

Evaluación de la fermentación *in vitro* de dos variedades de muérdago enano del Área de Protección de Flora y Fauna “Nevado de Toluca”

Fecha de Recepción: 16/12/2020

Fecha de Aceptación: 02/02/2020

Becerril-Gil María Mitsi Nalleli¹
Hernández-Luna Guadalupe Brendali²
Olmedo-Juárez Agustín³
Endara-Agramont Ángel Rolando⁴
Estrada-Flores Julieta Gertrudis⁵

RESUMEN

El muérdago enano es una planta parásita que pertenece a la familia *Loranthaceae*, afecta a especies de coníferas a lo largo del país, está presente en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. Esta planta se evaluó para ser utilizada como un forraje para alimentar ganado ovino, debido a su alta disponibilidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de gas *in vitro* de dos especies de muérdago enano, muérdago amarillo (*Arceuthobium globosum*) y muérdago negro (*Arceuthobium vaginatum*), solos (tratamiento control 0% de inclusión) o asociados en 2 niveles de inclusión (15 y 30%) dentro de dietas experimentales. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la producción de gas del muérdago amarillo a la hora 24 con 85.21 ml/g MS, siendo superior comparado con el muérdago negro con 72.98 ml/g MS. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos del muérdago amarillo en las primeras horas de producción de gas *in vitro*. La producción de gas en ambos tratamientos (15% y 30%) de inclusión del muérdago negro tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la producción de gas a las 6 y 24 horas, no encontrando diferencias entre tratamientos a las 44 y 72 horas. Se concluye que la producción de gas *in vitro* de ambas especies fue diferente, y añadiéndolas en un 15 a un 30% en

una dieta convencional también se observa el mismo efecto, principalmente en las primeras horas de fermentación. Esto implica que existen efectos anti nutricionales como lo son el contenido de taninos condensados, que reducen la producción de gas *in vitro*.

Palabras clave: *Arceuthobium globosum*, *A. vaginatum*, muérdago amarillo, muérdago negro, producción de gas *in vitro*, alimentación de ovinos.

INTRODUCCIÓN

Los muérdagos enanos *Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum* son plantas hemiparásitas que afectan la población de árboles *Pinus hartewii* en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), afectando cerca del 58% de la población de árboles de la zona (Endara *et al.* 2014).

El estado de México encabeza la producción de carne de ovino a nivel nacional, con una producción de carne de 9,289.1 toneladas al año según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2019). Existe desabasto en la producción de carne de ovino en el país, encontrando así un área de oportunidad para la crianza de esta especie.

Los sistemas de crianza de ovinos en la zona del estado de México se desarrollan en sistemas semiintensivos, utiliza pastoreo y suplementación en el corral como principales fuentes de alimentación (Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019). En época de seca hay baja producción de forraje en las praderas naturales, por lo que se debe buscar nuevas alternativas utilizando ingredientes locales como aditivos para mejorar el aprovechamiento de los recursos forrajeros de la zona (Martínez-Hernández *et al.*, 2014).

Una alternativa forrajera para complementar la alimentación en época de secas es el uso de muérdago enano, que es obtenida a través de podas de árboles afectados como una medida de control en los bosques afectados.

Se ha realizado una evaluación previa del muérdago enano amarillo, se encontró que contiene 70 g/kg MS de proteína, 401 g/kg MS de fibra neutro detergente, 275 g/kg MS fibra ácido detergente y 626 g/kg MS de digestibilidad de la materia seca. Además, contiene 21.9% fenoles totales y 16.2 % taninos condensados (Hernández-Luna *et al.* 2017) que tienen efectos en la fermentación ruminal.

Puntualmente, los taninos condensados eficientizan la fermentación ruminal mediante la modificación de la estructura de la población microbiana, ya que poseen actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias celulolíticas que afectan la digestibilidad de la fibra detergente neutro, teniendo un impacto en la producción de gas *in vitro* (Makkar *et al.*, 1995; Patra *et al.* 2006; Andrade-Rivero *et al.* 2012).

En una evaluación de la utilización de muérdago amarillo en la alimentación de ovinos, demostró ser una opción forrajera que mejora la conversión alimentaria, al incluir 150 g/kg de MS de muérdago amarillo sin comprometer el bienestar animal (Hernández-Luna *et al.*, 2017).

Es necesario conocer a profundidad los efectos del muérdago enano en la alimentación animal, por lo que se evaluó la producción de gas *in vitro*, la cual es una herramienta útil para describir el potencial de degradación ruminal de los alimentos.

El objetivo de este estudio fue la evaluación de la producción de gas *in vitro* de dos especies de muérdago enano, muérdago negro (*Arceuthobium globosum*) y muérdago amarillo (*Arceuthobium vaginatum*) y su inclusión en una dieta experimental en dos diferentes niveles de inclusión (15 y 30%).

MATERIAL Y MÉTODOS

La recolección de ambas variedades de muérdago se llevó a cabo en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca, conformada por una superficie total de 53,590-67-86.28 hectáreas, está localizado en una altitud de 4660 m.s.n.m. la media de precipitación anual es de 1,000 a 1,400 mm y temperatura anual es de -2 a 7°C. La colecta se realizó de forma manual mezclando todas las etapas fenológicas.

Las dietas experimentales se describen en el Cuadro 1. El aporte de proteína cruda (PC) de la dieta fue de 140 g/kg de materia seca (MS), energía metabolizable (EM) de 10.41 MJ.

Cuadro 1: Inclusión de los ingredientes usados de las dietas experimentales (g/kg MS) utilizando dos variedades de muérdago negro (MN) y amarillo (MA).

	T 0 %	T 15 %	T 30 %
Muérdago negro o amarillo	0	150	300
Zacate de maíz	210	90	0
Heno de avena	230	200	140
Grano de maíz	340	340	335
Harina de soya	170	170	175
Melaza	30	30	30
Minerales	20	20	20
Total	1000	1000	1000

Fuente: Elaboración propia

Determinación de la producción de gas

Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Menke y Steingass (1988). El radio de dilución del líquido ruminal fue 1:3 v/v con medio anaeróbico. El inóculo fue mezclado con un buffer de bicarbonato de amoníaco y de sodio (35g NaHCO₃ + 4g NH₄HCO₃ por litro).

El líquido ruminal fue colectado de una vaquilla (peso vivo de 450-500 kg) con una cánula ruminal, antes de la alimentación de la mañana, la cual fue alimentada diariamente dos veces con una dieta que consistía en rastrojo de maíz, heno de alfalfa y concentrado comercial en proporciones de 570, 287 y 143 g/kg, respectivamente.

La dieta fue formulada para alcanzar los requerimientos de energía y proteína metabolizable, siguiendo las recomendaciones de Agricultural and Food Research Council (AFRC, 1993). Se tuvieron todos los cuidados al animal, de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se le aportó agua fresca *ad libitum*, se mantuvo en un lugar ventilado y cómodo para su reposo.

El líquido ruminal fue colado a través de una gasa doble y se mezcló con la solución tampón. Se incubaron tres botellas de vidrio de 140 ml con 0.99 ± 0.01 g por muestra de las dos variedades de muérdago y de los diferentes porcentajes de inclusión en las dietas descritas anteriormente. Se midió la producción de gas utilizando un transductor de presión Delta Ohm por 72 h a diferentes intervalos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 20, 28, 36, 44, 52, 60 y 72 horas posterior a la incubación).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un diseño de bloques completamente al azar, utilizando una ecuación lineal general (Minitab, 2000).

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

Y_{ij} = variable de respuesta,
 μ =Media general,
 T_i = Efecto tratamiento (nivel de inclusión de muérdago)
 B_j =Efecto del bloque (especies de muérdago)
 e_{ij} = Error experimental.

Cuando se observaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey (P < 0.05).

RESULTADOS

La producción de gas *in vitro* de las dos variedades de muérdago se muestra en el Cuadro 2. La producción de gas fue superior en la variedad del muérdago amarillo comparado al muérdago negro en la hora 6. Se encontraron diferencias estadísticas en la producción de gas de las variedades de muérdago, en las horas 24 y 72.

Cuadro 2: Producción de gas *in vitro* (ml/g MS) de las dos variedades de muérdago.

Hora	Muérdago amarillo	Muérdago negro	EEM	P
Gas 6	25.12	19.72	1.53	0.0678
Gas 24	85.21 ^a	72.98 ^b	2.45	0.0242*
Gas 44	115.99	108.20	2.05	0.0545
Gas 72	119.12 ^a	106.13 ^b	1.18	0.0015*

Fuente: Elaboración propia

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos del muérdago amarillo en las primeras horas de producción de gas *in vitro* (Cuadro 3). La producción de gas a la hora 6 y 24 de fermentación, fue menor al incluir muérdago enano en ambos niveles.

En la hora 24 la menor acumulación de gas se obtuvo en el tratamiento con 15% (204.01 ml/g MS) y 30% (190.90 ml/g MS). La mayor producción de gas se obtuvo en el tratamiento control sin la inclusión de muérdago (220.03 ml/g MS).

Cuadro 3: Producción de gas *in vitro* (ml/g MS) de muérdago amarillo (MA) a diferentes niveles de inclusión.

Hora	MA 0%	MA 15%	MA 30%	EEM	P
Gas 6	77.11 ^a	57.90 ^b	49.20 ^b	3.75	0.0051*
Gas 24	220.03 ^a	204.01 ^{ab}	190.90 ^b	6.44	0.0497*
Gas 44	288.30	267.30	255.20	7.70	0.0586
Gas 72	295.31	269.71	263.83	8.04	0.0685

Fuente: Elaboración propia

La producción de gas en ambos tratamientos de inclusión del muérdago negro se muestra en el Cuadro 4. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la producción de gas a las 6 y 24 horas, no encontrando diferencias entre tratamientos a las 44 y 72 horas.

Cuadro 4: Producción de gas *in vitro* (ml/g MS) de muérdago negro (MN) a diferentes niveles de inclusión.

Hora	MN 0%	MN 15%	MN 30%	EEM	P
Gas 6	75.27 ^a	67.24 ^{ab}	44.64 ^b	3.89	0.0036*
Gas 24	210 ^a	223.50 ^{ab}	181.52 ^b	8.46	0.0325*
Gas 44	279.84	278.90	249.24	10.25	0.0676
Gas 72	291.33	303.88	260.10	10.88	0.0697

Fuente: Elaboración propia

DISCUSIÓN

Las técnicas de producción de gas *in vitro* permiten el conocimiento de la cinética ruminal, donde la determinación de los parámetros de fermentación de gas provee información valiosa de las fracciones solubles e insolubles de los carbohidratos, permite la estimación correcta de energía disponible en los alimentos, además para analizar el modo de acción de anti-nutrientes y suplementos de alimentos (Getachew *et al.*, 1998).

La producción de gas es básicamente el resultado de la fermentación, indica una alta disponibilidad de carbohidratos, que genera como principales productos metano, dióxido

de carbono, se convierten en ácidos grasos volátiles y células microbianas (Getachew *et al.*, 1998) liberando ATP como suplemento energético para el crecimiento microbiano.

Los resultados obtenidos en este análisis muestran que en las primeras 6 horas de fermentación la producción de gas del muérdago amarillo es superior a la producción de gas que el muérdago negro (25.12 y 19.72 ml/g MS respectivamente), lo anterior es atribuido al contenido de carbohidratos solubles. Es reconocido que la proporción de carbohidratos altamente solubles aumenta las lecturas de producción de gas debido a los ácidos grasos volátiles que se liberan (Dijkstra *et al.*, 2005).

Comparando los resultados de producción de gas de ambas especies de muérdago en las primeras 6 horas, es similar a lo reportado por Vega-García *et al.* (2021) con cultivos de avena negra sola, avena negra asociada con trébol rojo y praderas multiespecies, cuyos resultados son inferiores a los 50 ml/g⁻¹ de MS.

La producción de gas en la hora 24 muestra diferencias significativas entre especies, es superior en la especie de muérdago amarillo con 85.21 ml/g MS y en el muérdago negro con 72.98 ml/g MS; esto indica que el contenido de carbohidratos estructurales en la muestra es diferente estadísticamente entre ambas especies. Lo mismo se observa en la hora 72 con 119.12 ml/g MS en la especie muérdago amarillo comparado con la especie muérdago negro con 106.13 g/kg MS. A las 72 horas de fermentación de ambas especies de muérdago, se obtuvieron lecturas inferiores por las reportadas en la especie avena Saia (Vega-García *et al.*, 2021).

Se ha postulado que la primera fase del perfil de la producción de gas *in vitro* en las etapas más tempranas de incubación se debe a la fracción altamente soluble y la segunda fase en las etapas de fermentación más avanzadas se relaciona a la fermentación de la pared celular (Dijkstra *et al.*, 2005).

En los resultados de producción de gas *in vitro* de la dieta experimental se observa que, al no incluir ninguna especie de muérdago, es mayor en las horas 6 y 24, y se reduce al incluir ambas especies de muérdago en diferentes porcentajes (15 y 30%). Se ha reportado que el muérdago amarillo (*Arceuthobium globosum*) contiene 162 g/kg MS de taninos condensados (Hernández-Luna *et al.* 2017) los cuales tienen un efecto en la producción de gas *in vitro*.

Los taninos condensados o proantocianidinas son metabolitos secundarios de plantas, actúan sobre la microflora ruminal (Waghorn, 2008) provocando una disminución en el crecimiento bacteriano (O'Donovan y Brooker, 2001) debido a un efecto bactericida, que reduce la producción de gas *in vitro* (Andrade-Rivero *et al.*, 2012).

La presencia de taninos condensados en el muérdago amarillo tiene un efecto en la producción de gas *in vitro* en la hora 6 y 24, ya que al no incluir la planta los carbohidratos solubles de la dieta son utilizados por los microorganismos ruminales generando una mayor producción de gas, en comparación de la producción de gas una vez que se incluyó muérdago en la dieta, se reduce debido a la presencia de taninos condensados.

Se observó un efecto similar en la inclusión de muérdago negro en la dieta en las primeras horas de fermentación (6 y 24 horas), también es atribuido al efecto de los taninos condensados presentes en la planta, que reduce la producción de gas.

Estos resultados son similares a lo reportado por Menci *et al.* (2021) donde encontraron que la producción de gas a las 3.5 h con una dosis ascendente de una mezcla de especies taníferas, que va desde la no inclusión con una lectura de 61.4 ml/g MS y al incluir 15 y 30 g/ kg de MS de la mezcla, la producción de gas se redujo a 59.6 y 58.5 ml/g MS respectivamente.

En otros hallazgos hechos por Menci *et al.*, (2021) demostraron mediante la suplementación con extractos de taninos, que cambia la ruta de fermentación a través de la producción de dióxido de carbono (CO₂) decrementando la producción de metano (CH₄), que son algunos de los principales productos de la fermentación bacteriana, generando una alta variabilidad y capacidad bioactiva de acuerdo con el tipo de tanino, la dosis del tanino y la dieta basal.

Por último, la proporción de forraje: concentrado fue aproximadamente de 44:56 forraje: concentrado, en algunos trabajos se ha encontrado que una proporción 30:70 forraje: concentrado ocasionan efecto en la cinética ruminal donde se ha demostrado que el contenido de azúcares incrementa la población microbiana, particularmente la bacteriana, además afecta la producción de gas, la cual es mayor en las primeras horas de fermentación (Dagaew et al. 2021).

CONCLUSIONES

Se concluye que la inclusión de muérdago negro y amarillo en dietas experimentales tiene un efecto en la reducción de producción de gas *in vitro* en ambos niveles de inclusión.

El contenido de taninos condensados de ambas especies de muérdago tiene un efecto en la producción de gas *in vitro* en las primeras horas de fermentación, principalmente. Se requieren hacer más estudios *in vitro* evaluando el efecto de inclusión de taninos condensados sobre la población ruminal.

BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural and Food Research Council (AFRC). (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford.
- Andrade-Rivero, E., Martínez-Campos, A. R., Castelán-Ortega, O. A., Ríos-Quezada, J., Pacheco-Ortega, Y., & Flores-Estrada, J. (2012). Producción de metano utilizando plantas taníferas como sustrato en fermentación ruminal in vitro y efecto de extractos fenólicos en la microflora ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15, 301-312.
- Dagaew, G., Cherdthong, A., Wongtangtintharn, S., Wanapat, M., & Suntara, C. (2021). Manipulation of In Vitro Ruminal Fermentation and Feed Digestibility as Influenced by Yeast Waste-Treated Cassava Pulp Substitute Soybean Meal and Different Roughage to Concentrate Ratio. *Fermentation*, 7(3), 196.
- Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France J. and López, S. (2005). Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 561-578.
- Endara, A.A.R., Cedillo, A.M., Nava, B.E.G. (2014) Actualización del mapa de plagas y enfermedades forestales del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. México: Universidad Autónoma del Estado de México. En prensa.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3-4), 261-281.
- Hernández-Luna G.B., Endara-Agramont A.R., González-Ronquillo M., Martínez-Hernández J., Vilmar-Kozloski G y Estrada-Flores J. G. (2017) La utilización de muérdago enano (*Arceuthobium globosum*) como forraje en la alimentación de rumiantes. En: *Sustentabilidad Agropecuaria. Experiencias de investigación para el desarrollo agropecuario, forestal y rural*. Luis Brunett Pérez, Gómez Demetrio, William, Gutiérrez Castillo Adriana del Carmen, Enrique Jaimes Arriaga. Universidad Autónoma del Estado de México. Ciudad de México: Colofón; Estado de México.
- Hernández-Valenzuela, D., Sánchez Vera, E., Gómez Demetrio, W., & Martínez García, C. G. (2019). Productive and socioeconomic characterization of a sheep production system in a natural protected area in Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 10(4), 951-965.
- Martínez-Hernández, J., Arriaga-Jordán, C. M., González-Rebeles Islas, C., Estrada Flores, J.G. (2014). Evaluación de la productividad primaria durante la época de secas en el Área de protección de flora y fauna "Nevado De Toluca" México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(2),299-302. [fecha de Consulta 30 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.re-dalyc.org/articulo.oa?id=939/93931761021>
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M., & Becker, K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*, 73(6), 897-913.
- Menci, R., Coppa, M., Torrent, A., Natalello, A., Valenti, B., Luciano, G., Priolo, A. and Niderkorn, V. (2021). Effects of two tannin extracts at different doses in interaction with a green or dry forage substrate on rumen fermentation and biohydrogenation—an in vitro study. *Animal Feed Science and Technology*, p.114977.

- Menke, K. H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28:7-55.
- Minitab. 2000. Version 13: user's guide 2: data analysis and quality tools. Minitab, USA.
- O'Donovan, L. y Brooker, J. D. (2001). Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolytus* (S. caprinus) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*. 147: 1025-1033
- Patra A.K., Kamra D.N., Agarwal N. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*. 128 276–291.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2019). Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/.
- Vega-García, J I, Colín-Navarro V., Estrada-Flores J.G., Arriaga-Jordán C.M., and López-González F. (2021). "In vitro nutritional value of black oat (*Avena strigosa*) in grazing or silage for small scale dairy systems." *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 24, no. 3.
- Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 116-139.