

PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN, SU CULTIVO *in vitro* Y PLANTAS CON CAPACIDAD DESFAUNANTE

CILIATED RUMEN PROTOZOA, THEIR *in vitro* CULTURE, AND PLANTS WITH DEFAUNING CAPACITY

Ley de Coss, A.^{1*}, Aguirre-Medina, J.F.¹, Marroquín-Agreda, F.J.¹, Toledo-Toledo, E.¹, Aguilar-Fuentes, J.², Guerra-Medina, E.³

¹Cuerpo Académico en Productividad de Agroecosistemas Tropicales, Facultad de Ciencias Agrícolas, *Campus IV* y ²Centro Mesoamericano de Estudios en Salud Pública y Desastres, Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas, México. ³Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor responsable: aleycoss@gmail.com

RESUMEN

Con el fin de tener un método para evaluar la capacidad desfaunante (CD) de los compuestos químicos presentes en las plantas multipropósito, se ha evaluado la factibilidad y la efectividad de usar medios de cultivo *in vitro* enriquecidos con minerales, vitamínicos y fuentes de proteína, dosis mínimas de antibióticos y como única fuente de energía el extracto de diferentes plantas (*Avena sativa*, *Manihot esculenta*, *Musa spp.*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* y *Dactylis glomerata*). En la mayoría de los trabajos, el extracto de las plantas evaluadas sólo redujeron la cantidad de protozoarios (a menos de 10^2 mL⁻¹ de medio), mientras que otras plantas tuvieron un efecto desfaunante total, pero un tercer grupo de plantas, incluso con mayor contenido y variedad de compuestos químicos presentes, no presentaron efecto alguno sobre los protozoarios del rumen; por tanto las plantas evaluadas tienen diferencias en la CD durante los periodos de evaluación. Esta CD en muchos casos fue o ha sido atribuida a la presencia de compuestos secundarios con posible efecto tóxico sobre los protozoarios ciliados del rumen; sin hasta el momento esto haya sido ratificado.

Palabras clave: silvopastoril, plantas tóxicas, taninos, saponinas, microorganismos.

ABSTRACT

With the goal of having a method to evaluate the defauning capacity (DC) of the chemical compounds present in multipurpose plants, the feasibility and effectiveness of using *in vitro* mediums enriched with minerals, vitamins and protein sources has been evaluated, as well as minimum doses of antibiotics and extracts from different plants (*Avena sativa*, *Manihot esculenta*, *Musa spp.*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* y *Dactylis glomerata*) as the single source of energy. In most studies, the plant extracts assessed only reduced the amount of protozoa (to less than 10^2 mL⁻¹ medium), while other plants had a total defauning effect, yet a third group of plants did not present any effect on the rumen protozoa, even with higher content and variety of chemical compounds present; therefore, the plants evaluated have differences in the DC during the periods of evaluation. This DC in many cases was or has been attributed to the presence of secondary compounds with possible toxic effect on the ciliated rumen protozoa, although this has not been ratified until now.

Keywords: forest grazing, toxic plants, tannins, saponins, microorganisms.

INTRODUCCIÓN

La alimentación de los rumiantes en las regiones tropicales se basa principalmente en el consumo de especies forrajeras como su principal fuente de energía y proteína; sin embargo, dado el bajo contenido energético y proteico, además de la baja tasa y extensión de la degradación de estas especies vegetales (Leng, 1990), generalmente ocasiona bajo consumo voluntario, desequilibrio en los nutrientes aportados y, por consiguiente, reducción en los indicadores productivos del hato. Bajo estos esquemas de producción se ha reportado que existe un mayor aporte y mejora en el cociente de proteína-energía cuando se reduce la población o se elimina a los protozoarios ciliados (Díaz *et al.*, 1994). A pesar de que los protozoarios contribuyen en la degradación de la fibra y el aporte de mayor contenido energético para el animal, existe un proceso conocido como “**secuestro de protozoarios**” que impide su salida de rumen y, con ello, se reduce su aporte nutrimental hacia el animal (Hsu *et al.*, 1991).

Características generales del rumiante

Los rumiantes pertenecen a un grupo de animales que tienen un tubo digestivo con cuatro compartimentos (rumen, retículo, omaso y abomaso) que permite aprovechar alimentos con alto contenido de fibra (FDN, celulosa, hemi-celulosa y lignina). Esta adaptación ha permitido al rumiante utilizar distintas fuentes de alimentos (forrajes) no aprovechable para otros animales no rumiantes como los cerdos y las aves y, además, generar bienes para el hombre, como carne y leche. El rumen es un compartimento donde el alimento es degradado y fermentado hasta 80% por la acción de enzimas microbianas. El contenido ruminal contiene, además de partículas de alimento, un gran número de bacterias (10^{10} a 10^{12} mL⁻¹), protozoarios ciliados (10^6 mL⁻¹), protozoarios flagelados (10^2 mL⁻¹) y hongos anaerobios (10^3 mL⁻¹); algunas de sus propiedades son: alto potencial de oxido-reducción (-250 a -450 vM), un pH de 5.3 a 7.2, además de una concentración, según el tipo y la cantidad de alimento consumido de gases disueltos, tales como bióxido de carbono, metano, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, de amoníaco, de bicarbonato, y de ácidos grasos volátiles (AGV; acético, propiónico y butírico), además de ácidos orgánicos (láctico, succínico) (Cobos, 2007).

Protozoarios ciliados del rumen

A estos microorganismos se les atribuyen diversas funciones, como regular la población bacteriana, la con-

centración de amonio, el pH, volumen y tasa de dilución ruminal (Jouany *et al.*, 1988); sin embargo, pueden causar efectos negativos por alta ingestión de bacterias ruminales y por ser retenidos dentro del rumen (secuestro); lo que disminuye la disponibilidad de nutrimentos para el animal. Según Bird *et al.* (1979), sólo 30% de los ciliados que habitan el rumen llegan a nivel del duodeno y con su eliminación (desfaunación) se podría incrementar el aporte de nutrientes, principalmente proteína de mayor valor biológico por parte de estos microorganismos (Eugene *et al.*, 2004). Lo anterior ha permitido la búsqueda de estrategias para desfaunar a los rumiantes y con ello contribuir a esclarecer la importancia o no, de la fauna, en el ecosistema ruminal (Ley de Coss *et al.*, 2011a, 2011b). Se han evaluado muchas técnicas (*in vitro* e *in vivo*); sin embargo, no existe una que sea eficaz y clara para desfaunar rumiantes y que permita además, evaluar el desempeño de éstos en la productividad animal (Chaudhary y Srivastava, 1995). Más bien, los resultados obtenidos han contribuido a aumentar la controversia que existe respecto a las mejoras en la degradación de la materia seca (MS) y la orgánica (MO; Van Nevel *et al.*, 1993), en la digestibilidad aparente de la fibra (Bird *et al.*, 1994) y en la degradación del almidón (Mendoza *et al.*, 1993). Para esclarecer la función de los protozoarios en el rumen, se presenta una revisión de trabajos de investigación relacionados con el cultivo y la sobrevivencia fuera del ambiente ruminal para conocer algunos requerimientos nutricionales y factores de crecimiento esenciales para su cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo *in vitro* de protozoarios y efecto desfaunante

Se han usado como fuente de nutrimentos las harinas de yuca (*Manihot esculenta*), plátano (*Musa spp.*), arroz (*Oryza sativa*) (Coleman, 1981; Dehority, 2003) paja de avena (*Avena sativa*) (Chandramoni *et al.*, 2002) y paja y gluten de trigo (*Triticum aestivum*) (específico para *Epidinium ecaudatum*; Michałowski *et al.*, 2001), heno de Orchard (*Dactylis glomerata*) (Lee *et al.*, 2000) y almidón de *A. sativa* (Ley de Coss *et al.*, 2011a, 2011b), más la adición de 20000 UI de penicilina y 25 mg de estreptomycin para mantener contralada una población de 10^8 bacterias mL⁻¹ de medio (Fondevila y Dehority, 2001); esto ha permitido mantener un pH estable de 6.8 ± 0.2 y la sobrevivencia de protozoarios ciliados. Se realizaron pruebas en medios de cultivo, usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate (1950), y el medio evaluado (Cuadro 1) permitió mantener entre 7.5×10^3 y

1.22×10^4 protozoarios por mililitro con una viabilidad de 88 a 90% durante más de 72 h; además, el medio de cultivo no fue específico, ya que se identificaron protozoarios de las órdenes Entodiniomorfa (*Entodinium* spp.) (Figura 1 A) y Tricostomatida (*Holotricos* spp.) (Figura 1B), lo que contrasta con los reportes de Fondevila y Dehority (2001), quienes indicaron mayor presencia en los medios de cultivo de ciliados del género *Entodinium* spp. Autores como De León (2012) registraron una población de 2.24×10^4 protozoarios por mililitro de medio de cultivo, similar a los valores registrados en el Cuadro 1, usando como fuente de energía a la planta tropical *Parmentiera edulis*.

El cultivo *in vitro* han permitido evaluar la capacidad desfaunante (CD) del extracto soluble de plantas forrajeras y no forrajeras que existen en las regiones del trópico seco y húmedo de México y otros países. De diferentes resultados publicados se infiere que existen diferencias estadísticas en las concentraciones de protozoarios entre las plantas y por tiempos de incubación (Figura 2). Por ejemplo, el extracto de *Datura inoxia* tuvo una nula CD, manteniendo una cantidad por 72 h de 1.61×10^4 protozoarios por mL^{-1} de medio, valor similar al testigo, seguida del extracto de *Buddleia cordata*, la cual sólo redujo la población de protozoarios al finalizar el tratamiento (72 h), mientras que *Verbesina perymenioides* tuvo el mismo efecto a las 48 h de incubación; sin embargo, los extractos de *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare* y *Mentha piperita* redujeron la cantidad de protozoarios desde las 24 h, pero 24 h más tarde eliminaron totalmente a estos microorganismos en comparación con el resto de los tratamientos. Al respecto, se reportó que el extracto soluble de *V. perymenioides*, *Montanoa leucanta*

Cuadro 1. Composición del medio cultivo anaerobio con extracto de *A. sativa*.

Compuesto	Cantidad para 100 mL^{-1} de medio
Agua destilada, mL	4742
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30.0
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5.0
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5.0
Carbonato de sodio, solución 8% ⁽⁴⁾ , mL	5.0
Acetato de sodio, 1.5 % ⁽⁵⁾ , mL	5.0
Solución sulfido-cisteína ⁽⁶⁾ , mL	2.0
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾ , mL	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.20
Extracto de levadura, g	0.10
Fuente de energía (planta tropical), mL	0.20

(1) Líquido ruminal clarificado, previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 17664 g durante 15 min a 4 °C, esterilizado 20 minutos a 15 psi, 121 °C; (2) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de $\text{K}_2\text{H-PO}_4$; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO_4 y 1,6 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 1,5 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6) 2,5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH)+2,5 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (en 100 mL de H_2O); (7) 0,1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL.

y *B. cordata* tuvieron un efecto sobre la concentración de protozoarios por la presencia de taninos, saponinas, entre otros compuestos en las plantas evaluadas.

Plantas forrajeras desfaunantes

Se han reportado compuestos químicos secundarios en plantas arbustivas multipropósito (leña, forraje y

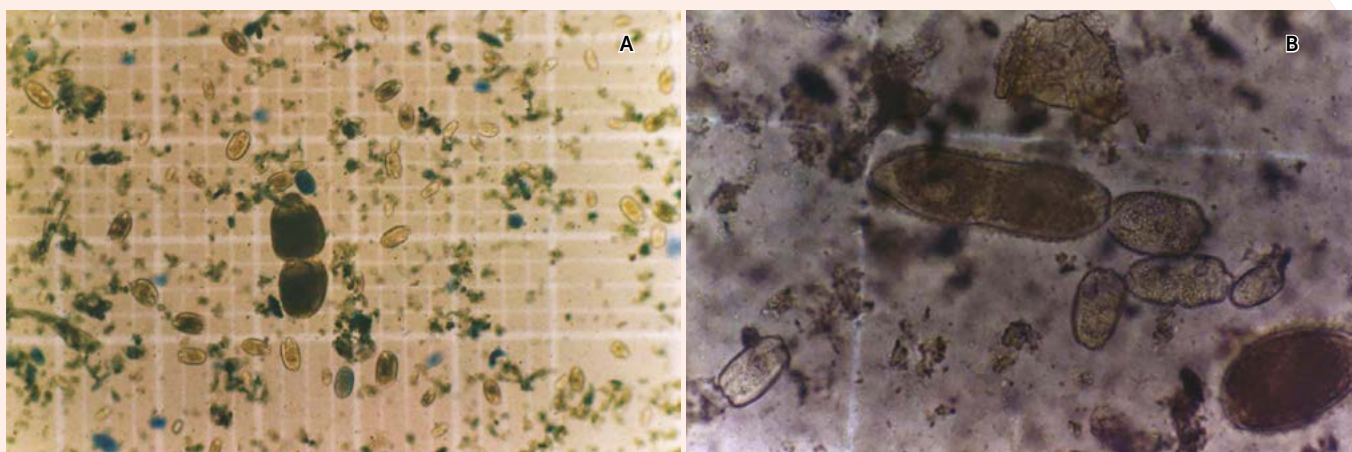


Figura 1. Protozoarios ciliados del rumen de la orden Entodiniomorfa. A: Protozoarios de las órdenes Entodiniomorfa (*Entodinium* spp.). B: Tricostomatida (*Holotricos* spp.).

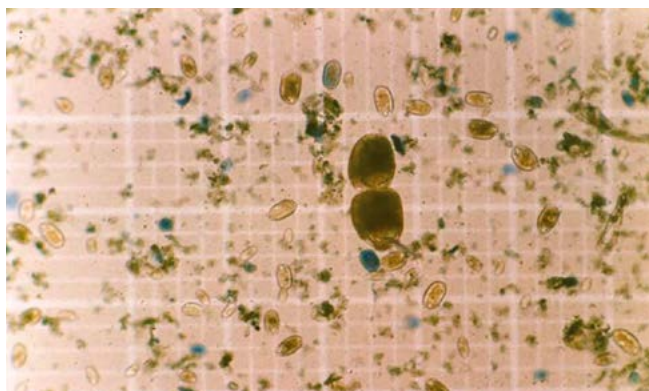


Figura 2. Protozoarios en fase reproductiva (fisión binaria) en un medio de cultivo *in vitro*.

medicinal), con propiedades tóxicas contra los protozoarios, aunque en la mayoría de los casos con poca eficacia y sin datos que afirmen dicho efecto (Navas-Camacho *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997). Por tanto, la CD de los agentes químicos reportados en la literatura ha sido puesta en duda (Ley de Coss *et al.*, 2011a; 2011b). Metabolitos secundarios tales como, alcaloides, saponinas, taninos, aminoácidos no proteínicos, micotoxinas, terpenoides, esteroides, lecitinas, inhibidores de proteasas y fenoles son producidos por las plantas como un mecanismo de defensa contra otras plantas, animales, insectos depredadores e infecciones microbianas (D'Mello, 1992; Newbold *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1994) y compuestos análogos de la tirosina (mimosina) y los productos de su degradación (3,4 dihidroxipiridina) que están en *Leucaena leucocephala*, *Mimosa púdica* y *Pittosporum undulatum*, y la 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA), presente en *Vicia faba*, *Mucuna* spp y *Stizolobium deeringianum* (ahora *Mucuna aterrima*), se ha identificado que tienen un efecto tóxico para el animal, pero no para los protozoarios ciliados. Mientras tanto, los efectos de estos compuestos producen cambios en el metabolismo ruminal con aumentos en la concentración de ácidos grasos voláti-

les (AGV) y reducción en amoníaco (Domínguez, 1993; Navas-Camacho *et al.*, 2001). El efecto defaunante ha sido atribuido a la presencia de: saponinas para *Sapindus saponaria* y *Medicago sativa*, taninos condensados para *B. cordata* y *V. perymenioide*, y glucósidos cianogénicos en *B. cordata*, aunque la CD del extracto de ciertas plantas han mostrado efecto variable; en otras se ha reportado eliminación o disminución en la población de protozoarios del rumen (Thi, 1998; McSweeney *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 1994). Los compuestos antihelminéticos, como la antitripanosoma y la amebicida, identificados como monoterpentenos (ascaridole) y aceites esenciales con efecto defaunante, han identificado en algunas plantas como *C. ambrosioides*. En la menta (*M. piperita*), planta sin efecto defaunante (Ley de Coss *et al.*, 2011a), identificaron más de 100 compuestos químicos con efecto bactericida, fungicida, antiviral y vermífugo, además de mentol, mentona, metil-ésteres y monoterpentenos (puleguna, piperitona, mentofurano y jasmona) (Schmelzer y Gurib-Fakin, 2008). Por lo anterior, es poco confiable asegurar que la CD esté relacionada con los compuestos químicos presentes, ya que se ha reportado la presencia de éstos en las plantas que han eliminado protozoarios, como *B.*

cordata y *V. perymenioides*, y en aquellas donde no hay tal efecto, como *D. inoxia*. En estas tres últimas plantas se han reportado diversos compuestos químicos; por ejemplo, en *B. cordata* los que tienen capacidad analgésica, diurética y antiséptica (Ortiz, 1996; Schmelzer y Gurib-Fakin, 2008), bactericida y amebicida (Ordaz, 1996), mientras que en *D. anoxia* se han identificado compuestos con efectos alucinógenos, además de sustancias con efecto desparasitante, principalmente contra amibas (Bonde, 2001), compuestos como atropina, daturina, hiosciamina, hioscina, escopolamina (Janthangvith *et al.*, 2000), alta concentración de alcaloides (ácido cafeínico, clorogénico, para-cumárico y ferúlico), además de esteroides (campesterol, datura lactona y estigmasterolilla) y triterpenos en cantidades de 0.5% a 1.1% (Chaudhary y Srivastava, 1995). En *Argemone mexicana*, que es una planta tóxica para el ganado, se encuentran alcaloides que atacan el sistema nervioso central, tales como berbecina, protopina, protopinahidroclorina, sanguinarina y dihydro-sanguinarina (Schmelzer y Gurib-Fakin, 2010). También se ha observado que la fracción soluble en agua de *Yucca schidigera* contiene un alto contenido de saponinas, resveratrol (3,4,5 trihidroxistilbeno), fenoles, 3,3,5,5, tetrahidroxil-4-metoxitilbeno y yucaols A y C (Sen *et al.*, 1998). En un estudio *in vitro*, con el extracto de saponina proveniente de esta planta, usando dosis de 0.5 mg mL⁻¹, la cantidad de protozoarios fue reducida drásticamente, aunque no se logró una eliminación total de la fauna del rumen (Wang *et al.*, 1988).

Otro grupo de plantas evaluadas como *A. mexicana*, *B. vaccinioides*

e *Y. schidigera* presentaron CD, mientras que *Hibiscus rosa-sinensis* y *M. alba* mantuvieron una cantidad similar a la observada en el tratamiento testigo (1.22×10^4 protozoarios mL^{-1}). Se ha reportado que los extractos de *B. vaccinioides* y *M. leucanta* tienen CD desde las 24 h de incubación en medios de cultivo *in vitro* (Dehority, 2003). Por lo anterior, más que la presencia de múltiples compuestos secundarios "tóxicos", se podría sugerir que es la concentración lo que estaría afectando la población de protozoarios, aunque también se ha reportado que en las poblaciones en rumen se adaptan y metabolizan compuestos secundarios presentes en las plantas forrajeras (Thi, 1998; McSweeney *et al.*, 1999).

Otras técnicas de desfaunación

En la búsqueda de técnicas para desfaunar rumiantes se han evaluado distintos métodos, como el retiro del contenido ruminal y posterior lavado con ácido acético o láctico (Klita *et al.*, 1996), o la adición de diocil sulfato de sodio (jabones) (Chandramoni *et al.*, 2002); en la mayoría de los casos han ocasionado problemas en la salud o muerte de los animales (Lovelock *et al.*, 1982), sin llegar a eliminar o reducir significativamente la cantidad de protozoarios (Osdemir *et al.*, 2006), otro agente químico antiprotozoario con una alta CD fue el Secnidazol[®], con una efectividad de 100% en menos de 24 h (Ley de Coss, 2003). La efectividad para desfaunar ha sido variable; otras técnicas han sido el aislamiento desde el nacimiento del becerro (Abou-Akkada *et al.*, 1968), adición de peróxido de calcio al rumen (Demeyer, 1982), o bien, aceites minerales (Newbold y Chamberlain, 1988), pero sin efecto alguno sobre la población de protozoarios.

CONCLUSIONES

Es posible mantener una población de protozoarios viables superior a 10^3 durante 72 h en un medio de cultivo anaerobio. Los resultados obtenidos bajo condiciones experimentales permiten sugerir que las plantas evaluadas tienen diferente capacidad desfaunante y que ésta podría no estar directamente relacionada con el tipo de metabolito, sino con la concentración de estos compuestos. La CD de las plantas podría estar también relacionada con factores nutritivos ya que, por ejemplo, la degradación de la materia seca (DMS) resultó afectada principalmente por la cantidad de fibra en la dieta y el porcentaje de proteína cruda (PC). En este caso se encontró que a mayor cantidad de PC se aumentó la DMS ($r^2=0.53$; $p<0.01$); por el contrario, a mayor cantidad de fibra se tuvo una disminución en la DMS ($r^2=-0.54$; $p<0.01$); en este sentido, un bajo contenido de

nutrientes y/o baja degradación puede afectar la supervivencia de los protozoarios, sin que esto indique la presencia de un compuesto tóxico. De acuerdo con los resultados revisados, se puede considerar que las plantas multipropósito con actividad desfaunante pueden tener uno o varios metabolitos tóxicos que afecten a los protozoarios; por ello, se sugiere que la técnica de cultivo *in vitro* de protozoarios debería mantener poblaciones por arriba de 10^4 microorganismos por mL^{-1} de medio y hacer pruebas cualitativas o de identificación del o de los compuestos tóxicos involucrados. Es recomendable continuar estudiando el efecto sobre las poblaciones microbianas (protozoarios, hongos y bacterias) del rumen y los compuestos secundarios presentes en las fracciones soluble e insoluble de plantas forrajeras.

LITERATURA CITADA

- Abou A.A.R., Barthey E.E., Berube R., Fina L.R., Meyer R.M., Henricks D. Julius F. 1968. Simple method to remove completely ciliate protozoa of adult ruminants. *Appl. Microbiol.* 16: 1475-1477.
- Leng R.A. 1990. 1990. Factors affecting the utilization of poor quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Reviews.* 3:277-303.
- Bird S.H., Romulo B., Leng R. A. 1994. Effects of lucerne supplementation and defaunation on feed intake, digestibility, N retention and productivity of sheep fed straw-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45: 119-129.
- Bird S.H., Hill M.K., Leng R.A. 1979. The effect of defaunation on the growth of lambs on low-protein, high energy diets. *British Journal of Nutrition* 42:81-87.
- Bonde K. 2001. The genus *Datura*: From research subject to powerful hallucinogen. Online:http://www.leda.lycaeum.org/Documents/The_Genus_Datura:_From_Research_Subject_to_Power. April 10, 2010.
- Chandramoni S.B., Tiwari M.C. Haque N., Lal N., Jadhao B., Khan M.Y. 2002. Energy balance in faunated and defaunated sheep on a ration high in concentrate to roughage (good quality) ratio. *Pakistan J. of Nutr.* 1: 31-33.
- Chaudhary L., Srivastava A. 1995. Performance of growing Murrah buffalo calves as affected by treatment with manoxol and the presence of ciliate protozoa in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51: 281-286.
- Cobos M.A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. *In*: Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. (Eds). *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Ed. Trillas. 498-516 pp.
- Coleman G.S. 1981. Cultivation of rumen Entodiniomorphid protozoa on tropical animal feeds. *Trop. Anim. Prod.* 6:11-14.
- D' Mello J.P.F. 1992. Chemical constraints to use of tropical legumes in animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38:237-261.
- Dehority B.A. 2003. Distribution, specificity and role of the rumen protozoa. *Rumen Microbiology*. Ed. Nottingham Univ Press. London. 129-155 pp.
- Dehority B.A. 2003. Metabolism, nutrition and growth of rumen protozoa. *Rumen Microbiology*. Ed. Nottingham University Press. London. 101-127 pp.

- Díaz A., Avendaño M., Escobar A. 1994. Evaluating of *Sapindus saponaria* as a defaunation agent and its effects on different ruminal digestion parameters. *Livest Res. Rural.* 5:1-10.
- Dominguez B., Jean G., Jovang P., Michelangch F., Chemello M.E. 1993. *In*. Toxicity in MA- 104 cells and rumen protozoa of some phytotoxins. Their Effects on fermentation by faunated and defaunation rumen Inocula. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2045-2050.
- De León L.W. 2012. Nivel de Cuajilote (*Parmentiera edulis*) en un medio de cultivo *in vitro* para mantener vivos a los protozoarios ciliados del rumen. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV. Universidad Autónoma de Chiapas. Huehuetán, Chiapas, México.
- Demeyer D.I. 1982. Influence of calcium peroxide on fermentation pattern and protozoa in the rumen. *Arch. Fur Tierer.* 32: 579-593.
- Eugene M., Archimede H., Michalet-Doreau B., Fonty G. 2004. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Anim. Res.* 53:187-200.
- Fondevila M., Dehority B.A. 2001. Preliminary study on the requirement of *Entodinium exiguum* and *Entodinium caudatum* for live or dead bacteria when cultured *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:41-45.
- Hungate R.E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev.* 14:1-49. 1950.
- Hsu J.T., Fahey G.C. Jr, Berger L.L., Mackie R.I., Merchen N.R. 1991. Manipulation of nitrogen digestion by sheep using defaunation and various nitrogen supplementation regimens. *J. Anim. Sci.* 69:1290-1299.
- Janthangvith J., Chumsri P., Kraisintu K., Pongpan A. 2000. Comparison of tropane alkaloid production by *Datura innoxia* and *Datura metel* varieties of White, soil, hydroponic, *in vitro* plant cultura and tranformed root cultura. Mahidol University anual Research Abstracts. Online: <http://www.hahidol.ac.th/abstracts/annual1999/0355.thm>. January 20, 2010.
- Jouany J.P., Demeyer D., Grain J. 1988. Effect of defaunation the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:165-172.
- Klita P.T., Mathison G.W., Fenton T.W., Hardin R.T. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74:1144-1156.
- Lee S.S., Ha J.K., Cheng K.J. 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3807-3813.
- Ley de Coss A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. Tesis de Grado. 98 pp.
- Ley de Coss A., Cobos-Peralta M., Hernández-Sánchez D., Guerra-Medina E. 2011a. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y valuación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Rev Científ. FCV-LUZ.* XXI (1): 43-49.
- Ley de Coss A., Martínez-Tinajero J.J., Marroquín-Agreda F.J., García-Castillo C.G., Montañez-Valdez O.D., Guerra-Medina E. 2011b. La capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Rev Científica FCV-LUZ.* Vol. XXI (5): 414-420.
- Lovelock L.K.A., Buchanan-Smith J.G., Forsberg C.W. 1982. Difficulties in defaunation of the ovine rumen. *Can. J. Anim. Sci.* 62:299-303.
- Mcsweeney C.S., Palmer B., Bunch R., Krause D.O. 1999. Isolation and Characterization of Proteolytic Ruminal Bacteria from Sheep and Goats Fed the Tannin-Containing Shrub Legume *Calliandra calothyrsus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:307-3083.
- Mendoza G.D., Britton R.A., Stock R.A. 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 71:1572-1578.
- MichaEowski T., Rybicka K., Wereszka K., Kasperowicz A. 2001. Ability of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for *in vitro* growth. *Acta Protozool.* 40:203-210.
- Navas-Camacho A., Cortes J.E., Gutiérrez A. 2001. Efecto de la reducción de la población de protozoarios ciliados sobre el funcionamiento ruminal en ovinos alimentados con tamo de trigo. Programa Nacional de Nutrición Animal. C.I. CORPOICA. Bogotá. Colombia. 7. 12-17 pp.
- Navas-Camacho A., Laredo M.A., Cuestas A., Ortega O., Romero M. 1994. Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate ciliate protozoa from the rumen. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3:204-212.
- Newbold C.J., El Hassan M.S., Wang J., Ortega M.E., Wallace R.J. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Brit. J. Nutr.* 78:237-249.
- Newbold C.J., Chamberlain D.G. 1988. Lipids as rumen-defaunation agents. *Proceeding of Nutrition Society*, 47:154A.
- Ordaz P. 1996. Evaluación *in vitro* de la actividad amebicida de compuestos obtenidos de *Buddleia cordata* sobre varias especies de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. Tesis de Grado. 59 pp.
- Ortiz Z. 1996. Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. Tesis de Grado. 75 pp.
- Osdemir M.M., Cinar M., Haliloglu S., Eryavuz A. 2006. Effects of defaunation and dietary nitrogen source on sodium, potassium, iron and zinc in the rumen fluid, plasma and wool of lambs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30: 1-7.
- Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A. 2008. Medicinal Plants. PROTA Foundation. Plants Resources of Tropical Africa. Backhuys publishers. Wageningen, Netherlands. Pp 105-108. Online: <http://www.book.google.com.mx>. November 8, 2010.
- Sen S., Makkar H.P., Muetzel S., Becker K. 1998. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 27:35-38.
- Thi H.N.N. 1998. Effect of *Sesbania grandiflora*, *Leucaena leucocephala*, *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ceiba pentadra* on intake, digestion and rumen environment of growing goats. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia. *Livestock Research for Rural Development*.10 (3):12-24. Online: <http://www.cipav.org.co/lrrd>. April 10, 2010.
- Van Nevel C.J., De Smet S., Demeyer D.I. 1993. Digestion in defaunated and refaunated sheep fed soybean oil hydrolysate or crushed toasted soybeans. *Neth. J. Agri. Sci.* 41:205-219.
- Wang Y., Mc Allister T.A., Newbold C.J., Rode L.M., Cheeke R.P., Cheng K.J. 1988. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:143-153.