de *Samanea saman* como suplemento de una dieta básica de pasto estrella (*Cynodon nlenfuensis*), encontrando que el activador incrementó la población de bacterias celulolíticas en relación al tratamiento control sin suplementar y la mejor respuesta se observó cuando se utilizó 20 y 30% del mismo en la dieta, los valores de las medias de bacterias celulolíticas fueron de 24.00 y 29.33×10^7 UFC/ml respectivamente; estos resultados concuerdan con la presente investigación puesto que la densidad poblacional de bacterias celulolíticas se incremento al adicionar como suplemento la mencionada planta.

Por otro lado en la validación del efecto de *Samanea saman*, sobre la población de bacterias celulolíticas se estableció un comportamiento similar al determinado en Cuba, debido a que la población de bacterias celulolíticas es mayor a medida que se incrementa el tiempo principalmente debido a una reducción de protozoarios y bacterias metanogénicas, de esta manera a la hora 2 se registró una población de 23.33×10^5 UFC/ml, incrementándose a 25.67×10^5 UFC/ml a la hora 4 y a 34.67×10^5 UFC/ml a las 8 horas. Cuadro 13.

3. Bacterias metanogénicas

Dentro de la cuantificación de bacterias metanogénicas se registró 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 determinó 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 determinó diferencias estadísticas es así que

los promedios del 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. Cuadro 14.

A las 4 horas de evaluación, la densidad 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. Cuadro 14.

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. Cuadro 14.

Joblin, K. (1991), reportó que la población de bacterias metanogénicas en el rumen cuando se utilizan dietas fibrosas de baja calidad y suplementadas con un producto activador de la fermentación microbiana ruminal, que contiene leguminosas, se encuentra en el orden de 10⁷ UFC/ml, la misma que se deprime a medida que transcurre el tiempo de fermentación, este mismo comportamiento se registra en la presente investigación.

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 determinó diferencias estadísticas (P<0.01), con diferentes comportamientos

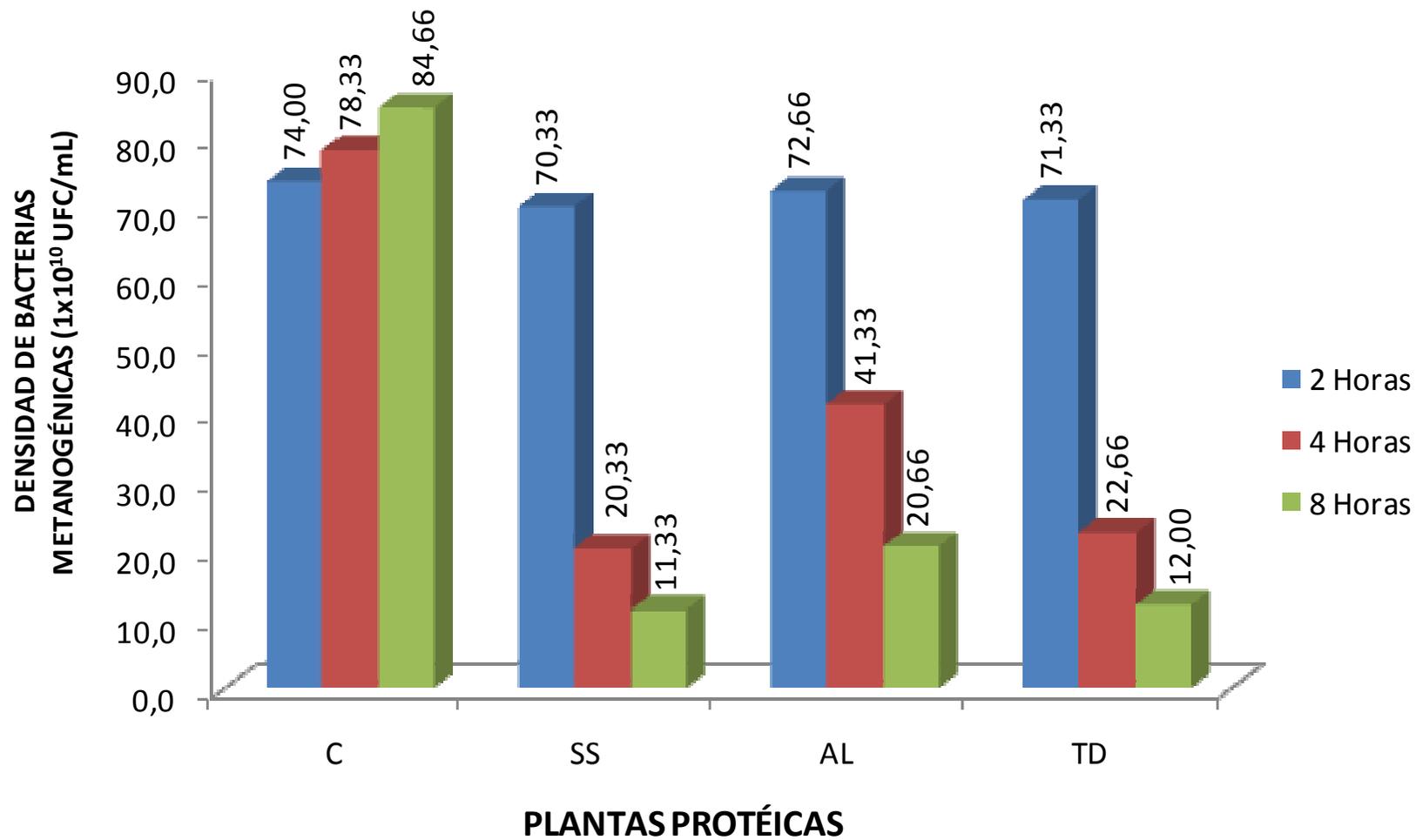
dentro de cada tipo de planta proteica evaluada y grupo control, de esta manera al comparar la densidad de bacterias metanogénicas dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 8 horas con 84.66×10^{10} UFC/ml, seguido por las densidades de bacterias obtenidas a las 4 y 2 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 78.33 y 74.00×10^{10} UFC/ml respectivamente. Cuadro 14. Gráficos 6 y 7.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, la densidad 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 70.33×10^{10} UFC/ml, seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 20.33×10^{10} UFC/ml mientras que el menor promedio se registró a las 8 horas con 11.33×10^{10} UFC/ml, lo cual indica un descenso en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo. Cuadro 14. Gráficos 6 y 7.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbek* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 2 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 72.66×10^{10} UFC de bacterias metanogénicas/ml, seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 41.33×10^{10} UFC/ml mientras que el menor promedio se registró a las 8 horas con 20.66×10^{10} UFC/ml, lo cual indica un descenso en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo. Cuadro 14. Gráficos 6 y 7.

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 71.33×10^{10} UFC/ml de bacterias metanogénicas, posteriormente se ubicó el promedio de densidad de bacterias metanogénicas a las 4 horas con 22.66×10^{10} UFC/ml y con el menor promedio la densidad de bacterias alcanzada a las 8 horas de evaluación con 12.00×10^{10} UFC/ml. Cuadro 14. Gráficos 6 y 7.

Lezcano, O. (1990), la inclusión de *Sapindus saponaria* a razón de 2.5; 5 y 10 %



SS: *Samanea saman* TD: *Tithonia diversifolia* AL: *Albizia lebbeck* C: Control

Gráfico 6. Densidad de Bacterias Metanogénicas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

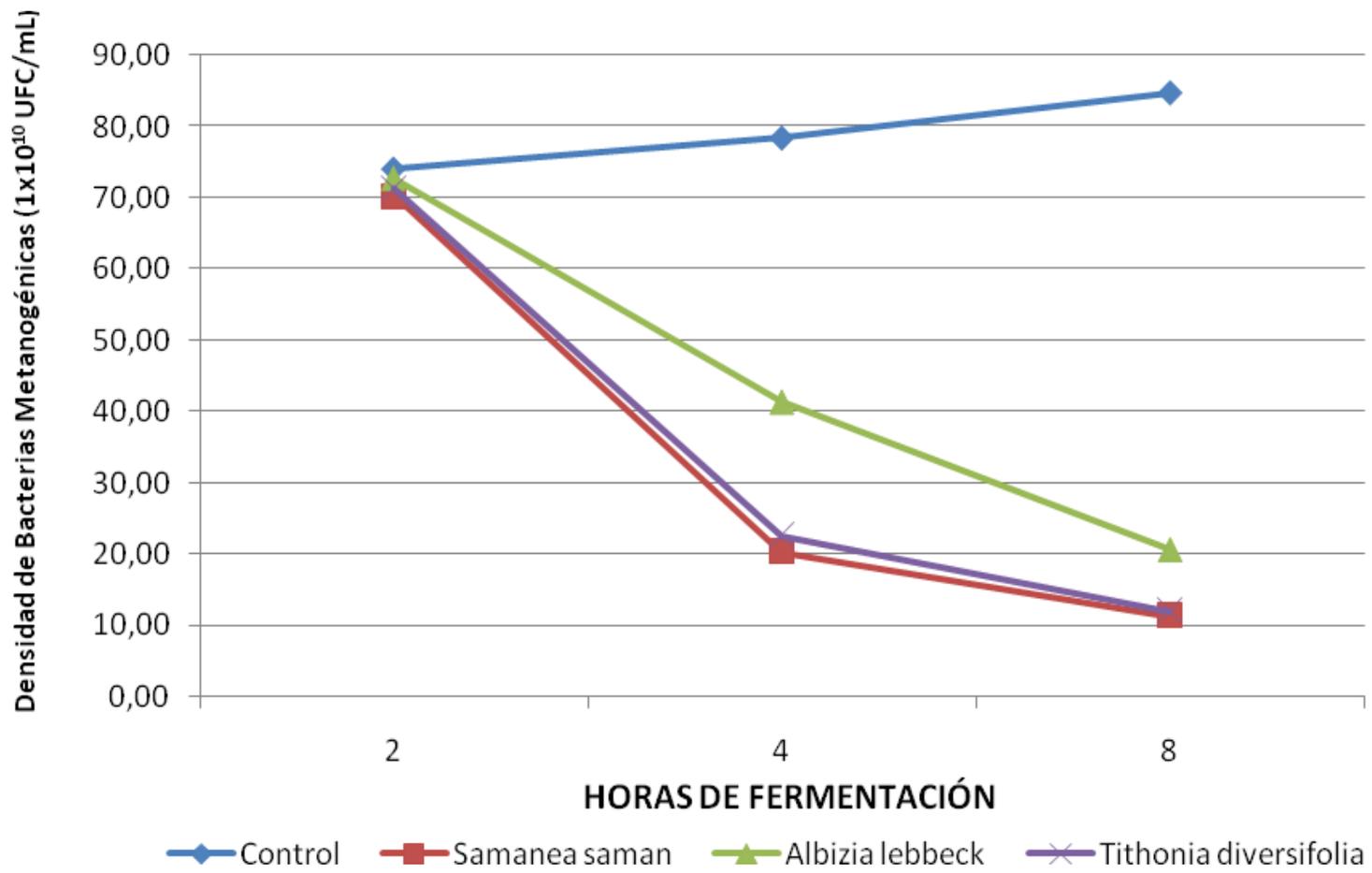


Gráfico 7. Comportamiento de la densidad de Bacterias Metanogénicas en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*” de acuerdo al tiempo de fermentación.

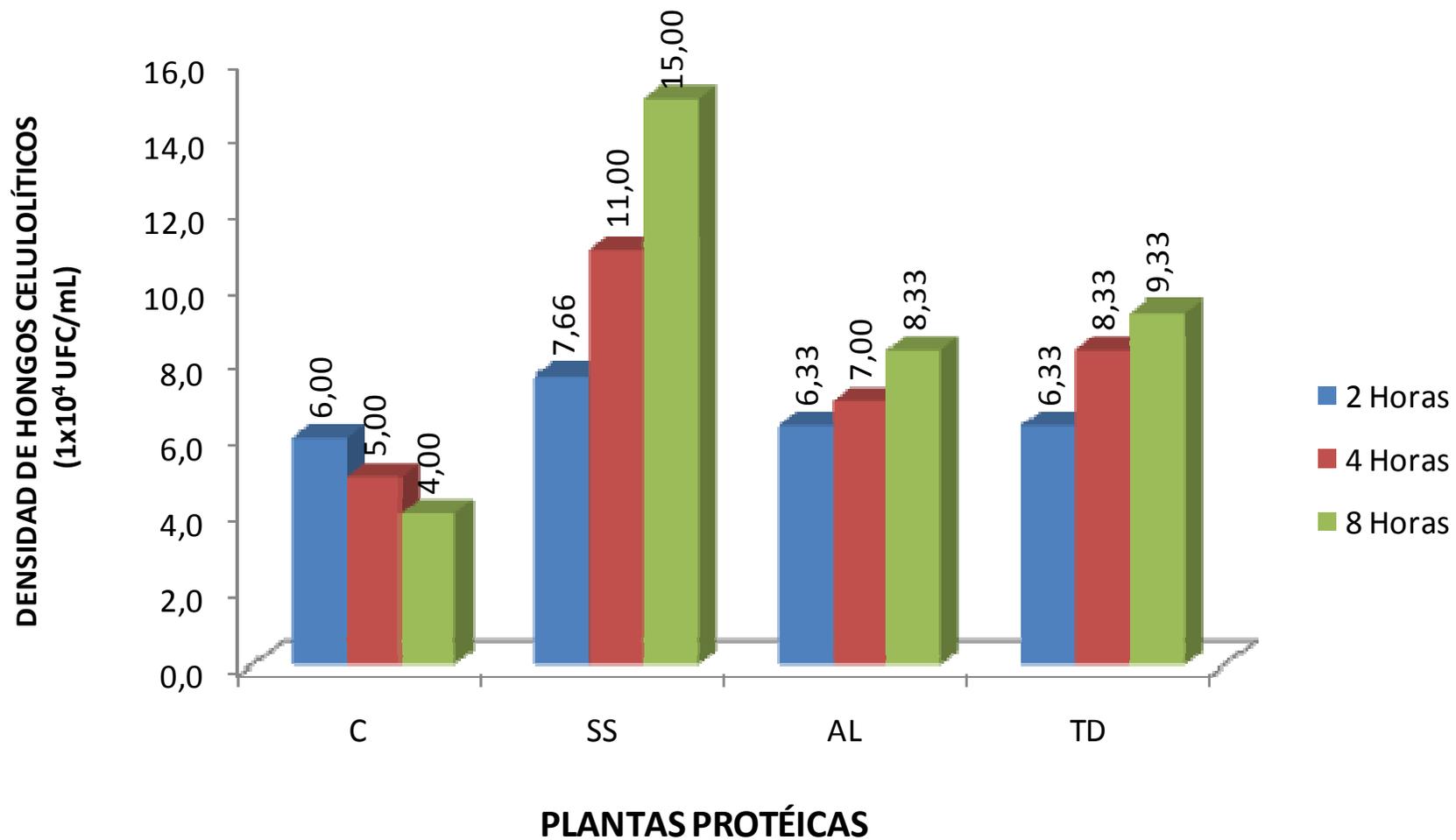
de la MS, para evaluar su efecto como posible planta defaunante, produjo una reducción significativa en los metanógenos. Las especies de bacterias metanogénicas que más fuertemente se afectaron por la presencia de esta planta fueron *Methanobacterium formicium*, *Methanobacterium bryantii* y *Methanobrevibacter ruminantium* reduciendo su población a 1/3 de la original. La suplementación con esta planta activa la población de hongos celulolíticos viables, los que duplican su representación a partir del nivel de inclusión de 5 %. Igual comportamiento presentaron las zoosporas de los referidos hongos.

En cuanto a los resultados de la validación del efecto de *Samanea saman*, sobre esta variable se determinó que a medida que transcurre el tiempo la población de bacterias metanogénicas disminuye como consecuencia de la disminución de la población de protozoarios por efecto de los metabolitos presentes en la planta proteica *Samanea saman*, es así que a la hora 2 se registró una población de 82.67×10^{10} UFC/ml, disminuyendo a 32.00 y 13.33×10^{10} UFC/ml a las 4 y 8 horas correspondientemente, lo que coincide con los resultados obtenidos en Cuba. Cuadro 13.

4. Hongos celulolíticos

La densidad de hongos celulolíticos registró diferencias significativas ($P < 0.01$), dentro de los tratamientos de los factores en estudio, así mismo 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 determinó 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 6.33×10^4 UPC/ml para los grupos de unidades experimentales correspondientes al grupo control y aplicación in vitro de *Samanea saman*, *Albizia lebbek* y *Tithonia diversifolia* respectivamente. Cuadro 14. Gráficos 8 y 9.



SS: Samanea saman TD: Tithonia diversifolia AL: Albizia lebeck C: Control

Gráfico 8. Densidad de Hongos Celulolíticos en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

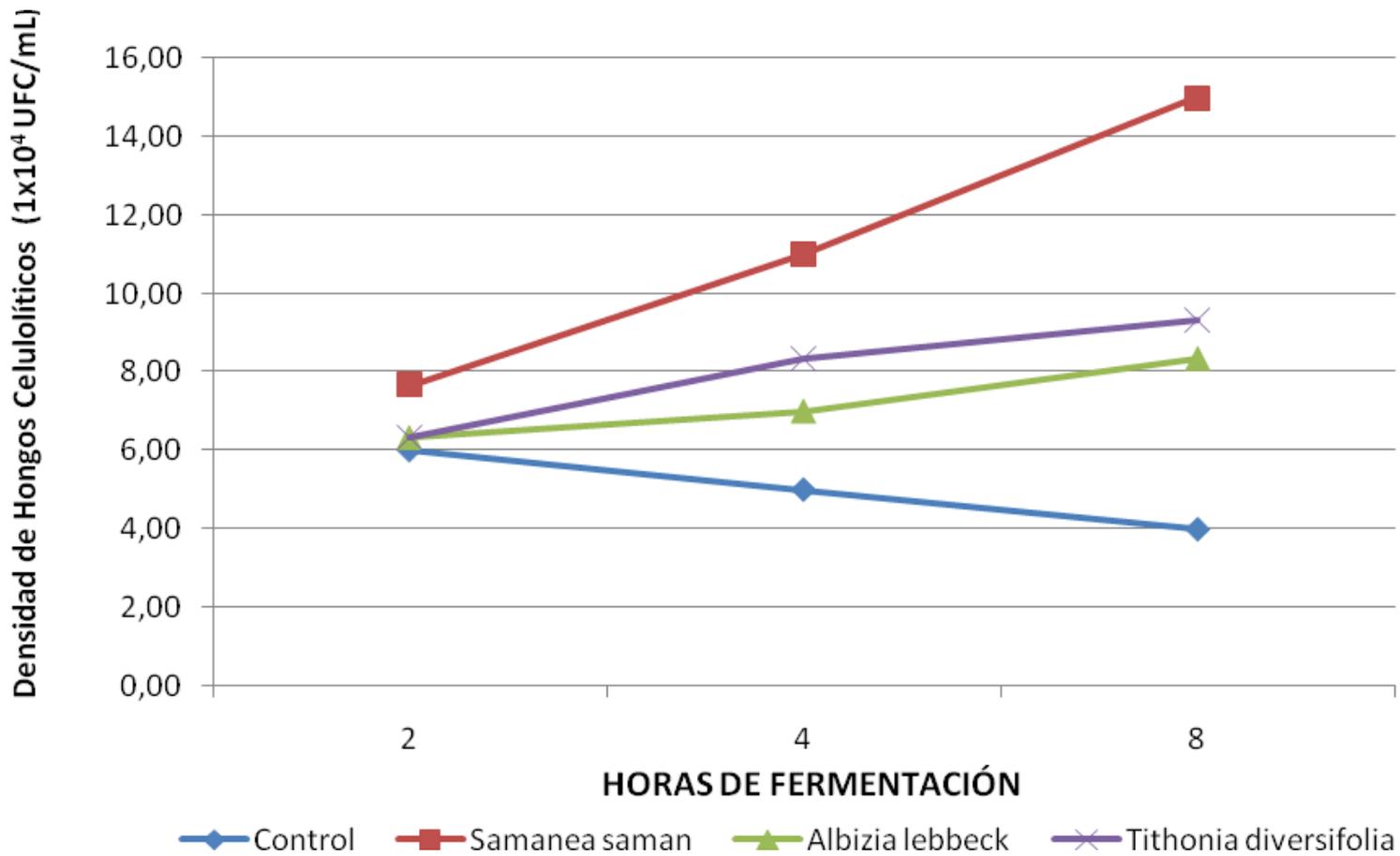


Gráfico 9. Comportamiento de la densidad de Hongos Celulolíticos en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*” de acuerdo al tiempo de fermentación.

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 11.00×10^4 UPC/ml, seguida por los promedios obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *Tithonia diversifolia* y *Albizia lebbbeck* con promedios de 8.33 y 7.00×10^4 UPC/ml respectivamente, en última instancia el grupo control presentó la menor densidad de hongos celulolíticos con 5.00×10^4 UPC/ml. Cuadro 14. Gráficos 8 y 9.

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 15.00×10^4 UPC/ml, seguida por los promedios obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *Tithonia diversifolia* y *Albizia lebbbeck* con promedios de 9.33 y 8.33×10^4 UPC/ml respectivamente, en última instancia el grupo control presentó la menor densidad de hongos celulolíticos a esta hora de evaluación con 4.00×10^4 UPC/ml. Cuadro 14. Gráficos 8 y 9.

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 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 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 4.00×10^4 UPC/ml a las 2, 4 y 8 horas. Cuadro 14. Gráficos 8 y 9.

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 15.00×10^4 UPC/ml, posteriormente se ubicó el promedio de densidad de hongos celulolíticos a las 4 horas con 11.00×10^{10} UPC/ml y con el menor promedio la densidad de hongos alcanzada a las 2 horas de evaluación con 7.66×10^{10} UPC/ml, lo cual indica que la población de hongos celulolíticos se incrementa con el transcurso del tiempo. Mediante la incorporación

in vitro de *Albizia lebbek* se determinó un comportamiento que no difiere en función del tiempo, registrando promedios de 6.33, 7.00 y 8.33×10^4 UPC/ml a las 2, 4 y 8 horas. Cuadro 14. Gráficos 8 y 9.

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 9.33×10^4 UPC/ml de hongos celulolíticos, posteriormente se ubicó el promedio de densidad de hongos celulolíticos a las 4 horas con 8.33×10^4 UPC/ml y con el menor promedio la densidad de hongos alcanzada a las 2 horas de evaluación con 6.33×10^4 UPC/ml. Cuadro 14. Gráficos 8 y 9.

En la validación del efecto de *Samanea saman*, sobre la densidad de hongos celulolíticos se estableció un comportamiento similar al determinado en Cuba, debido a que la población de los mismos es mayor a medida que se incrementa el tiempo, posiblemente debido a la reducción de protozoarios y bacterias metanogénicas en el rumen, es así que a la hora 2 se registró una densidad de 8.33×10^4 UPC/ml, incrementándose a 11.20×10^4 UPC/ml a la hora 4 y a 16.33×10^4 UPC/ml a las 8 horas de evaluación. Cuadro 13

.

5. Protozoarios

En la cuantificación de protozoarios se registró 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 determinó 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 determinó diferencias estadísticas es así que la menor cantidad de protozoarios se determinaron mediante 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. Cuadro 14.

A las 4 horas de evaluación, la densidad de protozoarios obtenida 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. Cuadro 14.

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. Cuadro 14.

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

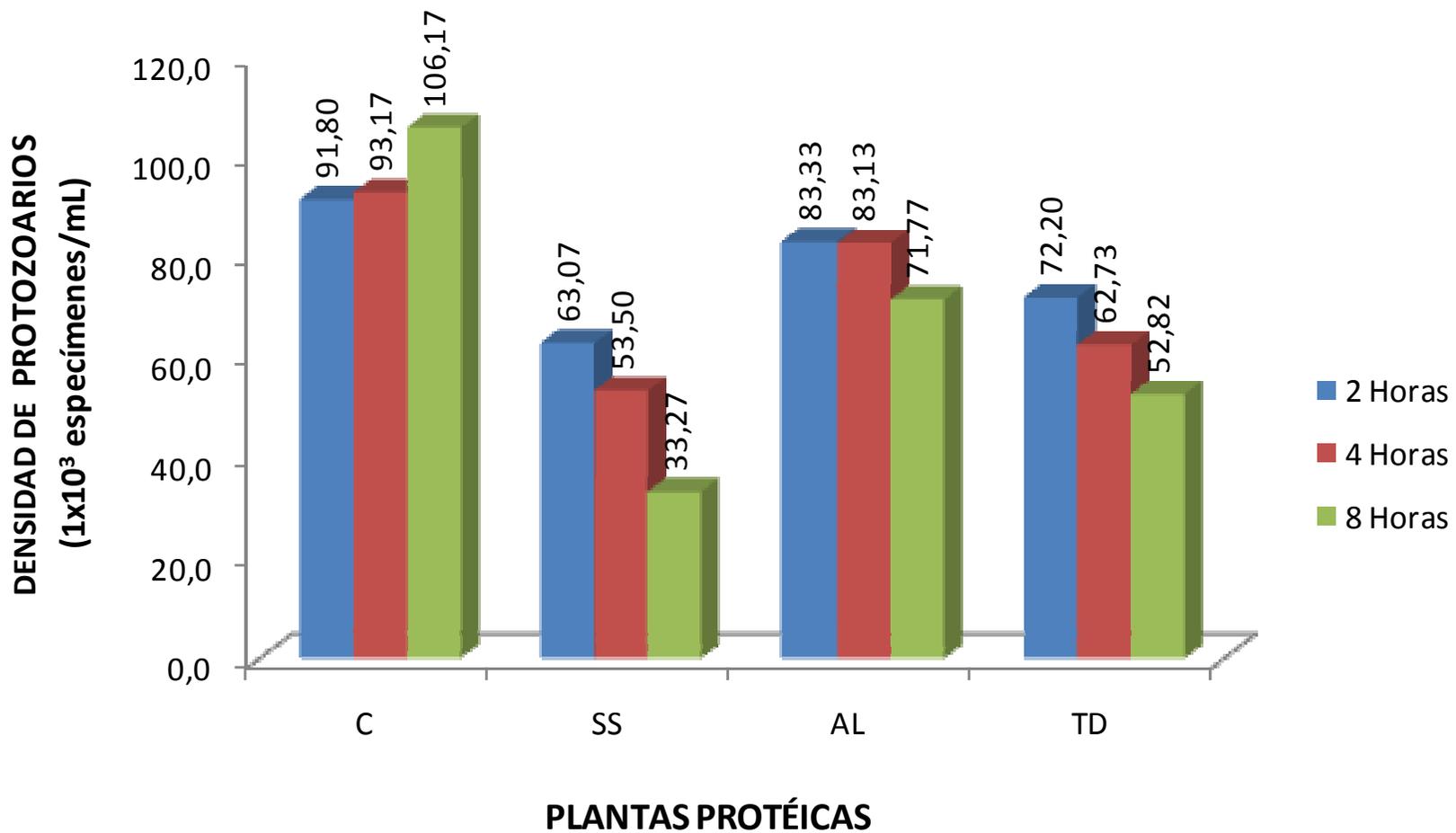
determinaron densidades de 93.17 y 91.80×10^3 especímenes/ml respectivamente. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

Por otro lado mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, la densidad 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. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

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. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

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. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

Los resultados obtenidos en la validación del efecto de *Samanea saman*, sobre la densidad de protozoarios demostraron que a medida que transcurre el tiempo la densidad de especímenes/ml disminuye por efecto de los metabolitos presentes en la planta proteica *Samanea saman* que provocan reacciones irreversibles a partir del colesterol presente en la membrana celular de los protozoos provocando lisis celular por destrucción de la membrana, de esta manera a la hora 2 se



SS: *Samanea saman* TD: *Tithonia diversifolia* AL: *Albizia lebbek* C: Control

Gráfico 10. Densidad de Protozoarios en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

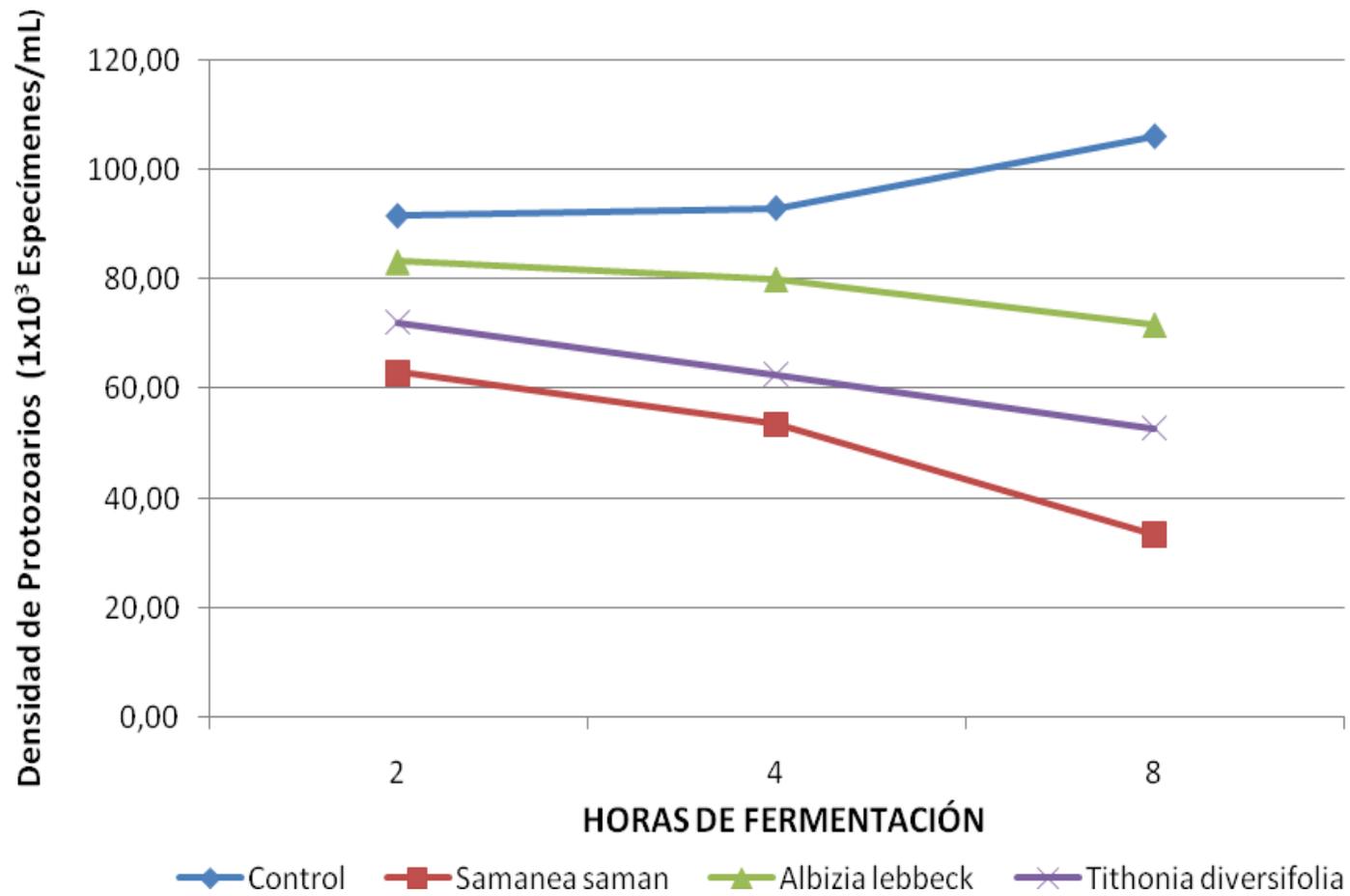


Gráfico 11. Comportamiento de la densidad de Protozoarios en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*” de acuerdo al tiempo de fermentación.

determinaron densidades de 93.17 y 91.80×10^3 especímenes/ml respectivamente. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

Por otro lado mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, la densidad 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. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

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. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

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. Cuadro 14. Gráficos 10 y 11.

Los resultados obtenidos en la validación del efecto de *Samanea saman*, sobre la densidad de protozoarios demostraron que a medida que transcurre el tiempo la densidad de especímenes/ml disminuye por efecto de los metabolitos presentes en la planta proteica *Samanea saman* que provocan reacciones irreversibles a partir del colesterol presente en la membrana celular de los protozoos provocando lisis celular por destrucción de la membrana, de esta manera a la hora 2 se

registró una densidad de 68.00×10^3 especímenes/ml, disminuyendo a 52.30 y 31.18×10^3 especímenes/ml a las 4 y 8 horas en su orden, obteniéndose un comportamiento similar al presentado en Cuba. Cuadro 13.

6. pH

En la evaluación del pH se registró diferencias significativas ($P < 0.01$), entre los tratamientos de los dos factores evaluados, determinándose además interacción significativa entre factores, encontrándose los siguientes resultados:

Para el pH en función al tipo de planta proteica dentro de cada hora de evaluación, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada periodo de tiempo evaluado, de esta manera al comparar la densidad de pH a las 2 horas no se determinó diferencias estadísticas alcanzando promedios de pH de 6.56, 6.63, 6.53 y 6.63 para el grupo control, *Samanea saman*, *Albizia lebeck* y *Tithonia diversifolia* respectivamente. Cuadro 14.

A las 4 horas de evaluación, el pH obtenido mediante la incorporación de plantas proteicas *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior el pH obtenido en el empleo de *Samanea saman* con un promedio de 6.36, seguido del grupo control y de la utilización de la *Tithonia diversifolia* con promedios de pH de 6.27 y 6.26 y finalmente mediante la utilización *in vitro* de plantas proteicas encontramos a la *Albizia lebeck* con un pH de 6.17. Cuadro 14.

Por otro lado a las 8 horas de evaluación, el pH registro diferencias estadísticas al ser incorporadas de forma *in vitro* las plantas proteicas, en donde, el mayor promedio obtuvo el tratamiento control con un valor de 6.86, seguido de *Samanea saman*, *Albizia lebeck* y *Tithonia diversifolia* con promedios de 6.63 para los tres grupos respectivamente. Cuadro 14.

Al comparar los promedios de pH, 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 de planta proteica evaluada y grupo

control, de esta manera al comparar el pH dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 8 horas con 6.86, seguido por los valores de pH obtenidos a las 2 y 4 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 6.56 y 6.26 respectivamente. Cuadro 14.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, el pH difiere estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior el promedio de pH a las 2 y 8 horas alcanzando un valor de 6.63, el menor promedio se registro a las 4 horas de evaluación con un valor de 6.36, lo cual indica que el pH varía en función de las horas. Cuadro 14.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbek* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 8 y 2 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 6.63 y 6.53 respectivamente, a las 4 horas de evaluación se registro un promedio de pH 6.17, lo cual indica que el pH varía en función de las horas. Cuadro 14.

Así mismo 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 pH a las 8 y 2 horas de evaluación con 6.73 y 6.63, mientras que el menor valor de pH se registra a las 4 horas de evaluación con un promedio de 6.27. Cuadro 14.

7. Producción de Amoníaco

Dentro de la determinación de Amoníaco se registró diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos de los dos factores evaluados, estableciéndose interacción significativa entre factores, encontrándose los siguientes resultados:

Para la producción de Amoníaco en relación al tipo de planta proteica dentro de cada hora de evaluación, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada periodo de tiempo evaluado, de esta manera al comparar la producción de NH_3 a las 2 horas no se determinó diferencias estadísticas presentando promedios de 15.59, 14.59, 14.93 y 14.68

mmol/lit para el grupo control y los grupos tratados mediante la incorporación *in vitro* de *Samanea saman*, *Albizia lebbbeck* y *Tithonia diversifolia* correspondientemente. Cuadro 14.

A las 4 horas de evaluación, la producción de NH₃ obtenida mediante la incorporación de plantas proteicas *in vitro* difieren estadísticamente en relación al tratamiento control, encontrándose que la mayor concentración de este gas se reporta en el grupo control donde no se utilizó plantas proteicas con un promedio de 16.23 mmol/lit, en relación a los grupos tratados mediante la incorporación de plantas proteicas se registra que no hay diferencia estadística presentando promedios de 11.99, 13.05 y 12.50 mmol/lit para *Samanea saman*, *Albizia lebbbeck* y *Tithonia diversifolia* respectivamente. Cuadro 14.

Por otro lado a las 8 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada, determinándose las mayores producciones de NH₃ para el grupo control con un promedio de 16.74 mmol/lit la cual difiere estadísticamente de los grupos tratados con la inclusión *in vitro* de *Samanea saman*, *Albizia lebbbeck* y *Tithonia diversifolia* con promedios de 10.82, 11.90 y 11.82 mmol/lit respectivamente. Cuadro 14.

Al realizar la comparación de los promedios de la producción de amoníaco, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de planta proteica, no se determinó diferencias estadísticas (P<0.01), dentro del grupo control, de esta manera al comparar la concentración de amoníaco dentro del mencionado grupo se determinó el mayor promedio a las 8 horas con 16.74 mmol/lit, seguido por la producción de NH₃ obtenida a las 4 y 2 horas de evaluación en las cuales se determinaron concentraciones de 16.23 y 15.59 mmol/lit respectivamente. Cuadro 14. Gráfico 12.

Por otra parte al incluir *Samanea saman*, las producciones de este gas difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la producción de NH₃ a las 2 horas alcanzando un promedio de 14.59 mmol/lit, seguida por el promedio obtenido a las 4 horas de evaluación con 11.99 mmol/lit la cual no difiere estadísticamente del periodo evaluado a las 8 horas donde se

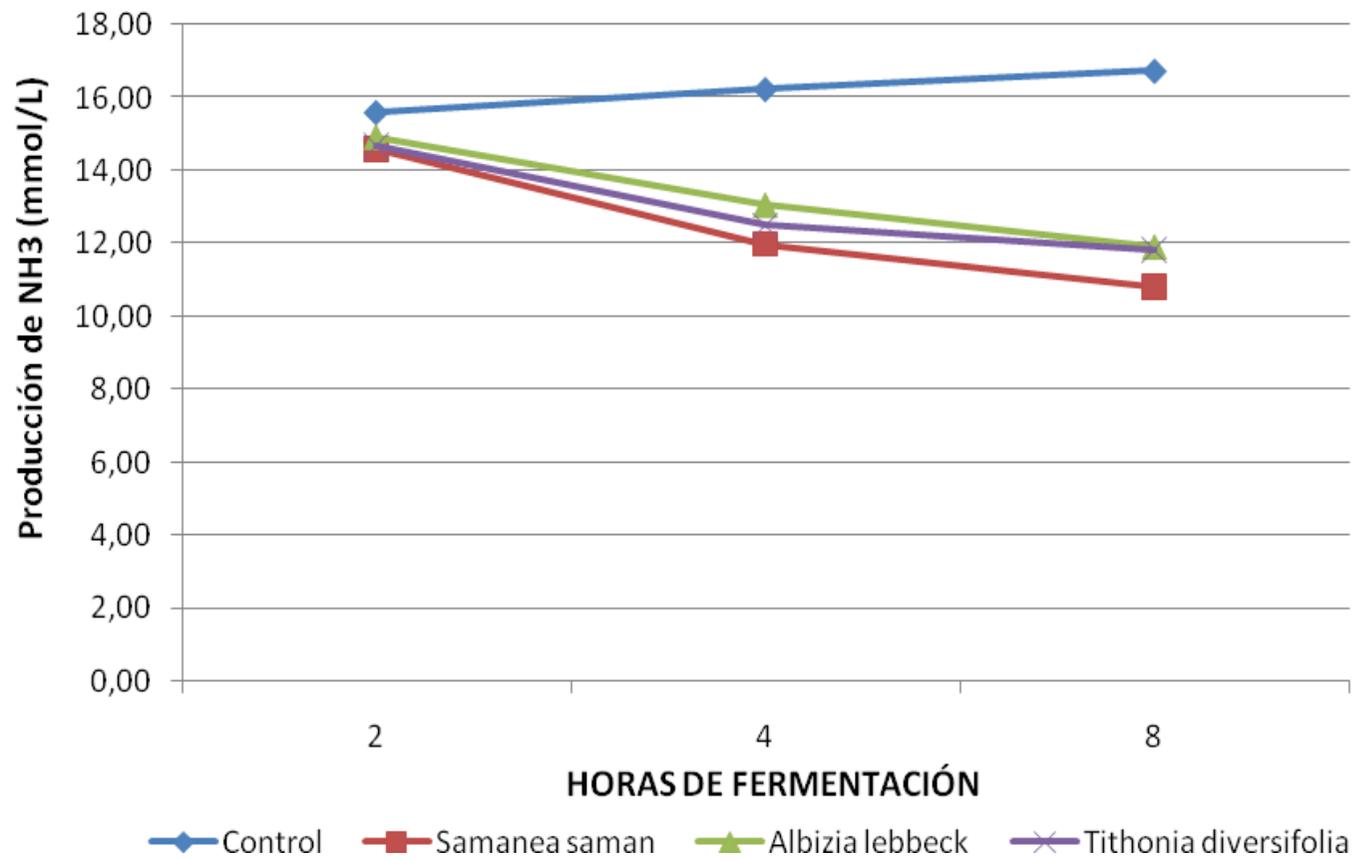


Gráfico 12. Producción de amoníaco en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*” de acuerdo al tiempo de fermentación.

registra un promedio de producción de 10.82 mmol/lit, lo cual indica que hay un descenso en la producción de amoníaco a medida que transcurre el tiempo. Cuadro 14. Gráfico 12.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Albizia lebbbeck* se determinó un comportamiento similar al tratamiento anteriormente comparado, es así que a las 2 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 14.93 mmol/lit, seguida por el promedio obtenido a las 4 y 8 horas de evaluación con 13.05 y 11.90 mmol/lit respectivamente, cabe recalcar que en los 2 últimos periodos de evaluación no se registro diferencias estadísticas. Cuadro 14. Gráfico 12.

Asimismo al incorporar de manera *in vitro* la planta proteica *Tithonia diversifolia*, existe un comportamiento similar a las comparaciones anteriormente realizada con la incorporación de plantas proteicas, determinándose el mayor promedio de amoníaco a las 2 horas de evaluación con 14.68 mmol/lit, posteriormente se ubicaron los promedios obtenidos a las 4 y 8 horas de evaluación registrando una producción de NH₃ de 12.50 y 11.82 mmol/lit. Cuadro 14. Gráfico 12.

D. COSTOS DE LA INCORPORACION DE PLANTAS PROTEICAS EN LA PRODUCCION DE BOVINOS

El costo de establecimiento de un banco de proteína de *Samanea saman* para bovinos en el trópico alcanza los 137.00 USD/ha, lo cual resulta asequible para los productores puesto que los beneficios obtenidos por el mismo se reflejan en estudios realizados por Herrera, Z. (1997), el que reporta un incremento en la producción lechera de 0,5 a 1,1 lt/animal/día, por otra parte manifiesta que ayuda a mejorar el estado físico, el desarrollo y la reproducción.

La implementación de una hectárea de este banco de proteína servirá para alimentar a 20 animales en producción, con un suministro de 2,5 Kg de *Samanea saman* como suplemento diario, desde el punto de vista económico, productivo y ambiental queda plenamente justificado el uso de plantas proteicas para reducir la producción de metano a nivel de rumen, incrementando la población de bacterias y hongos celulolíticos que incrementarán el aprovechamiento de los nutrientes aportados por los alimentos. Cuadro 15.

Cuadro 15. COSTO DE ESTABLECIMIENTO DE BANCO DE PROTEINA PARA LA SUPLEMENTACIÓN DE BOVINOS.

	Cantidad	Costo U	Subtotal
Mano de obra (siembra), U	1	7	7
Mano de obra (cosecha), U	10	7	70
Semilla, Kg	1	15	15
Fertilizantes, kg	40	1,125	45
COSTO TOTAL/ Ha (USD)			137

Fuente: Zabala, D. (2008).

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye lo siguientes:

1. El contenido de materia seca en las plantas proteicas utilizadas en el presente estudio fue de 86.96 ± 2.43 % mientras que la proteína registró un promedio de 20.21 ± 4.39 % la misma que involucra la presencia de metabolitos que disminuyen la metalogénesis ruminal.
2. La mayoría de plantas proteicas evaluadas registraron la presencia de Taninos, Saponinas, Triterpenos, Reductores y Alcaloides, lo que afectó a la población de especies nativas del rumen.
3. 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 lebbek*.
4. La utilización de *Samanea saman* en la digestibilidad in vitro, permitió disminuir la población de protozoos y bacterias metanogénicas con la consecuente proliferación de bacterias y hongos celulolíticos.
5. 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.
6. El costo de establecimiento de un banco de proteína de *Samanea saman* para bovinos en el trópico alcanza los 137.00 USD/ha, lo cual resulta asequible para los productores puesto que los beneficios obtenidos por un mejor aprovechamiento de los nutrientes del alimento se verá reflejado en los parámetros productivos.
7. La utilización de *Samanea saman* en rumiantes mayores presentó resultados similares en Cuba y Ecuador, provocando efectos positivos sobre la ecología microbiana del rumen.

VI. RECOMENDACIONES

1. 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.
2. Realizar otras investigaciones donde se evalúe el efecto de plantas proteicas in vivo, a fin de determinar el comportamiento productivo y reproductivo de bovinos en el trópico.
3. Difundir los resultados obtenidos en la investigación a nivel de ganaderos del trópico ecuatoriano, para dar a conocer los beneficios de la utilización de bancos de proteína en la producción bovina.

VII. LITERATURA CITADA

1. A.O.A.C., 1995. Official methods of analysis 15a ed. Assoc. Of official Analytical Chemists. Artlington, V. A. pp 150 – 156.
2. BARRY, T. N. AND MC NABB, W. C. 1999. The Effect of Condensed Tannins in Temperate forages on Animal Nutrition and Productivity. In Tannins in Livestock and Human Nutrition, Edit. J D Brooker, pp 30-35.
3. BEAUCHEMIN, K.A. & MCGINN, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil and canola oil. Journal of Animal Science v 84: pp 1489 -1496.
4. BLAXTER, K. L. AND CLAPPERTON, J. L. 1995. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. Br. J. Nutr. v 19: pp 511 - 522.
5. BRYANT, M.P. 1999. Microbial methano production: Theoretical aspect. J. Anim. Sci. v 48: p 193.
6. CALDWELL, D.R. & BRYANT, M.P. 1996. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microbiol. v 14: p 794.
7. CARMONA, JUAN C; BOLÍVAR, DIANA M. & GIRALDO, LUIS A., 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo Rev. Coloma. cienc. pecu. 18(1) pp 49 - 63.
8. CARRO, M.D., RANILLA, M.J., GIRÁLDEZ, F.J. & MANTECÓN, A.R. 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet J. Anim. Sci. v 84: pp 405 - 410.
9. DAWSON, K.A., NEWMAN, K.E. & BOLING, J.A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. J. Anim. Sci. v 68: pp 3392 - 3398.

10. DEMEYER, D.L. & FIEVEZ, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. Ann. Zootech. pp 49 - 95.
11. DURÁN, F. 2009. Cultivo de pastos y forrajes: silvopastoriles-forraje verde hidropónico. 1a ed primera edición, Bogotá, Colombia. Edit. Latino Editores. p 22.
12. EILERT, U.; WOLTERS, B.; NAHRSTEDT, A. 2000. Antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera*. Planta Medical. 39(3): p 235.
13. GALINDO, J. & MARRERO, Y. 2005. Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. Rev. Cubana Cienc. Agríc. v 39: pp 439 - 450.
14. GALINDO, J. 1998. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje Tesis PhD. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
15. GALINDO, J., MARRERO, Y., GONZÁLEZ, N. & ALDANA, A. 2005. Caracterización de la actividad celulolítica en el líquido de rumen filtrado. Rev. Cubana Cienc. Agríc. v 38: p 259.
16. GALINDO, J. 2001. Efecto de *Albizia lebbek* en la población protozoaria y organismos celulolíticos ruminales. Rev. Cubana Cienc. Agríc. , v 35: p 3.
17. GLOVER, N. 1997. Variation among provenances of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. and implications for genetic improvement. En: *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp.: Management and Improvement: Actas; 1987 June 21-27; Turrialba, Costa Rica. Publicación especial 87-01. Waimanalo, HI: Nitrogen Fixing Tree Association.
18. HARRISON, G.A., HEMKEN, R.W., DAWSON, K.A., HARMON, R.J. & BARKER, K.B. 1998. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. Edit. J. Dairy Sci. v 71: pp 2967 - 2975.

19. HERRERA, Z. 1997. Genízaro. Afiche en Revista Forestal Centroamericana No. 18, CATIE, Turrialba, Costa Rica.
20. HUNGATE, R. G. 1950. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. Bacterial Ref. Vol. 14 (1).
21. JOBLIN K.N. 1991. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Applied and Environ. Microb. p 1119.
22. JOHNSON, D.E., JOHNSON, K.A., WARD, G.M. & BRANINE, M.E. 2000. 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, p. 112.
23. KURIHARA, M. AND TERADA, F. 2001. Livestock Production and Greenhouse Gas Emission. Calidad de las Carnes Bovinas Argentinas. Edit. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. v 3: pp 55 -68.
24. LEZCANO, O. 1990. Estudio in vitro de la inclusión de *Sapindus saponaria* en la actividad microbiana. Rev.Cub.Cienc.Agric. v 24: p 187.
25. MACHMÜLLER, A. & M. KREUZER. 1999. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. Can. Edit. J. Anim. Sci. v 79: pp 65 - 72.
26. Mc GINN, S.M., BEAUCHEMIN, K.A., COATES, T. & COLOMBATTO, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. Edit. J. Anim. Sci. v 82: pp 3346.
27. MCCRABB, G. J. 2002. Nutritional options for abatement of methane emissions from beef and dairy systems in Australia. Greenhouse Gases and Animal Agriculture. Edit. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 115 - 124.

28. MCALLISTER, T.A., OKINE, E.K., MATHISON, G.W. & CHENG, K.J. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. Edit. J. Anim. Sci.* v 76: p 23.
29. MENDIETA, R.M.; AMO, S. 1998. Plantas medicinales del Estado de Yucatán. Ciudad de México, México: Compañía Editorial Continental. p 428.
30. MILLER-WEBSTER, T., HOOVER, W.H., HOLT, M. & NOCEK, J.E. 2002. Influence of Yeast Culture on Ruminal Microbial Metabolism in Continuous Culture. *Edit. J. Dairy Sci.* v 85: pp 2009 - 2014.
31. MOSS, A.R., JOUANY, J.P. & NEWBOLD, J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* v 49: p 231
32. PENNINGTON, T.D.; SARUKHAN, J. 1998. Árboles tropicales de México. Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. p 413.
33. PINTO R., H. Gómez, A. Hernández, F. Medina, B. Martínez, V.H. Aguilar, I. Villalobos, J. Nahed y J. Carmona. 2003. Preferencia ovina de árboles forrajeros del Centro de Chiapas, México. *Pastos y Forrajes*, 26(4): pp. 329-334.
34. RAO, P. 1994. Alternate host plants for two lepidopterous pests. *Indian Journal of Entomology.* 36(4): pp 353 - 354.
35. ROSALES M. 1992. Nutritional value of Colombian fodder trees. *Fundación Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria y Natural Resources Institute United Kingdom.* p 50.
36. ROSKOSKI, J.P.; PEPPER, I.; PARDO, E.1999. Inoculation ofleguminous trees with rhizobia and VA mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management.* v 16: pp 57 - 68.
37. SOLIVA, C.R., MEILE, L., HINDRICHSEN, I.K., KREUZER, M. & MACHMÜLLER, A. 2004. Myristic acid supports the immediate

inhibitory effect of lauric acid on ruminal methanogens and methane release. *Anaerobe*. v 10: p 269.

38. SOTELO A, M. Soto y B. Lucas. 1996. Comparative studies of the alkaloids composition of two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of the detoxified seeds. *J. Agric. Food Chem.* v 41: pp 2340 - 2343.
39. THEODOROU, M.K, WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S., MCALLAN, A.B. & FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.* v 48: p 185.
40. VALIÑO, E. 1999. Efecto de la inclusión de torta de soya tratada con taninos en un suplemento comercial sobre la producción y la calidad de la leche. *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias.* v 12: pp 40 – 43.
41. VARGAS, J E. 1992. Evaluación de la aceptación del botón de oro en la dieta de las ovejas de pelo. Documento sin publicar.
42. VILLANUEVA, G.R. 1994. Plantas de importancia apícola en el Ejido de Plan del Río, Veracruz, México: *Biótica*. 9(3): pp 279 - 340.
43. WALLACE, R.J. & NEWBOLD, C.J. 1993. Rumen fermentation and its manipulation: the development of yeast cultures as feed additives. En: *Biotechnology in the feed Industry*. Lyons, T.P. Ed. Alltech Technical Publicatons, Nicholavsville, Kentucky, pp.173 - 192.
44. YANTASATH, K.; SUPATANAKUL, W.; UNGVICHIAN, I. 1995. V. Pulping and papermaking characteristics of fast growing trees. *Nitrogen Fixing Tree Research Reports*. v 3: pp 54 - 56.
45. ZINDER, S.H. 1992. Methanogenesis. En: *Encyclopedia of Microbiology*, Lederberg, J. Ed. Academic Press, San Diego. v 3. p. 81.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de la producción de gases en la evaluación de plantas proteicas sobre la metanogénesis ruminal “*in vitro*”.

a. PRODUCCIÓN DE GAS METANO (μ l)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	143	59793.68810			
P	11	59776.13692	5434.19427	64863.3	<.0001
H	3	5.26546	1.75515	20.95	<.0001
P*H	33	4.24292	0.12857	1.53	0.0559
Error	96	8.04280	0.08378		

%CV	DS	MM
1.165126	0.289446	24.84250

Duncan	Media	N	Plantas Proteicas
A	65.3025	12	C
B	64.6775	12	EC
C	37.9892	12	GU
D	29.0308	12	GS
E	25.2800	12	MO
F	20.0400	12	PD
G	16.3650	12	LL
H	11.7050	12	CA
I	9.1817	12	AL
J	8.5267	12	AI
K	5.6975	12	TD
L	4.3142	12	SS

Duncan	Media	N	Horas
A	25.15611	36	8
B	24.81944	36	12
C B	24.74806	36	24
C	24.64639	36	4

SS: *Samanea saman*

TD: *Tithonia diversifolia*

AI: *Azadirachta indica*

AL: *Albizia Lebbeck*

CA: *Cordia alba*

LL: *Leucaena leucocephala*

PD: *Pithecelobium dulce*

MO: *Moringa oleifera*

GS: *Gliricidia sepium*

GU: *Guazuma ulmifolia*

EC: *Enterolobium cyclocarpum*

C: Control

b. PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL (ml)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	143	6695.437500			
P	11	1680.187500	152.744318	97.32	<.0001
H	3	4493.465278	1497.821759	954.36	<.0001
P*H	33	71.118056	2.155093	1.37	0.0623
Error	96	150.666667	1.569444		

%CV	DS	MM
8.602745	1.252775	14.56250

Duncan	Media	N	Plantas Proteicas
A	20.4167	12	C
B	19.1667	12	MO
C	17.2500	12	LL
D C	16.7500	12	GU
D E	16.0000	12	GS
E	15.3333	12	EC
F	13.5000	12	CA
G F	12.8333	12	PD
G	12.3333	12	AL
G	12.2500	12	AI
H	10.7500	12	TD
I	8.1667	12	SS

Duncan	Media	N	Horas
A	22.4444	36	4
B	17.0556	36	24
C	10.5278	36	8
D	8.2222	36	12

SS: *Samanea saman*

TD: *Tithonia diversifolia*

AI: *Azadirachta indica*

AL: *Albizia Lebbeck*

CA: *Cordia alba*

LL: *Leucaena leucocephala*

PD: *Pithecelobium dulce*

MO: *Moringa oleifera*

GS: *Gliricidia sepium*

GU: *Guazuma ulmifolia*

EC: *Enterolobium cyclocarpum*

C: *Control*

Anexo 2. Análisis de varianza de los indicadores microbiológicos y fermentativos dentro de la evaluación de plantas proteicas sobre la población de metanógenos ruminales “*in vitro*”.

a. DENSIDAD DE BACTERIAS VIABLES TOTALES

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Total	35	1961.000000			
P	3	1608.111111	536.037037	37.99	<.0001
H	2	4.666667	2.333333	0.17	0.8486
P*H	6	9.555556	1.592593	0.11	0.9940
Error	24	338.666667	8.111111		

%CV	DS	MM
7.44104	2.756476	32.83333

Duncan	Media	N	Plantas Proteicas
A	42.778	9	3
B	34.222	9	2
C	29.778	9	4
D	24.556	9	1

Duncan	Media	N	Horas
A	33.167	12	0
A	33.000	12	4
A	32.333	12	8

b. DENSIDAD DE BACTERIAS CELULOLÍTICAS

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	2298.888889			
P	3	1502.888889	500.962963	170.14	<.0001
H	2	330.888889	165.444444	56.19	<.0001
P*H	6	394.444444	65.740741	22.33	<.0001
Error	24	70.666667	2.944444		

%CV DS MM
 9.247572 1.715938 18.55556

H. Fermentación	T. Planta				Promedio
	Control	S. saman	A. lebbeck	T. diversifolia	
2	13,00	23,66	13,66	14,33	16,16
4	8,00	26,00	15,66	17,00	16,67
8	7,66	32,33	20,33	31,00	22,83
Promedio	9,55	27,33	16,55	20,78	18,55

C: Control SS: Samanea saman AL: Albizia lebbeck TD: Tithonia diversifolia

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: PLANTAS PROTEICAS DENTRO DE TIEMPO

Hora 2				Hora 4				Hora 8			
SS	TD	AL	C	SS	TD	AL	C	SS	TD	AL	C
23,66a	14,33b	13,66b	13,00b	26,00a	17,00b	15,66b	8,00c	32,33a	31,00a	20,33b	7,66c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE PLANTAS PROTEICAS

C			SS			AL			TD		
Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 8	Hora 4	Hora 2
13,00a	8,00ab	7,66b	32,33a	26,00b	23,66b	20,33a	15,66ab	13,66b	31,00a	17,00b	14,33b

c. DENSIDAD DE BACTERIAS METANOGÉNICAS

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	28379.63889			
P	3	11940.75000	3980.25000	1077.36	<.0001
H	2	10610.38889	5305.19444	1435.99	<.0001
P*H	6	5739.83333	956.63889	258.94	<.0001
Error	24	88.66667	3.69444		

%CV DS MM
 3.979033 1.922094 48.30556

H. Fermentación	T. Planta				Promedio
	Control	S. saman	A. lebbeck	T. diversifolia	
2	74,00	70,33	72,66	71,33	72,08
4	78,33	20,33	41,33	22,66	40,66
8	84,66	11,33	20,66	12,00	32,16
Promedio	79,00	34,00	44,88	35,33	48,30

C: Control **SS:** *Samanea saman* **AL:** *Albizia lebbeck* **TD:** *Tithonia diversifolia*

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: PLANTAS PROTEICAS DENTRO DE TIEMPO

Hora 2				Hora 4				Hora 8			
C	AL	TD	SS	C	AL	TD	SS	C	AL	TD	SS
74,00a	72,66a	71,33a	70,33a	78,33a	41,33b	22,66c	20,33c	84,66a	20,66b	12,00c	11,33c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE PLANTAS PROTEICAS

C			SS			AL			TD		
Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8
84,66a	78,33b	74,00b	70,33a	20,33b	11,33c	72,66a	41,33b	20,66c	71,33a	22,66b	12,00c

d. DENSIDAD DE HONGOS CELULOLÍTICOS

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	300.3055556			
P	3	179.1944444	59.7314815	102.40	<.0001
H	2	40.0555556	20.0277778	34.33	<.0001
P*H	6	67.0555556	11.1759259	19.16	<.0001
Error	24	14.0000000	0.5833333		

%CV DS MM
 9.715708 0.763763 7.861111

H. Fermentación	T. Planta				Promedio
	Control	<i>S. saman</i>	<i>A. lebbeck</i>	<i>T. diversifolia</i>	
2	6,00	7,66	6,33	6,33	6,58
4	5,00	11,00	7,00	8,33	7,83
8	4,00	15,00	8,33	9,33	9,17
Promedio	5,00	11,22	7,22	8,00	7,86

C: Control **SS:** *Samanea saman* **AL:** *Albizia lebbeck* **TD:** *Tithonia diversifolia*

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: PLANTAS PROTEICAS DENTRO DE TIEMPO

Hora 2				Hora 4				Hora 8			
SS	TD	AL	C	SS	TD	AL	C	SS	TD	AL	C
7,66a	6,33a	6,33a	6,00a	11,00a	8,33b	7,00bc	5,00c	15,00a	9,33b	8,33b	4,00c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE PLANTAS PROTEICAS

C			SS			AL			TD		
Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 8	Hora 4	Hora 2
6,00a	5,00a	4,00a	15,00a	11,00b	7,66c	8,33a	7,00a	6,33a	9,33a	8,33ab	6,33b

e. DENSIDAD DE PROTOZOARIOS

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	13749489722			
P	3	11190087500	3730029167	5438.68	<.0001
H	2	808883889	404441944	589.71	<.0001
P*H	6	1734058333	289009722	421.40	<.0001
Error	24	16460000	685833		

%CV DS MM
 1.150253 828.1505 71997.22

H. Fermentación	T. Planta				Promedio
	Control	S. saman	A. lebeck	T. diversifolia	
2	91800,00	63066,66	83333,33	72200,00	77600,00
4	93166,66	53500,00	80133,33	62733,33	72383,33
8	106166,66	33266,66	71766,66	52833,33	66008,33
Promedio	97044,44	49944,44	78411,11	62588,89	71997,22

C: Control **SS:** *Samanea saman* **AL:** *Albizia lebeck* **TD:** *Tithonia diversifolia*

Especímenes x 10³

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: PLANTAS PROTEICAS DENTRO DE TIEMPO

Hora 2				Hora 4				Hora 8			
C	AL	TD	SS	C	AL	TD	SS	C	AL	TD	SS
91,80a	83,33b	72,20c	63,07d	93,17a	80,13b	62,73c	53,50d	106,17a	71,77b	52,83c	33,27d

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE PLANTAS PROTEICAS

C			SS			AL			TD		
Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8
106,17a	93,17b	91,80b	63,07a	53,50b	33,27c	83,33a	80,13b	71,77c	72,20a	62,73b	52,83c

f. pH

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	1.56750000			
P	3	0.08083333	0.02694444	8.08	0.0007
H	2	1.29500000	0.64750000	194.25	<.0001
P*H	6	0.11166667	0.01861111	5.58	0.0010
Error	24	0.08000000	0.00333333		

%CV DS MM
 0.884828 0.057735 6.525000

H. Fermentación	T. Planta				Promedio
	Control	S. saman	A. lebeck	T. diversifolia	
2	6,56	6,63	6,53	6,63	6,59
4	6,26	6,36	6,17	6,27	6,27
8	6,86	6,63	6,63	6,73	6,71
Promedio	6,56	6,54	6,44	6,54	6,52

C: Control **SS:** *Samanea saman* **AL:** *Albizia lebeck* **TD:** *Tithonia diversifolia*

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: PLANTAS PROTEICAS DENTRO DE TIEMPO

Hora 2				Hora 4				Hora 8			
SS	TD	C	AL	SS	TD	C	AL	C	TD	SS	AL
6,63a	6,63a	6,56a	6,53a	6,36a	6,27ab	6,26ab	6,17b	6,86a	6,73ab	6,63b	6,63b

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE PLANTAS PROTEICAS

C			SS			AL			TD		
Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4
6,86a	6,56b	6,26c	6,63a	6,63a	6,36b	6,63a	6,53a	6,17b	6,73a	6,63a	6,27b

g. PRODUCCIÓN DE NH₃

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	134.9560972			
P	3	75.15916389	25.05305463	75.19	<.0001
H	2	28.76433889	14.38216944	43.16	<.0001
P*H	6	23.03559444	3.83926574	11.52	<.0001
Error	24	7.9970000	0.3332083		

%CV DS MM
 4.202623 0.577242 13.73528

H. Fermentación	T. Planta				Promedio
	Control	S. saman	A. lebbeck	T. diversifolia	
2	15,59	14,59	14,93	14,68	14,95
4	16,23	11,99	13,05	12,50	13,44
8	16,74	10,82	11,90	11,82	12,82
Promedio	16,19	12,47	13,29	13,00	13,74

C: Control **SS:** *Samanea saman* **AL:** *Albizia lebbeck* **TD:** *Tithonia diversifolia*

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: PLANTAS PROTEICAS DENTRO DE TIEMPO

Hora 2				Hora 4				Hora 8			
C	AL	TD	SS	C	AL	TD	SS	C	AL	TD	SS
15,59a	14,93a	14,68a	14,59a	16,23a	13,05b	12,50b	11,99b	16,74a	11,90b	11,82b	10,82b

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE PLANTAS PROTEICAS

C			SS			AL			TD		
Hora 8	Hora 4	Hora 2	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8	Hora 2	Hora 4	Hora 8
16,74a	16,23a	15,59a	14,59a	11,99b	10,82b	14,93a	13,05b	11,90b	14,68a	12,50b	11,82b