

Artículo de revisión

Identificación y degradación de mimosina, un compuesto tóxico en *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Identification and degradation of mimosine, a toxic compound in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Luis Alejandro Ospina-Daza, María Eugenia Buitrago-Guillen y Julio Ernesto Vargas-Sánchez

Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10. apdo. aéreo 275, Manizales, Colombia

Correo electrónico: alejo.mvz7@gmail.com

Resumen

Leucaena leucocephala es conocida por ser una arbustiva que genera beneficios nutricionales para la producción ganadera en el mundo. No obstante, su consumo se ha limitado debido a factores antinutricionales como la mimosina, tóxico propio de la planta. Esta revisión recopila investigaciones de diferentes autores que identificaron y caracterizaron bacterias halladas en el rumen y en la rizosfera de las plantas, capaces de degradar la mimosina y sus productos de degradación, 3,4 y 2,3-dihidroxipiridona (3,4 y 2,3 DHP). La degradación de la mimosina (aminoácido no proteico que se encuentra en las hojas y las semillas de *L. leucocephala*) por las bacterias es un factor fundamental en la protección de los animales cuando consumen leucaena. La mimosina y sus productos de degradación han sido usados en la rizosfera por la cepa TAL1145 de *Rhizobium*, como fuente de carbono y nitrógeno; mientras que a nivel ruminal bacterias como *Synergistes jonesii* pueden degradarla. Recientes investigaciones han evidenciado que otras bacterias ruminales, como *Streptococcus lutetiensis* poseen la capacidad de degradar este compuesto. Tales avances llevarán a la especie *L. leucocephala* a otro nivel de conocimiento, en aras de buscar la mayor eficiencia y seguridad en su uso para la alimentación animal.

Palabras clave: alimentación de los animales, *Streptococcus lutetiensis*, *Synergistes jonesii*.

Abstract

Leucaena leucocephala is known for being a shrub that generates nutritional benefits for animal husbandry in the world. Nevertheless, its consumption has been limited due to antinutritional factors such as mimosine, a toxic that exists in the plant. This review compiles studies by different authors who identified and characterized bacteria found in the rumen and in the rhizosphere of the plants, capable of degrading mimosine and its degradation products, 3,4- and 2,3-dihydroxypyridone (3,4 and 2,3 DHP). Mimosine (non-protein amino acid which is found in *L. leucocephala* leaves and seeds) degradation by bacteria is a fundamental factor in the protection of animals when consuming leucaena. Mimosine and its degradation products have been used in the rhizosphere by the strain TAL1145 of *Rhizobium*, as carbon and nitrogen source; while at rumen level bacteria such as *Synergistes jonesii* can degrade it. Recent studies have proven that other rumen bacteria, like *Streptococcus lutetiensis* have the capacity to degrade this compound. Such advances will take the species *L. leucocephala* to another knowledge level, in order to search for higher efficiency and safety in its use for animal feeding.

Keywords: animal feeding, *Streptococcus lutetiensis*, *Synergistes jonesii*.

Introducción

En el trópico, la nutrición de los rumiantes se basa principalmente en el consumo de pastos, subproductos de cosechas y, en menor medida, alimentos conservados, tales como ensilajes y harinas. No obstante, las gramíneas utilizadas en la alimentación poseen altos contenidos de fibra y bajos porcentajes proteicos, lo que trae como resultado una reducción considerable en el desarrollo general del animal, particularmente en la época de seca (Villanueva *et al.*, 2013). Un gran número de árboles forrajeros, fundamentalmente leguminosos, se utilizan como

suplemento en las dietas de baja calidad nutricional; estos se caracterizan por presentar un alto contenido de proteína y buena digestibilidad, comparados con los pastos (Pereyra *et al.*, 2015).

Además de su favorable composición química, los árboles y arbustos forrajeros tienen otras propiedades positivas, ya que ayudan a recuperar suelos degradados (Rangel *et al.*, 2016), incrementan su contenido de nutrientes debido a la simbiosis que establecen con bacterias del género *Rhizobium* (Higashide, 2014), protegen contra la erosión, y también pueden usarse como combustible y materiales de construcción.

Todas las especies de leguminosas contienen metabolitos secundarios, algunos de los cuales se denominan factores antinutricionales (FAN), que pueden causar un efecto negativo en el valor nutricional del alimento, así como en la salud animal. Los FAN pueden definirse como aquellas sustancias generadas por el metabolismo natural de las especies vegetales, y que, por diferentes mecanismos, ejercen resultados contrarios en la nutrición óptima de los animales, por causar disminución de los efectos digestivos y/o metabólicos (Rodríguez y Ledesma, 2014).

Las leguminosas generan estas sustancias a través de su metabolismo secundario, como un mecanismo de defensa ante el ataque de mohos, bacterias, insectos y pájaros; o, en algunos casos, como producto del metabolismo cuando están sometidas a condiciones de estrés. Estas plantas, al estar contenidas en los ingredientes de la dieta, reducen el consumo e impiden la digestión, la absorción y la utilización de los nutrientes por el animal (Casso y Montero, 1995).

Entre los FAN más estudiados, presentes en la mayoría de las especies de leguminosas, se pueden citar: lecitinas, taninos, glucósidos cianógenos, vicina y convicina, oligosacárido galactosil sacarosa, gomas galactomananas, saponinas, aminoácidos no proteicos, neurolaterígenos, análogos de arginina, alcaloides, ácido fítico, proteínas antigénicas y aminoácidos aromáticos; y entre estos últimos destaca la mimosina [3-N-(3-hidroxi-4-piridona) ácido-ao-aminopropiónico], presente en *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Casso y Montero, 1995).

El objetivo de esta revisión fue recopilar investigaciones realizadas por diferentes autores que identificaron y caracterizaron bacterias capaces de degradar la mimosina y sus productos de degradación, las cuales fueron halladas en el rumen y en la rizosfera de las plantas.

Características de la mimosina

La mimosina es un aminoácido no proteico, presente en la leguminosa forrajera tropical *L. leucocephala*, la cual ha sido responsable de síntomas de toxicidad en algunas especies de animales domésticos; entre estos síntomas destacan: alopecia, anorexia, pérdida de peso, salivación profunda, lesiones a través del esófago, papilas necróticas en el rumen y el retículo, hiperplasia de la glándula tiroidea y bajos niveles de hormona tiroxina circulante (Xuan *et al.*, 2013).

La mimosina posee un anillo aromático de 3-hidroxi-4-(1H)-piridona (3,4 DHP) (Nguyen y Tawata, 2016). Este compuesto desempeña un papel importante en la resistencia de la planta a una gran variedad de agentes fitopatógenos; además, por ser estructuralmente análogo a la tirosina, le permite un comportamiento inhibidor o antagonista en muchos procesos en los que esta es intermediaria. En los animales intoxicados por consumo de mimosina se manifiesta un efecto sobre la producción, que incluye bajos índices reproductivos debido a mortalidad embrionaria precoz y muerte perinatal (Hammond, 1995).

El anillo aromático de 3,4DHP se encuentra en estado libre en el rumen y en la circulación de los animales intoxicados, lo que indica que la mimosina es fácilmente hidrolizada en el rumen y excretada a nivel renal (Barros-Rodríguez *et al.*, 2012). También se han encontrado pequeñas cantidades de mimosina en los nódulos nitrificantes de *L. leucocephala* y en el exudado adyacente a sus raíces, que es degradado a través de cepas del género *Rhizobium*; por otra parte, cuando los animales no adaptados se alimentan con leucaena por encima del 30 % de materia seca (MS) en su dieta, ello puede inducir cuadros de toxicidad y causar la muerte (Soedarjo y Borthakur, 1998).

Estudios recientemente publicados demuestran los esfuerzos para disminuir los contenidos de mimosina de las hojas de *L. leucocephala* utilizando metanosulfonato de etilo (EMS), y de esta forma mejorar el valor nutricional de la planta. Con este avance los silvicultores pretenden reducir significativamente el precio de la alimentación animal en el futuro (Zayed *et al.*, 2014).

Identificación molecular de la mimosina

A pesar que *L. leucocephala* se considera como una promisoriosa fuente alternativa de proteína, y que además puede ayudar a mitigar la emisión de metano ruminal (CH₄) en los trópicos (Soltan *et al.*, 2013), la presencia de mimosina en un 2-10 % de MS en la hoja y en un 2-5 % de MS en la semilla limita la cantidad de follaje que se puede suministrar al ganado, ya que la mimosina (agente depilatorio) y su producto de degradación 3-hidroxi-4 (DHP)³ (potente bociógeno) se consideran tóxicos para muchas especies. La resistencia parcial a la toxicidad por mimosina en rumiantes de ciertas áreas geográficas ha sido atribuida a la capacidad de sus microorganismos ruminales, los que, restrictivamente, metabolizan mimosina y DHP. Un ejemplo es el

ocurrido en Hawái, en el que cabras resistentes, con microorganismos eficientes que contrarrestaban los efectos de la toxicidad por mimosina, transfirieron los microorganismos al rumen del ganado de Australia, que era susceptible a dicha toxicidad (Lalitha *et al.*, 1993).

Para la identificación de la mimosina y el DHP, el método de reacción más comúnmente usado es el colorimétrico con FeCl_3 (Ilham *et al.*, 2015). Este tiene poca sensibilidad y especificidad, ya que su pobre solubilidad en solventes acuosos y orgánicos limita su aplicación, pues requiere una alta concentración para tener medidas precisas. La cromatografía de gas-líquida, la cromatografía líquida y la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa de pares de iones requieren de instrumentación sofisticada y no brindan una mejoría en la sensibilidad (Lalitha *et al.*, 1993).

El método espectrofotométrico para la estimación de mimosina y/o DHP es más sensible que otros reportados, y puede ser el más adecuadamente acoplado a una cromatografía de intercambio de iones y cromatografía de papel para el ensayo específico de estos compuestos. Este se basa esencialmente en la formación de un color amarillo intenso azoico entre la mimosina y/o DHP y la sal diazonio de p-nitroanilina (Ilham *et al.*, 2015).

Aplicando la espectrofotometría se estimó que la cantidad de mimosina en las hojas de *L. leucocephala* varía entre 3,75 y 5,5 % de MS, en dependencia del tipo de hojas, la estación, la calidad de la tierra, etc. Debido a la alta sensibilidad del procedimiento, la mimosina fue detectable en los extractos decolorizados con carbón activado incluso después de altas diluciones, y las concentraciones de otros compuestos interferentes se volvieron despreciables para estas diluciones. Una aplicación útil de esta técnica se extendió a la evaluación de la toxicidad de la mimosina en el material de alimentación experimental basado en hojas de *L. leucocephala*. Las observaciones tempranas indicaron que, durante la degradación anaeróbica de estas hojas usando inóculo específico mezclado, la mimosina era activamente metabolizada, como lo mostró el método con FeCl_3 después de la separación de la cromatografía de papel. Al aplicar el método antes descrito se confirmó que únicamente permanecían rastros de mimosina y de DHP, lo que indicaba casi el 99 % de degradación en 48 h, y la biomasa sólida hacía una elección adecuada de material de alimentación con alto contenido en proteína. En la comparación del método reportado con otras técnicas de estimación

de mimosina se comprobó que el colorimétrico con FeCl_3 requiere una solución de 20-500 μl para una medición precisa (Lalitha *et al.*, 1993).

Degradación de la mimosina a partir de cepas de *Rhizobium* sp.

La mimosina es una toxina que se encuentra en grandes cantidades en las semillas y en las hojas de los árboles y arbustos de leguminosas del género *Leucaena*. En su estructura es análoga de la dihidroxifenilalanina (L-Dopa) con un anillo de 3-hidroxi-4-piridona en lugar de un anillo de 3,4-dihydroxifenil (Nguyen y Tawata, 2016). Esta toxina está distribuida en toda la planta, y se encuentra del 4 al 5 % en las semillas (base seca); en diferentes partes de la planta, como los tallos y las hojas, puede variar del 1 al 12 %, y en la raíz del 1 al 1,5 % (Soedarjo *et al.*, 1994). Se ha demostrado que algunas cepas del género *Rhizobium* pueden degradar la sustancia mimosina.

Según el trabajo realizado en Hawái por Soedarjo *et al.* (1994), un total de 32 cepas han sido recolectadas y se han cultivado en medios óptimos, como TY (Beringer, citado por Martínez *et al.*, 2015); medio completo para crecimiento de rizobios, YEM (Vincent, citado por Abrahamovich *et al.*, 2014); extracto de levadura-manitol (usado también para cultivo de rizobios) y un medio de *Rhizobium*-mimosina (RM), con el objetivo de saber cuáles de las cepas colectadas tenían la capacidad de crecer en un medio con la toxina. Se determinó que las cepas TAL1145 y TAL1566 poseían capacidad para utilizar la mimosina como única fuente de carbono y nitrógeno. Las tasas de crecimiento de dichas cepas en medio RM con diferentes concentraciones de mimosina se determinaron mediante la inoculación de 50 mL de este medio en botellas con tapón de rosca, de 250 mL, que contenían 0,5 mL de cultivo de *Rhizobium*. Los cultivos se sometieron a 28 °C, con agitación, y el crecimiento se determinó cada 6 h mediante la medición de la densidad celular como la densidad óptica en un colorímetro.

Se determinó que solo un número limitado de cepas de *Rhizobium* podía utilizar la mimosina como sustancia de crecimiento selectivo; en contraste, las cepas que no tenían esta capacidad formaron nódulos fijadores de nitrógeno, como es el caso de la MS13. La utilización de la mimosina puede ser un mecanismo especializado que algunos rizobios que viven en la rizosfera de la leucaena han desarrollado para sobrevivir, lo que proporciona una ventaja competitiva a ciertas

cepas de *Rhizobium*. No se logró establecer una relación directa entre la capacidad de catabolizar mimosina y la capacidad de fijar nitrógeno, debido a que dos cepas, TAL1145 y TAL1566, degradan mimosina y la usan como fuente de nitrógeno y carbono, pero solo TAL1145 es buena formadora de nódulos nitrificantes, a diferencia de TAL1566 que tiene deficiencias para formarlos (Soedarjo *et al.*, 1994).

En un estudio posterior a este, en la isla de Guam, se empleó la cepa de mejores resultados en cuanto a nodulación y aprovechamiento de la mimosina para sí misma, en términos de nitrógeno y carbono (TAL1145). Para ello se aislaron *Rhizobium* indígenas de los nódulos de *L. leucocephala*, con el fin de verificar si estos tenían la capacidad de degradar la mimosina y examinar si contenían el gen *midA*. Como se mencionó anteriormente la leucaena nodula con varios tipos de *Rhizobium*, tales como *Rhizobium* cepa TAL1145, *Rhizobium* cepa NGR234, y con cepas de *Rhizobium tropici*, como CIAT899. Entre estos rizobios, solamente la cepa TAL1145 y algunas cepas relacionadas pueden degradar la mimosina y utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno, mientras que cepas como CIAT899 y NGR234 no pueden degradarla (Soedarjo *et al.*, 1994).

Después de aislar los rizobios, realizar el cultivo de las cepas halladas y someterlas a un medio líquido RM, y aislar y amplificar el ADN genómico de las cepas de *Rhizobium* que aprovecharon la mimosina se concluyó que ocho de las 11 cepas aisladas la utilizaban, ya que el medio RM cambió de color amarillo parduzco a incoloro. Esto fue corroborado por Soedarjo *et al.* (1994), quienes demostraron que la mimosina no se detectó en el medio por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) cuando el medio se volvió incoloro, con presencia de rizobios que la degradan. Como se muestra en la tabla 1, de los ocho degradantes de mimosina solo tres cepas generaron el fragmento de PCR 1055-pb, lo que sugiere que estas cepas contenían el gen *midA* de la cepa TAL1145 (Marutani *et al.*, 1999).

Según lo descrito anteriormente, se evidenció la importancia de conocer más a fondo las cepas pertenecientes al género *Rhizobium*, que tienen la facultad de utilizar la mimosina y su producto de degradación 3,4 y 2,3 hidroxipiridona.

Soedarjo *et al.* (1994) aislaron en diferentes partes del mundo algunas cepas de *Rhizobium* de los nódulos de leucaena que cumplían con esta condición y que, además, podían utilizarla como fuente de carbono y nitrógeno. Aunque no se requiere la capacidad de catabolizar mimosina para la nodulación y la fijación de nitrógeno, esto proporciona una

ventaja competitiva a los *Rhizobium* degradantes de la mimosina (*mid+*) en la rizosfera de la leucaena, al proveer una fuente selectiva de nutrientes y, al mismo tiempo, la inhibición del crecimiento de otros microorganismos y rizobios (Soedarjo y Borthakur, 1998). La cepa de *Rhizobium* TAL1145 es una de esas cepas *mid+*, conocida por ser competitiva para la ocupación del nódulo en la leucaena (Siddiqi y Athar, 2013), y se ha descrito como una formadora muy eficaz de nódulos fijadores de nitrógeno en *Leucaena* spp. La coincidencia en la capacidad de fijación eficiente de N_2 y la capacidad competitiva de esta hacen que sea una opción ideal para su uso en preparaciones de inóculos.

Para identificar y caracterizar los genes *mid* presentes en el fragmento de 12 a 6 kb de TAL1145, los cuales son requeridos para la degradación de mimosina, se aisló el cósmido pUHR181 a partir de una biblioteca de clones de TAL1145 (Borthakur *et al.*, 2003). Cuando este cósmido fue transferido a cepas no degradantes (*mid-*), como TAL182 y CIAT899, el producto de degradación 3-hidroxi-4-piridona (HP) se acumuló en el medio de cultivo. Esto sugirió que pUHR181 contenía genes para la degradación de la mimosina a HP. El plásmido pUHR191 es un derivado de pUHR181 que contiene un inserto de 12 a 6 kb, construido por la eliminación de un fragmento de aproximadamente 10 kb de pUHR181. Los transconjugantes de TAL182 y CIAT899 contienen pUHR191 que convierten mimosina en HP (Borthakur *et al.*, 2003).

Inicialmente se establecieron 12 TAL1145 defectuosos en la degradación de la mimosina (*mid-*); estos se hicieron a través de Tn3Hogus (transposon), TnphoA (bacteriófago) o inserciones de casete de resistencia a la kanamicina. Un fragmento PstI (una enzima de restricción) de 5-0 kb de TAL1145, subclonado a partir de un clon cósmido que contiene genes *mid* para la degradación de mimosina, complementa la mayoría de los mutantes *mid-*. La secuenciación de este fragmento y el fragmento PstI de 0-9 kb que se encuentra adyacente identificó cinco genes: *midA*, *midB*, *midC*, *midD* y *midR*, de los cuales los tres primeros codifican proteínas transportadoras ABC implicadas en la absorción de mimosina; mientras *midD* codifica una aminotransferasa requerida para degradar la mimosina en HP, y *midR* es un gen regulador que codifica un activador transcripcional de tipo LysR. Por lo tanto, los genes *mid* son específicos para el *Rhizobium* de la leucaena y están ausentes en las cepas *Rhizobium* y en *Bradyrhizobium* spp. (Borthakur *et al.*, 2003).

Tabla 1. Habilidad para utilizar la mimosina y detección del gen midA de TAL1145 en diferentes cepas

| Sitio de muestreo/ tipo de suelo | N.º de cepa | Habilidad para utilizar mimosina como fuente de C y N | Detección del fragmento 1055 pb |
|----------------------------------|-----------------------------|---|---------------------------------|
| Barrigada/ | B1 | + | - |
| Pulantat | B2 | + | - |
| | B4 | + | - |
| | B5 | + | - |
| | B7 | ND (contaminado) | + (débil) |
| | B9 | + | + |
| | B10 | + | + (débil) |
| | B12 | + | + |
| | B19 | - | - |
| | B24 | - | +/- (muy débil) |
| | B26 | + | - |
| Yigo/ | Y1 | - | ND |
| Guam arcilla cobbly | Y2 | - | ND |
| | Y3 | - | ND |
| | Y4 | + | ND |
| | Y5 | - | + |
| | Y7 | - | ND |
| | Y9 | - | ND |
| Control/ | <i>Rhizobium</i> TAL1145 | + | + |
| | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | - | ND |

Fuente: Marutani *et al.* (1999).

+: cepa con capacidad de utilizar mimosina como nutriente, e indica la detección positiva del fragmento 1055 pb.

-: cepa sin capacidad para catabolizar la mimosina, y no indica la detección del fragmento 1055 pb.

ND: cepa que no se incluyó en el bioensayo ni en el análisis por PCR.

Tal como en la cepa TAL1145 se pudo determinar la presencia de genes responsables de la degradación y utilización de la mimosina, se debe estudiar más a profundidad cepas eficientes en la nodulación, que tengan potencial de degradar otros factores antinutricionales (Xu *et al.*, 2013).

Degradación de la mimosina a partir de bacterias ruminales

La leguminosa arbórea *L. leucocephala* es un alimento de alta calidad que se emplea en los rumiantes, el cual es de vital importancia para la producción ganadera en los trópicos, a pesar de la presencia de mimosina en sus hojas. Este aminoácido tóxico no proteico limita la productividad y afecta adversamente la salud de los animales (Halliday *et al.*, 2013). Dado que *L. leucocephala* tiene gran potencial en la producción, se han realizado estudios en aras de conocer más específicamente qué microorganismos ruminales podrían estar involucrados

en la degradación de los productos derivados de la mimosina y así reducir la toxicidad en los rumiantes.

En Venezuela, Domínguez-Bello y Stewart (1991) aislaron una bacteria perteneciente al género *Clostridium* en ovejas alimentadas con leucaena que no desarrollaron síntomas tóxicos, la cual tenía la capacidad de degradar la 3-4 DHP. Para el aislamiento de la bacteria se utilizó contenido clarificado del rumen, que se sometió al crecimiento de bacterias en un medio de cultivo; este contenía micro- y macrominerales, resazurina, cisteína, fitona (peptona de soya) y azúcares, que en su conjunto promovían el crecimiento bacteriano. Adicionalmente, el medio se gaseó utilizando CO₂ y quedó libre de oxígeno. Para la identificación de las bacterias anaerobias se usaron dos sistemas de pruebas comerciales (API-20A y 32A ATB), consistentes en tiras de cúpulas de ensayo que contenían sustratos deshidratados y propiciaban el crecimiento de bacterias del género *Clostridium*; a las bacterias que

crecieron en los sistemas API se les adicionó mimosina, 3,4 DHP y 2,3 DHP. Como resultado, la cepa que degradaba los tóxicos mencionados correspondía a un *Clostridium* (denominado cepa 162), dada su baja proporción de guanina y citosina. La cepa 162 degradó mimosina, 3,4 DHP, 2,3 DHP y dihidroxifenilalanina (DOPA), pero no 3-hidroxipiridina o catecol cuando se añadieron estos compuestos al medio RPF (agar base Bird-Parker plasma de conejo y fibrinógeno) La degradación más alta fue hacia la mimosina (50-60 %) respecto a 2,3 DHP o 3,4 DHP (35-45 %).

Más tarde, Allison *et al.* (1992) identificaron y caracterizaron una bacteria aislada del rumen de una cabra (en Hawái), capaz de degradar 3-4 DHP y su isómero 2-3 DHP, la cual fue nombrada *Synergistes jonesii*. Esta investigación se basó en la toxicidad que generaba el consumo de la leguminosa *L. leucocephala* en los rumiantes; sin embargo, en algunas partes del mundo se encontraron animales resistentes a la toxicidad de los componentes de esta planta, por su capacidad para degradar 3-4 DHP y su isómero 2-3 DHP.

S. jonesii se originó a partir de cuatro cepas (78-1, 100-6, 113-4, 147-1) aisladas de una cabra, en Hawái (Jones y Megarrity, citados por Halliday *et al.*, 2014); estas cepas se cultivaron en medios anaerobios similares a los descritos anteriormente para *Clostridium*, que fueron sometidos a kits de ensayo (API-ZIM, AN-IDENT, API-20A) para la identificación de bacterias Gram negativas anaerobias y de las enzimas que estas producen. Posteriormente, las bacterias identificadas se sometieron a una prueba de sensibilidad a antibióticos, basada en la inhibición del crecimiento de las cepas que ejerce la 3,4 DHP y visualizada por colorimetría. Este estudio permitió concluir que *S. jonesii* difería de cualquier organismo, después de haberla cotejado con aproximadamente 600 bacterias diversas, ya que la secuencia 16S de su ARN ribosomal es muy singular; además de usar como fuente principal de energía aminoácidos como la arginina y la histidina, factor que también lo separa de las otras bacterias con las cuales fue comparada.

Al realizar las comparaciones entre cepas de *S. jonesii*, los exámenes microscópicos indicaron que todas tenían morfología similar, y no se observaron diferencias entre las cepas 78-1, 100-6 y 113-4; mientras que solo la 78-1 se sometió a la gama completa de pruebas fisiológicas. Se consideraron las pruebas más definitivas y únicas para estas bacterias con las cuatro cepas y no se detectaron

diferencias fisiológicas entre estas últimas. Todas degradaron 2,3 y 3,4 DHP, y utilizaron arginina, histidina y DHP, además de otros sustratos energéticos para el crecimiento.

A partir de este trabajo, se describió que *S. jonesii* es una bacteria Gram-negativa, anaeróbica, no esporoforme, no motora; asimismo, tiene la capacidad de fermentar piridinedioles, su único hábitat conocido es el rumen y se aisló originalmente por su función de ayudar a las cabras de Hawái que pastaban *L. leucocephala* (Holland-Moritz *et al.*, 2014). El organismo no es omnipresente en las poblaciones de rumen, pero se han demostrado límites geográficos definidos para su distribución (Allison *et al.*, 1992).

Cuando esta bacteria se inoculó en el rumen de animales no adaptados al consumo de leucaena, los efectos tóxicos se redujeron (Palmer *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de la inoculación, los animales de diversas latitudes (por ejemplo, Australia, Indonesia y Etiopía) solo pueden tolerar hasta un 30 % de leucaena en la dieta (Dalzell *et al.*, 2012). En tales casos, se ha planteado la hipótesis de que las poblaciones de bacterias ruminales capaces de degradar la mimosina a DHP están saturadas por los altos niveles de ingestión de leucaena (mimosina).

Se conoce que la bacteria *S. jonesii* tiene la capacidad de degradar 3-4 y 2-3 DHP; sin embargo, no se ha confirmado su presencia o ausencia en los animales alimentados con leucaena en otros lugares en los que esta planta es nativa. Además, se desconoce si algunas bacterias tienen capacidad de degradar mimosina, ya que las mencionadas anteriormente solo tienen capacidad para degradar 3-4 y 2-3 DHP pero no mimosina (Jetana *et al.*, 2012). Dalzell *et al.* (2012) sugirieron que puede haber otras bacterias con capacidad degradante para mimosina y sus metabolitos.

La degradación de mimosina se atribuye a un tipo de mimosinasa, enzima que se encuentra en la hoja de leucaena; a pesar de que el mecanismo de activación no se conoce, se cree que en el momento de ser masticada la hoja esta enzima se activa, al ser hidrolizada la mimosina y producir 3-4 DHP (Pereira *et al.*, 2013). También se ha informado acerca de la actividad hidrolítica en el rumen de los animales alimentados con leucaena; por lo tanto, se presume que hay algunas bacterias que podrían degradar la mimosina (Kudo *et al.*, 1984). Unido a lo anterior, se cree que la intoxicación por mimosina es escasa, ya que los animales son capaces de regular el consumo de *L. leucocephala*, con lo que

evitan la posibilidad de intoxicación (Bacab *et al.*, 2013).

Las aseveraciones de Kudo *et al.* (1984) y Dalzell *et al.* (2012) sobre la idea de encontrar más bacterias responsables de la degradación de los tóxicos más conocidos de *L. leucocephala* se concretaron recientemente. En este sentido, en el año 2015 un estudio reveló cuatro aislados bacterianos (*Streptococcus lutetiensis*, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus vitulinus* y *Butyrivibrio fibrisolvens*) que podían degradar completamente la mimosina dentro de los siete días de incubación. También se observó que *C. butyricum* y *L. vitulinus* fueron capaces de degradar parcialmente el 2,3-DHP dentro de los 12 días de incubación, mientras que *S. lutetiensis* fue capaz de degradar completamente tanto el 3,4 como el 2,3 DHP (Derakhshani *et al.*, 2016).

Conclusiones

La mimosina que se encuentra en la rizosfera de *L. leucocephala* es beneficiosa al ser captada por ciertas cepas de *Rizhobium*, lo que favorece la degradación de la mimosina y la nodulación nitrificante. Por lo tanto, un aislamiento selectivo de estas cepas podría contribuir a la elaboración de inóculos específicos para cultivos intensivos de *L. leucocephala*.

La actividad de degradación de DHP por parte de las bacterias mencionadas en esta revisión confirma la importancia de los procesos catabólicos que tienen lugar en el rumen, para la tolerancia de los rumiantes a los metabolitos secundarios de las plantas.

Se necesita un rastreo exhaustivo del contenido ruminal del ganado en pastoreo de *L. leucocephala*, en aras de identificar otras bacterias transformadoras de mimosina y contribuir al desarrollo de inóculos más efectivos que puedan ser utilizados por los ganaderos contra la toxicidad de la mimosina.

Referencias bibliográficas

- Abrahamovich, Eliana; López, Ana C. & Alippi, Adriana M. Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos. *Rev. Argent. Microbiol.* 46 (3):237-241, 2014.
- Albert-Rodríguez, Anayansi & Rodríguez-Ledesma, Y. Estudio de los factores antinutricionales de las especies *Morus alba* Lin (morera), *Trichanthera gigantea* (H & B), nacedero y *Erythrina poeppigiana* (Walp. O. F), piñón para la alimentación animal. *Tlatemoani*. 17. <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/17/pinon.html>. [07/12/2016], 2014.
- Allison, M. J.; Mayberry, W. R.; Mcsweeney, C. S. & Stahl, D. A. *Synergistes jonesii*, gen. nov.; sp.nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. *Syst. Appl. Microbiol.* 15 (4):522-529, 1992.
- Bacab, H. M.; Madera, N. B.; Solorio, F. J.; Vera, F. & Marrufo, D. F. Los sistemas silvopastoriles intensivos con *Leucaena leucocephala*: una opción para la ganadería tropical. *AIA*. 17 (3):67-81, 2013.
- Barros-Rodríguez, M.; Solorio-Sánchez, J.; Ku-Vera, J.; Ayala-Burgos, A.; Sandoval-Castro, C. & Solís-Pérez, G. Productive performance and urinary excretion of mimosine metabolites by hair sheep grazing in a silvopastoral system with high densities of *Leucaena leucocephala*. *Trop. Anim. Health Prod.* 44 (8):1873-1878, 2012.
- Belmar-Casso, R. F. & Nava-Montero, R. N. *Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogásticos*. México: FMVZ-UADY; CRUPY-UACH. http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/roberto.htm. [07/12/2016], 2000.
- Borthakur, D.; Soedarjo, M.; Fox, P. M. & Webb, D. T. The mid genes of *Rhizobium* sp. strain TAL1145 are required for degradation of mimosine into 3-hydroxy-4-pyridone and are inducible by mimosine. *Microbiology*. 149 (2):537-546, 2003.
- Dalzell, S. A.; Burnett, D. J.; Dowsett, J. E.; Forbes, V. E. & Shelton, H. M. Prevalence of mimosine and DHP toxicity in cattle grazing *Leucaena leucocephala* pastures in Queensland, Australia. *Anim. Prod. Sci.* 52 (5):365-372, 2012.
- Derakhshani, H.; Corley, S. W. & Al Jassim, R. Isolation and characterization of mimosine, 3, 4 DHP and 2, 3 DHP degrading bacteria from a commercial rumen inoculum. *J. Basic Microbiol.* 56 (5):580-585, 2016.
- Dominguez-Bello, M. Gloria & Stewart, C. S. Characteristics of a rumen *Clostridium* capable of degrading mimosine, 3(OH)-4-(1H)-Pyridone and 2, 3 Dihydroxypyridine. *Syst. Appl. Microbiol.* 14 (1):67-71, 1991.
- Halliday, M. J.; Giles, Hayley E.; Dalzell, S. A.; McSweeney, C. S. & Shelton, H. M. The efficacy of *in vitro Synergistes jonesii* inoculum in preventing DHP toxicity in steers fed leucaena-grass diets. *Trop. grassl.-Forrajes trop.* 2 (1):68-70, 2014.
- Halliday, M. J.; Padmanabha, J.; McSweeney, C. S.; Kerven, G. & Shelton, H. M. Leucaena toxicity: a new perspective on the most widely used forage tree legume. *Trop. grassl.-Forrajes trop.* 1 (1):1-11, 2013.
- Hammond, A. C. Leucaena toxicosis and its control in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73 (5):1487-1492, 1995.
- Higashide, Wendy. *The isolation and characterization of a galactosyl transferase mutant of Rhizobium sp. strain Tal1145 that nodulates Leucaena leucocephala*. Honolulu, USA: University of

- Hawaii at Manoa. <http://hdl.handle.net/10125/32028>. [07/12/2016], 2014.
- Holland-Moritz, Hannah E.; Coil, D. A.; Badger, J. A.; Dmitrov, G. I.; Khouri, Hoda; Ward, Naomi L. *et al.* Draft genome sequence of the pyridinediol-fermenting bacterium *Synergistes jonesii* 78-1. *Genome Announc.* 2 (4):e00833-00814, 2014.
- Ilham, Z.; Hamidon, H.; Rosji, N. A.; RamLi, N. & Osman, N. Extraction and quantification of toxic compound mimosine from *Leucaena leucocephala* leaves. *Procedia Chem.* 16:164-170, 2015.
- Jetana, T.; Thongruay, S.; Uswang, S. & Hengtrakulsin, R. A comparative study on mimosine, 3,4-dihydroxy pyridone (3,4-DHP) and 2,3-dihydroxy pyridone (2,3-DHP), purine derivatives (PD) excretion in the urine, thyroid hormone and blood metabolites profiles of Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Health Prod.* 44 (4):887-897, 2012.
- Kudo, H.; Cheng, K.-J.; Majak, W.; Hall, J. W. & Costerton, J. W. Degradation of mimosine in rumen fluid from cattle and sheep in Canada. *Can. J. Anim. Sci.* 64:937-942, 1984.
- Lalitha, K.; Vargheese, C. M. & Balasubramanian, N. Spectrophotometric determination of mimosine and 3-hydroxy-4-(1H)-pyridone- the toxic principles of *Leucaena leucocephala*. *Analyt. Biochem.* 213 (1):57-62, 1993.
- Martínez, Rosario; Nebot, Elena; Porres, J. M.; Kapravelou, Garyfallia; Moral, Ana del; Talbi, Chouhra *et al.* *Medicago sativa* L: mejora y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional por coinoculación bacteriana. *Nutr. Hosp.* 32 (6):2741-2748, 2015.
- Marutani, M.; Richardson, J.; Edirveerasingam, V.; Taitano, D. & Borthakur, D. Indigenous *Rhizobium* strains from Guam contain a mimosine degrading gene. *Micronesica.* 31 (2):379-385, 1999.
- Nguyen, B. C. Q. & Tawata, S. The chemistry and biological activities of mimosine: a review. *Phytother. Res.* 30 (8):1230-1242, 2016.
- Palmer, B.; Jones, R. J.; Poathong, S. & Chobtang, J. The value of *Leucaena leucocephala* bark in leucaena-grass hay diets for Thai goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 42 (8):1731-1735, 2010.
- Pereira-Junior, G.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Barbosa, Paula de S. & Shimoda, E. Farinha de folha de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam. de Wit) como fonte de proteína para juvenis de tambaqui (*Collossoma macropomum* CUVIER, 1818). *Acta Amaz.* 43 (2):227-234, 2013.
- Pereyra, Gabriela; Hartmann, H.; Michalzik, Beate; Ziegler, W. & Trumbore, Susan. Influence of Rhizobia inoculation on biomass gain and tissue nitrogen content of *Leucaena leucocephala* seedlings under drought. *Forests.* 6 (10):3686-3703, 2015.
- Rangel, W. M.; Thijs, S.; Janssen, J.; Oliveira-Longatti, S. M.; Bonaldi, D. S.; Ribeiro, P. R. *et al.* Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation.* 19 (2):142-156, 2017.
- Siddiqi, M. A. & Athar, M. Rhizobial competition and enhancing rhizobial colonization in the legume rhizosphere using a systemic fungicide. *FUUAST J. Biol.* 3 (2):45-52, 2013.
- Soedarjo, M. & Borthakur, D. Mimosine, a toxin produced by the tree-legume *Leucaena* provides a nodulation competition advantage to mimosine-degrading *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.* 30 (12):1605-1613, 1998.
- Soedarjo, M.; Hemscheidt, T. K. & Borthakur, D. Mimosine, a toxin present in leguminous trees (*Leucaena* spp.), induces a mimosine-degrading enzyme activity in some *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microb.* 60 (12):4268-4272, 1994.
- Soltan, Y. A.; Morsy, A. S.; Sallam, S. M.; Lucas, R. C.; Louvandini, H.; Kreuzer, M. *et al.* Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. *Arch. Anim. Nutr.* 67 (3):169-184, 2013.
- Villanueva, C.; Ibrahim, M.; Lombo, F. & Pérez, N. Potencial de las leñosas forrajeras en poteros para la alimentación del ganado en la época seca. En: D. Sánchez, C. Villanueva, G. M. Rusch, M. Ibrahim and F. DeClerck, eds. *Estado del recurso arbóreo en fincas ganaderas y su contribución en la sostenibilidad de la producción en Rivas, Nicaragua*. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Boletín técnico No. 60. p. 42-48, 2013.
- Xu, K. W.; Penttinen, P.; Chen, Y. X.; Chen, Q. & Zhang, X. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2):783-793, 2013.
- Xuan, T. D.; Tawata, S. & Khanh, T. D. Herbicidal activity of mimosine and its derivatives. In: A. J. Price and J. A. Kelton, eds. *Herbicides-advances in research*. Rijeka, Croatia: Intech. p. 299-312, 2013.
- Zayed, M. Z.; Ahmad, F. B.; Zaki, M. A.; Hoand, W.-S. & Pang, S.-L. The reduction of mimosine content in *Leucaena leucocephala* (petai belalang) leaves using ethyl methanesulphonate (EMS). *Arch. Appl. Sci. Res.* 6 (4):124-128, 2014.