

EFFECTO DE EXTRACTOS DE TANINOS DE DIVERSAS LEGUMINOSAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS FIBROLÍTICAS IN VITRO

R. Rodríguez¹, A. Britos², N. Rodríguez-Romero³, M. Fondevila

Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón,
Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, M. Servet
177, 50013 Zaragoza

¹ Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba; ² Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ³ Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela
mfondev@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La suplementación de pastos de gramíneas con leguminosas arbustivas para incrementar el contenido de proteínas y energía en la dieta y con ello la productividad es una práctica común en la alimentación de rumiantes en el trópico. La presencia en las leguminosas de compuestos antinutricionales como los taninos afecta la disponibilidad de los nutrientes o incide directamente sobre los microorganismos ruminales. Sin embargo, estos compuestos pueden mejorar la eficiencia de utilización de la energía al reducir la metanogénesis, de modo que la utilidad de las leguminosas arbustivas como alimento depende del balance entre sus efectos positivos y negativos sobre la fermentación ruminal.

El efecto de los taninos de las leguminosas *Acacia cornigera* y *Albizia lebbekoides*, comparadas con *Leucaena leucocephala* ha sido previamente estudiado, pero sin distinguir los efectos del aporte de nutrientes y de los factores antinutricionales sobre la fermentación ruminal. Por ello, este trabajo pretende estudiar el efecto de los taninos extraídos de *A. cornigera*, *A. lebbekoides* y *L. leucocephala* sobre la actividad y concentración de especies bacterianas implicadas en la degradación de forrajes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras vegetales se recolectaron, secaron, molieron a 1 mm y preservaron en el Instituto de Ciencia Animal (Cuba). Posteriormente se enviaron a la Universidad de Zaragoza (España) para estudios in vitro. Los taninos de las leguminosas se extrajeron en una solución acetona:agua 70:30. Se incubaron in vitro muestras de *Pennisetum purpureum* (800 mg MS por botella), solo (PP) o con una cantidad de taninos extraídos de *A. cornigera* (AC), *A. lebbekoides* (AL) o *L. leucocephala* (LL), correspondiente a 240 mg de cada leguminosa. Además, se incubó el *P. purpureum* con 64 mg de quebracho (760 mg taninos totales /g MS) como control negativo (QT). Los tratamientos se incubaron por cuadruplicado en 80 ml de solución de incubación a 39°C y durante 48 horas. Como inóculo microbiano se utilizó líquido ruminal de dos ovejas canuladas en rumen, en una proporción de 0.20 del volumen de incubación. Después de las 12 y 24 h de incubación se detuvo la fermentación en una botella por tratamiento, y se muestreó líquido y residuo sólido. Las dos botellas restantes por tratamiento se abrieron al final de la incubación (48 h), para estimar la degradabilidad aparente in vitro de la MO (IVOMD). En el medio líquido de incubación se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) por cromatografía de gases, y se estimó estequiométricamente la producción de metano (Demeyer 1991), asumiendo una recuperación del H₂ del 90%. A partir del residuo de incubación se extrajo el DNA mediante un kit comercial (QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN Ltd., West Sussex, UK) tras tratamiento con Mini-Beadbeater (BioSpec Products, Bartlesville, USA). La concentración del gen 16S rDNA y la abundancia relativa (ΔC_t) de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens* en las muestras se analizó por PCR a tiempo real, empleando los cebadores diseñados por Yu et al. (2005), Koike y Kobayashi (2001) y Tajima et al. (2001). Los resultados se analizaron usando ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Los resultados experimentales se contrastaron por ANOVA usando el paquete estadístico 9.0 (Analytical Software 2008), considerando cada tanda de incubación como bloque. Diferencias entre medias con $P < 0.05$ se compararon por el test LSD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de taninos totales de las muestras originales de las leguminosas arbustivas, según el método de Folin-Ciocalteu, fue de 15.0, 83.9 y 61.3 mg/g MS para *A. cornigera*, *A. lebbekoides* y *L. leucocephala*, respectivamente.

La Tabla 1 muestra el efecto de la adición de los extractos de taninos de las leguminosas a estudio sobre distintos indicadores de la fermentación in vitro del *P. purpureum*, a las 12 y 24 h de incubación. Respecto a PP, la concentración total de AGV se redujo con AL y QT después de 12 h de incubación ($P < 0.01$), y la misma tendencia ($P = 0.06$) se observó con AC y AL tras 24 h, lo que indica un efecto depresor de la actividad fermentativa microbiana, de magnitud variable según el origen de los taninos, dado que la eficiencia de la acción de los taninos disminuye en el tiempo en función de su reactividad (Bueno et al., 2008). No se observó efecto de la inclusión de los extractos de taninos sobre las proporciones molares de los AGV a las 12 h ($P > 0.10$), pero a las 24 h tanto AC como AL redujeron la proporción de acetato e incrementaron la de propiónico, respecto a PP ($P < 0.05$), mientras que AL y QT redujeron la proporción de butírico respecto a PP ($P < 0.05$). En términos absolutos, a las 24 h la producción de metano disminuyó con AL y AC ($P < 0.01$), y tendió ($P = 0.08$) a reducirse con AL. La capacidad de los taninos de reducir la producción ruminal de metano recalca el potencial de las plantas taníferas para aumentar la eficiencia de la fermentación y disminuir el impacto ambiental de la producción de rumiantes. Al expresar la producción de metano por unidad de materia orgánica fermentable (MOF), a las 24 h de incubación ésta fue menor con AC y AL respecto a PP ($P < 0.01$), lo que demuestra que la respuesta está asociada tanto a la reactividad como a la concentración específica de taninos.

Tabla 1: Concentración (mmol/l) y proporciones molares de AGV, producción estimada de metano (CH_4) y concentración (ng DNA total/mg residuo fresco) y abundancia relativa (ΔC_t) de bacterias adheridas después de 12 y 24 h de incubación in vitro de *P. purpureum*, solo (PP) o con taninos extraídos de *L. leucocephala* (LL), *A. cornigera* (AC), *A. lebbekoides* (AL) o quebracho (QT).

| | PP | LL | AC | AL | QT | E.E.M. ¹ |
|--------------------------|---------|----------|----------|---------|----------|---------------------|
| 12 h: | | | | | | |
| AGV | 38.2 a | 35.3 ab | 36.6 a | 28.4c | 33.0 b | 1.17 |
| Acetato | 0.667 | 0.667 | 0.663 | 0.668 | 0.669 | 0.0055 |
| Propionato | 0.233 | 0.234 | 0.239 | 0.233 | 0.225 | 0.0037 |
| Butirato | 0.075 | 0.073 | 0.073 | 0.071 | 0.078 | 0.0015 |
| CH_4 , mmol | 0.66 | 0.61 | 0.62 | 0.50 | 0.59 | 0.026 |
| CH_4 , ml/g MOF | 3.13 | 3.12 | 3.09 | 3.14 | 3.18 | 0.037 |
| Adh. bacteriana | 113.2 | 134.9 | 141.4 | 98.5 | 87.4 | 13.87 |
| <i>F. succinogenes</i> | 9.94 | 9.64 | 9.51 | 9.96 | 6.33 | 0.910 |
| <i>R. albus</i> | 0.035 a | 0.019 bc | 0.017 bc | 0.009 c | 0.024 ab | 0.0050 |
| <i>R. flavefaciens</i> | 0.0041 | 0.0026 | 0.0013 | 0.0013 | 0.0031 | 0.00050 |
| 24 h: | | | | | | |
| AGV | 42.6 | 39.3 | 38.4 | 36.2 | 40.5 | 1.36 |
| Acetato | 0.661ab | 0.664 a | 0.646 c | 0.650 b | 0.664 a | 0.0040 |
| Propionato | 0.230 c | 0.236 bc | 0.242 ab | 0.246 a | 0.232 c | 0.0027 |
| Butirato | 0.080 a | 0.078 ab | 0.081 a | 0.077 b | 0.077 b | 0.0007 |
| CH_4 , mmol | 0.73 a | 0.66 ab | 0.62 bc | 0.58 c | 0.69 ab | 0.005 |
| CH_4 , ml/g MOF | 3.13 a | 3.10 a | 3.01 b | 3.00 b | 3.13 a | 0.024 |
| Adh. bacteriana | 90.3 | 76.03 | 85.31 | 69.12 | 72.69 | 7.521 |
| <i>F. succinogenes</i> | 12.59 | 15.45 | 12.91 | 18.62 | 21.39 | 2.606 |
| <i>R. albus</i> | 0.086 a | 0.050 b | 0.029 b | 0.040 b | 0.079 a | 0.0070 |
| <i>R. flavefaciens</i> | 0.0007 | 0.0011 | 0.0007 | 0.0006 | 0.0012 | 0.00005 |

¹E.E.M.: error estándar de las medias.

Dentro de una misma fila, letras diferentes indican diferencias ($P < 0.05$).

No se observaron diferencias entre tratamientos en cuanto al efecto de los extractos de taninos sobre la concentración de bacterias totales por unidad de residuo a las 12 h ($P>0.10$), aunque a las 24 h tendió ($P=0.08$) a ser mayor con LL y AC respecto a QT. No obstante, es esperable un efecto negativo de los taninos sobre las bacterias fibrolíticas, bien directo o indirecto, en base a la restricción de nutrientes que implican. La abundancia relativa de *F. succinogenes* tendió ($P=0.08$) a disminuir con QT a las 12 h, pero no se registraron diferencias a las 24 h. La proporción de *R. albus* se redujo con LL, AC y AL respecto a PP, tanto a las 12 ($P<0.01$) como a las 24 h de incubación ($P<0.001$), mientras que no se observó efecto sobre *R. flavefaciens*. Este efecto selectivo, siendo *R. albus* la especie más afectada, se pudo deber a diferencias interespecíficas en cuanto a los mecanismos de adhesión al sustrato y patrón de fermentación (Koike y Kobayashi, 2009).

Nuestros resultados sugieren que los taninos de leguminosas afectan cualitativamente la fermentación de *P. purpureum*, como muestra el incremento en la proporción de propiónico a expensas de acetato, lo que además sugiere una reducción de la metanogénesis. No se apreció un efecto de los taninos sobre la adhesión bacteriana al sustrato, pero la concentración de *R. albus* parece ser sensible a la presencia de taninos, contrariamente a *F. succinogenes* y *R. flavefaciens*. La magnitud de esta respuesta cualitativa depende de la especie vegetal de origen, en función de la concentración y reactividad de sus taninos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bueno, I.C.S., Vitti, D.M.S.S., Louvandini, H., Abdalla, A.L. 2008. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 153-170
- Demeyer, D.I. 1991. In: J.P. Jouany (ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, INRA, Paris, France, pp. 217-237
- Koike, S., Kobayashi, Y. 2001. *FEMS Microbiology Letters*, 204:361-366
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2766-2774
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. 2005. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 670-679.

EFFECT OF TANNINS EXTRACTED FROM SEVERAL LEGUMES ON IN VITRO CONCENTRATION OF FIBROLYTIC BACTERIA

ABSTRACT: To what extent bacterial fermentation and attachment is affected by tannins from tropical browse legumes was studied in vitro. A proportion of extracted tannins of *A. cornigera* (AC), *A. lebbekoides* (AL) and *L. leucocephala* (LL) were added to each bottle with 800 mg *P. purpureum* as substrate, and contrasted with *P. purpureum* alone (PP) or with 64 mg quebracho tannins (QT). Compared with PP, total VFA concentration was reduced with AL and QT after 12 h ($P<0.01$), and the same trend ($P=0.06$) was observed with AC and AL after 24 h. Acetate molar proportion at 24 h was reduced, and that of propionate increased, with AC and AL compared with PP ($P<0.05$), whereas AL and QT reduced butyrate proportion ($P<0.05$). Estimated methane concentration per unit of fermented organic matter after 24 h was lower with AC and AL than with PP ($P<0.01$). Proportion of *R. albus* was reduced with LL, AC and AL compared with PP at 12 ($P<0.01$) and 24 ($P<0.001$) h of incubation. Tannins extracted affected fermentation of *P. purpureum*, increasing propionate at the expense of acetate, in a largest extent with *A. lebbekoides*. No major effect on bacterial population attached to the substrate was detected, but concentration of *R. albus* seemed to be sensitive to tannins, whereas *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* did not.

Keywords : extracted tannins, tropical legumes, rumen fermentation, bacterial attachment, fibrolytic bacteria.