

Artículo científico

Ecosistema con *Leucaena leucocephala*: su efecto en la población microbiana ruminal en toros en ceba

Ecosystem with *Leucaena leucocephala*: its effect on the rumen microbial population in fattening bulls

Juana L. Galindo-Blanco, Idalmis Rodríguez-García, Niurca González-Ybarra, Roberto García-López y Magaly Herrera-Villafranca

Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central km 47 ½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba CP 32700

Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

Resumen

Se realizó un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de *Leucaena leucocephala* cv. Perú en la población microbiana ruminal de toros mestizos de Cebú, en las dos etapas del ciclo de ceba. El sistema, integrado por cinco franjas de gramíneas asociadas con *L. leucocephala* y cinco sin asociar, alternadas consecutivamente en 25 ha, permitió la ceba de 80 animales, de los que se utilizaron ocho para los estudios microbiológicos. Los muestreos de líquido ruminal se realizaron con frecuencia bimensual (febrero-marzo, abril-mayo, junio-julio) y cuatrimestral (agosto-noviembre). Las bacterias celulolíticas alcanzaron valores entre 15,94 y 46,13 10^6 UFC.mL⁻¹ cuando los toros pastaron *L. leucocephala* asociada a gramíneas. La mayor población de hongos celulolíticos ruminales se encontró en el rumen de animales en el sistema con leucaena, en los muestreos de agosto-noviembre. La concentración de amoníaco ruminal tuvo valores de 8,76 y 24,09 mmol.L⁻¹ en el sistema con gramíneas y el de leucaena asociada con gramíneas, respectivamente ($p < 0,001$). El pH en rumen fue significativamente mayor, la población de bacterias viables totales resultó 2,9 veces superior y los protozoos disminuyeron cuando leucaena participó en la ración. Se concluye que es ventajoso el sistema con *L. leucocephala* asociada a gramíneas, debido a que propicia incrementos en las poblaciones de bacterias viables totales y microorganismos degradadores de la fibra; ello, unido al efecto depresor de los protozoarios, garantiza un ambiente ecológico favorable a la celulólisis ruminal, lo cual contribuiría de manera sostenida al incremento productivo del sistema ganadero.

Palabras clave: bacteria, metabolitos, protozoa.

Abstract

A trial was conducted in order to evaluate the effect of *Leucaena leucocephala* cv. Peru on the rumen microbial population of Zebu crossbred bulls, in the two stages of the fattening cycle. The system, integrated by five strips of grasses associated with *L. leucocephala* and five without association, consecutively alternated in 25 ha, allowed the fattening of 80 animals, from which eight were used for the microbiological studies. The samplings of rumen liquid were made bimonthly (February-March, April-May, June-July) and four-monthly (August-November). The cellulolytic bacteria reached values between 15,94 and 46,13 10^6 CFU.mL⁻¹ when the bulls grazed *L. leucocephala* associated with grasses. The highest population of rumen cellulolytic fungi was found in the rumen of animals in the system with *L. leucocephala*, in the August-November samplings. The concentration of rumen ammonia had values of 8,76 and 24,09 mmol.L⁻¹ in the system with grasses and the one of *L. leucocephala* associated with grasses, respectively ($p < 0,001$). The pH in rumen was significantly higher, the population of total viable bacteria was 2,9 times higher and the protozoans decreased when *L. leucocephala* participated in the ration. It is concluded that the system with *L. leucocephala* associated with grasses is advantageous, because it propitiates increases in the populations of total viable bacteria and fiber-degrading microorganisms; this, along with the depressing effect of protozoans, guarantees a favorable ecological environment for rumen cellulolysis, which would contribute in a sustained way to the productive increase of the animal husbandry system.

Keywords: bacterium, metabolites, protozoans

Introducción

L. leucocephala es una de las leguminosas más utilizadas en Cuba (Ruiz, 2005), y entre las cualidades que la distinguen se encuentra su alto contenido proteico (Ku-Vera, 2013). En trabajos realizados por Galindo *et al.* (2007) se demostró que la leucaena

se puede incluir en el 100 % del área de un pastizal de gramíneas, lo que incrementa la celulólisis ruminal como consecuencia de una mayor población de organismos fibrolíticos. Igualmente, Galindo (2013) reportó que la leucaena reduce la producción

de metano, debido principalmente a la presencia de metabolitos secundarios. Prieto-Manrique (2017), al utilizar 14-16 % de *L. leucocephala* en vacas en pastoreo, consideró que estas cantidades eran insuficientes para reducir la producción de metano a nivel de rumen.

Iraola *et al.* (2016), al implementar una estrategia agroecológica de transformación en un sistema de pastizales degradados con un arreglo silvopastoril con *L. leucocephala* para la ceba vacuna, encontraron incrementos en la biomasa vegetal de 60 % y una ganancia media diaria (GMD) entre 0,648 y 0,769 kg/animal/día, con lo cual lograron sistemas económicamente viables en pesos cubanos.

En trabajos precedentes desarrollados por Iraola *et al.* (2014) en un sistema silvopastoril con *L. leucocephala*, no se estudió el efecto del manejo ni de la época del año en los indicadores relacionados con la ecología microbiana ruminal. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de *Leucaena leucocephala* vc. Perú en la población microbiana ruminal de toros mestizos de Cebú, en las dos etapas del ciclo de ceba

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en el Cebadero Aya-la del Instituto de Ciencia Animal –Mayabeque, Cuba–, en un agroecosistema de pastizales integrados por una mezcla de pastos naturales y mejorados con *L. leucocephala* vc. Perú, en una superficie física de 25 ha sobre un suelo Pardo con carbonatos.

El diseño del sistema se correspondió con la estrategia de rediseño ecológico para la recuperación de pasturas degradadas en un sistema agrosilvopastoril, de acuerdo con lo planteado por Iraola *et al.* (2014), y tuvo como propósito mejorar la capacidad de carga biológica con ganado de engorde. El sistema se estructuró según la metodología propuesta por Ruiz (2005), con densidades de *L. leucocephala* entre 5 000 y 5 700 árboles por hectárea. Una vez que la leucaena alcanzó entre 1,00 m y 1,20 m de altura, comenzó su utilización.

En el experimento se utilizaron 80 toros mestizos de Cebú, de 199 ± 3 kg de peso vivo (PV) promedio. De ellos, se seleccionaron al azar ocho

animales para efectuar los estudios de fermentación ruminal. Todos los animales pastaban en un solo grupo y transitaban de manera sucesiva por las cinco franjas de gramíneas asociadas con leucaena y las cinco franjas de gramíneas sin asociar.

Los muestreos del líquido ruminal se realizaron con frecuencia bimensual (febrero-marzo, abril-mayo, junio-julio), y cuatrimestral (agosto-noviembre) para la finalización de la ceba, por la vía esofágica y con la ayuda de una sonda, la que se introdujo a través de la boca hasta el rumen. Los animales ingresaron al sistema 15 días antes del primer muestreo, es decir en la segunda quincena de enero, con el objetivo de garantizar el adecuado período de adaptación.

Análisis microbiológicos y fermentativos. Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (1950), en tubos *roll* y condiciones de anaerobiosis estricta. La siembra de bacterias viables totales, proteolíticas y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966); los hongos se analizaron mediante la técnica de Joblin (1981); y los protozoos se contaron al microscopio, en cámara de Neubauer.

El pH se determinó en un pH-metro EIL modelo 22-A, y la concentración de amoníaco, según Conway (1957). El análisis de la composición química de los pastos se realizó según las técnicas descritas por AOAC (1995); mientras que las fracciones fibrosas se analizaron por el procedimiento de Goering y Van Soest (1970). La composición química de las especies se muestra en la tabla 1.

Los metabolitos secundarios ante las pruebas cualitativas del tamizaje fitoquímico de *L. leucocephala* indicaron alta presencia (+++) de taninos, alcaloides y antocianidinas; y moderadas cantidades (++) de saponinas, reductores, flavonoides, triterpenos y esteroides.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se realizó análisis de varianza multifactorial. Los factores considerados fueron: 1) franjas o pastoreo en gramínea asociada con leucaena y en mezcla de gramíneas, y 2) bimestre de muestreo (febrero-marzo, abril-mayo, junio-julio) y cuatrimestre (agosto-noviembre).

En el caso de los indicadores bacterias proteolíticas, celulolíticas y hongos celulolíticos se

Tabla 1. Composición química de las especies que integraron el ecosistema pastizal (%).

Especie	PB	FND	FAD	Ceniza	Ca	P
<i>L. leucocephala</i>	29,47	39,96	19,26	8,91	1,18	0,08
Mezcla de pastos naturales y mejorados	11,90	91,06	39,95	12,87	0,54	0,00

empleó un diseño de parcelas divididas, donde la parcela principal fue la franja (leucaena o mezcla de gramíneas), y la subparcela, los bimestres de muestreo. En el caso de los indicadores bacterias viables totales, protozoos, pH y NH_3 se utilizó un modelo lineal para los efectos de las franjas y los bimestres de muestreo.

Se verificó que los datos cumplieran con los supuestos de distribución normal y de homogeneidad de varianza. Los conteos de microorganismos viables se transformaron según $\text{Ln } N$, para garantizar las condiciones de normalidad. Para el análisis se aplicó la fórmula $(K+N) \cdot 10^x$, donde: K es la constante que representa el logaritmo de la dilución en la cual se inoculó el microorganismo; N es el logaritmo del conteo de colonias determinado como UFC/mL, UFT/mL, o células/mL; 10 es la base del logaritmo; y x es la dilución a la cual se efectuó la inoculación.

Para la comparación entre medias se aplicó la dócima de Duncan ($p < 0,05$) en los casos necesarios. Se utilizó el paquete estadístico INFOSTAT versión 2001, de Balzarini *et al.* (2001).

Resultados y Discusión

L. leucocephala adquiere singular importancia en los sistemas agroforestales porque, además de su buen desarrollo en ambientes tropicales, presenta al-

tos contenidos de proteína, minerales, vitaminas y energía, lo cual garantiza un adecuado valor nutricional cuando se utiliza en la dieta de los animales.

En este estudio se encontró interacción significativa entre el sistema de pastoreo y el momento de muestreo en las poblaciones de bacterias proteolíticas, celulolíticas y hongos del rumen (tabla 2). Las bacterias proteolíticas fueron más numerosas cuando los animales pastaron la leucaena. Tales resultados confirman la presencia de factores que estimulan el crecimiento de estos grupos microbianos cuando *L. leucocephala* se encuentra presente, debido a su alto contenido en proteína y minerales (Rodríguez *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando los animales pastaron las gramíneas durante el bimestre febrero-marzo y el cuatrimestre agosto-noviembre no hubo diferencias estadísticas en este indicador, aspecto que deberá ser objeto de estudio en etapas posteriores.

L. leucocephala produjo un efecto beneficioso en las poblaciones de bacterias y hongos celulolíticos del rumen. En todos los muestreos se encontró mayor población de bacterias celulolíticas cuando los animales pastaban en el sistema con esta planta, con los valores más altos ($p < 0,001$) en los muestreos comprendidos entre abril y noviembre, y dentro de ellos el cuatrimestre agosto-noviembre mostró las mayores poblaciones. Estas altas pobla-

Tabla 2. Efecto del sistema silvopastoril y la época de muestreo en la población de bacterias viables totales, protozoos y bacterias proteolíticas.

Indicador	Sistema	Momento de muestreo				EE \pm
		Febrero-marzo	Abril-mayo	Junio-julio	Agosto-noviembre	
Bacterias proteolíticas, 10^6 UFC.mL ⁻¹	Leucaena/gramínea	2,86 ^b (20,46)	2,63 ^b (14,15)	2,64 ^b (14,27)	2,55 ^b (14,96)	0,146**
	Gramínea	2,77 ^b (17,4)	1,79 ^a (6,04)	1,76 ^a (6,27)	2,45 ^b (11,67)	
Bacterias celulolíticas, 10^6 UFC.mL ⁻¹	Leucaena/gramínea	2,63 ^{cd} (15,94)	3,17 ^c (24,33)	2,98 ^c (21,11)	3,64 ^f (46,13)	0,222***
	Gramínea	2,49 ^{bc} (13,29)	2,13 ^{ab} (8,61)	1,78 ^a (6,02)	1,91 ^a (6,88)	
Hongos celulolíticos, 10^5 UFT.mL ⁻¹	Leucaena/gramínea	2,23 ^c (13,25)	2,95 ^d (20,38)	2,81 ^d (18,23)	3,77 ^e (43,83)	0,344**
	Gramínea	2,38 ^b (11,27)	1,83 ^a (6,54)	1,79 ^a (6,13)	1,49 ^a (4,5)	

Datos transformados según $\text{Ln } X$, medias originales entre paréntesis.

a, b, c, d, e: medias con letras diferentes dentro de la misma fila difieren a $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. UFC.mL⁻¹: unidades formadoras de colonias por mililitro; UFT: unidades formadoras de colonias por talo.

ciones de organismos celulolíticos pueden conducir a alcanzar mayor celulolisis ruminal, debido a una mayor población de microorganismos capaces de excretar el complejo de enzimas celulasas; asimismo, proveer al rumen de metabolitos necesarios para la síntesis de proteína microbiana (Galindo *et al.*, 2017); y, consecuentemente, se debe esperar incrementos en la degradación de la fracción fibrosa, dada la interacción que se presenta a nivel ruminal entre los diferentes microorganismos en el proceso de degradación de la fibra (Gerber *et al.*, 2013).

Los animales experimentales estuvieron expuestos a mejores condiciones nutricionales en estos meses (cuatrimestre agosto-noviembre), ya que se ha reportado que *L. leucocephala* es tres veces más rica en proteína (22,3-30,0 %) que las gramíneas tropicales en igual época del año (Rivera *et al.*, 2015).

No se halló interacción significativa entre los tratamientos y el momento de muestreo en la población de bacterias viables totales, protozoos, pH y concentración de amoníaco en el rumen.

Al evaluar el efecto del sistema en el pH y el NH_3 (tabla 3), se halló que en los animales que pastaban leucaena/gramínea la concentración de amoníaco era mayor y, consecuentemente, también el pH del rumen. Este efecto es debido a la acción que ejercen las deaminasas microbianas excretadas por las bacterias proteolíticas sobre las proteínas contenidas en *L. leucocephala*.

Al respecto, Rodríguez *et al.* (2014) señalaron que la proteína contenida en este vegetal se degrada entre 56 y 59 % a nivel de rumen; pero, debido a que su contenido es alto, siempre existirán cantidades apreciables de amoníaco libre. Este efecto se puede atenuar con el uso de suplementación energética a animales que pastan en leucaena.

En trabajos realizados por Iraola *et al.* (2017) se informó que uno de los elementos que limitan la productividad animal en los sistemas silvopastoriles (SSP) con leucaena lo constituye el aporte de energía y su sincronización con las fuentes de nitrógeno

disponible para los microorganismos ruminales, lo que limita la síntesis de proteína microbiana y el desempeño productivo de los animales de engorde. Por otra parte, el consumo de leucaena tiende a incrementar el contenido de proteína bruta en rumen y puede provocar excesos en el balance del nitrógeno, situación que conlleva un costo energético adicional para su eliminación en forma de urea.

Al respecto, existen diferentes formas de manipular el SSP con leucaena y obtener ventajas productivas; dentro de estas se encuentran el uso de hidratos de carbono de fácil fermentación, como los que aporta la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), y la utilización de microorganismos beneficiosos biológicamente activados, producidos en el Instituto de Ciencia Animal de Cuba (Elías, 2014). Este producto está compuesto por lactobacilos, levaduras y ácidos orgánicos de cadena corta, y constituye un activador de la fermentación ruminal (García y García-Curbelo, 2015). Su empleo como aditivo microbiano en la finalización de bovinos en silvopastoreo con leucaena, complementado con caña de azúcar durante el periodo lluvioso, generó un efecto productivo contrastante en la ganancia media diaria (GMD).

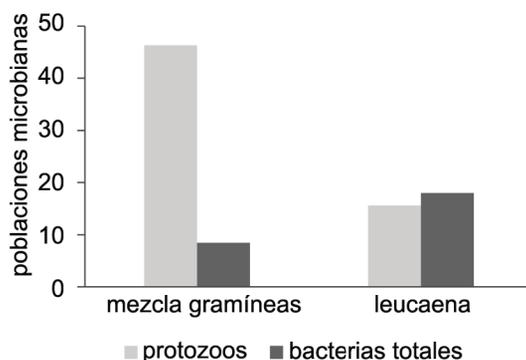
En la figura 1 se presenta el efecto del pastoreo en leucaena asociada a gramíneas o en la mezcla de gramíneas, sobre las poblaciones de bacterias viables totales y protozoos del rumen. Como se puede observar, cuando los animales pastaron la leucaena, las poblaciones de bacterias viables totales fueron mayores ($p < 0,001$); mientras que los protozoos redujeron su presencia.

La reducción en la población de protozoos cuando los animales pastaron sobre *L. leucocephala* corrobora las propiedades antiprotozoarias de esta planta (Galindo, 2013); y representa una ventaja que se atribuye a su alto contenido en taninos (4,02 % de la MS) y otros metabolitos secundarios, como las saponinas, que ejercen similar efecto a nivel ruminal.

Tabla 3. Efecto del pastoreo en el sistema silvopastoril leucaena/gramínea, sobre el pH y la concentración de amoníaco en el rumen de toros

Indicador	Leucaena/gramínea	Gramínea	EE \pm
pH	7,44	6,81	0,06***
NH_3 , mmol.L ⁻¹	24,09	8,76	0,46***

*** $p < 0,001$



EE bacterias totales = 0,145, $p < 0,001$; EE protozoos = 0,126, $p < 0,001$.

Protozoos = 105 células/mL; bacterias totales viables = 1 011 unidades formadoras de colonias por mililitro.

Figura 1. Efecto del pastoreo en gramíneas y *L. leucocephala* en mezcla de gramíneas, sobre la población de bacterias viables totales y protozoos del rumen de toros en ceba.

Con respecto al papel de las saponinas en la población de protozoos, Zhou *et al.* (2011) y Galindo *et al.* (2016) informaron que este metabolito puede ocasionar efecto depresivo en la población de los protozoarios, debido a que se producen cambios en la permeabilidad de la membrana celular, lo cual puede facilitar la lisis a nivel ruminal.

A modo de síntesis, la presencia de los factores antinutricionales o metabolitos secundarios anteriormente mencionados produce modificaciones en la población micobiana del rumen, y en ocasiones estos pudieran resultar tóxicos (McSweeney *et al.*, 1999).

Igualmente, es importante considerar que la defaunación es una de las vías probables para reducir la emisión entérica de CH_4 , debido al flujo de células micobianas desde el rumen y a la reducción en la relación acetato/propionato (Leng, 2014).

Los resultados explican las respuestas productivas informadas por Iraola *et al.* (2015a), entre 0,682 y 0,769 kg/animal/día, al estudiar el efecto de *L. leucocephala* en la ceba vacuna; así como un mayor confort animal dado por el desarrollo faunístico y ecológico que representa la presencia de los árboles y el incremento de la producción de biomasa en el sistema (Iraola *et al.*, 2015b). Este último aspecto se encuentra relacionado, de manera indirecta, con la población de microorganismos del rumen, al tiempo que contribuye en la toma de decisiones acertadas acerca del uso racional de recursos técnicos y económicos que garanticen mayor sostenibilidad y rentabilidad de los sistemas ganaderos para la producción de carne de res.

Se concluye que el sistema de manejo con *L. leucocephala* asociada a gramíneas es ventajoso, debido a que propicia incrementos en las poblaciones de bacterias viables totales y microorganismos degradadores de la fibra; lo que, unido al efecto depresor de los protozoarios, garantiza un ambiente ecológico favorable a la celulolisis ruminal. Asimismo, se recomienda estudiar, en etapas posteriores, el efecto del bimestre febrero-marzo y del cuatrimestre agosto-noviembre en las poblaciones de bacterias proteolíticas ruminales.

Referencias bibliográficas

- AOAC. *Manual of official methods of analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- Balzarini, Mónica G.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J. A.; González, Laura A. & Robledo, C. *Infostat software estadístico. Manual del usuario. Versión 1*. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, 2001.
- Caldwell, D. R. & Bryant, M. P. Medium without fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14 (5):794-801, 1966.
- Conway, E. J. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. London: Crosby Lockwood Sons, Ltd, 1957.
- Elías, A. Avances de los procesos biotecnológicos para incrementar el valor nutritivo de los alimentos. Impacto en la producción animal. *II Simposio de Zootecnia, Alimentación y Genética y XXIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterina-*

- rias (PANVET). La Habana: Asociación Consejo Científico Veterinario de Cuba. p. 35, 2014.
- Galindo, Juana. *Evaluación de plantas con capacidad antiprotozoaria en la ecología microbiana ruminal y producción de leche en vacas*. Informe final de proyecto No. 003 Programa Nacional de Biotecnología Agropecuaria CITMA/GEPROP. Mayabeque, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, 2013.
- Galindo, Juana; García, C.; Marrero, Yoandra; Castillo, E.; Aldana, Ana I.; Torres, Verena *et al.* Effect of the composition of grassland of *Leucaena leucocephala* with grasses on the microbial rumen population in bulls. *Cuban J. Agric. Sci.* 41 (2):137, 2007.
- Galindo, Juana; González, Niurca; Abdalla, A. L.; Alberto, Mariem; Lucas, R. C.; Dos Santos, K. C. *et al.* Effect of a raw saponins extract on ruminal microbial population and *in vitro* methane production with star grass (*Cynodon nlemfuensis*) substrate. *Cuban J. Agric. Sci.* 50 (1):77-88, 2016.
- Galindo, Juana; González, Niurca; Scull, Idania; Marrero, Yoandra; Moreira, Onidia & Ruiz, T. E. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and its effect on the rumen population and microbial ecology. In: Lourdes L. Savón, Odilia Gutiérrez and G. Febles, eds. *Mulberry, moringa and tithonia in animal feeds and others. Results in Latin American and its Caribbean*. Cuba: FAO, ICA, EDICA. p. 251-256, 2017.
- García, Yaneisy & García-Curbelo, Yanelys. Additives for animal feeding: The Institute of Animal Science on its 50 years. *Cuban J. Agric. Sci.* 49 (2):173-177, 2015.
- Gerber, P. J.; Henderson, B. & Makkar, H. P. S., Eds. *Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera. Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂*. Roma: FAO, 2013.
- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. *Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Agricultural Handbook No. 379. Washington, DC: US Agricultural Research Service, 1970.
- Hungate, R. G. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev.* 14 (1):1-49, 1950.
- Iraola, J.; Elías, A.; Gutiérrez, D.; García, Yenny; Fraga, L. M.; Vázquez, Arelis *et al.* Efecto de microorganismos beneficiosos activados en la finalización de toros en silvopastoreo con leucaena, complementados con caña de azúcar. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* 27 (6):403-410, 2017.
- Iraola, J.; García, Yoleisy; Muñoz, E.; Fraga, L. M.; Barros-Rodríguez, M.; Hernández, J. L. *et al.* Modeling of live weight per age in fattening bovines under a silvopastoral system with *Leucaena leucocephala*. *Cuban J. Agric. Sci.* 49 (3):307-315, 2015a.
- Iraola, J.; Muñoz, E.; García, Yenny & Hernández, J. L. Caracterización faunística en un sistema silvopastoral destinado al ganado de engorde. *Pastos y Forrajes.* 38 (4):418-424, 2015b.
- Iraola, J.; Muñoz, E.; García, Yenny; Hernández, J. L. & Moreira, E. Estrategia agroecológica de transformación en un sistema de pastizales degradados con un arreglo silvopastoral. *LRRD.* 28 (7). <http://www.lrrd.org/lrrd28/7/irao28120.html>. [11/04/2017], 2016.
- Iraola, J.; Muñoz, E.; García, Yenny; Hernández, J. L. & Moreira, E. Estrategia ecológica de rediseño para la recuperación de pasturas degradadas en un sistema agrosilvopastoral de engorde bovino. *Memorias de la III Convención Internacional Agrodesarrollo 2014*. Matanzas, Cuba: EEPF Indio Hatuey. p. 1040-1043, 2014.
- Joblin, K. N. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (6):1119-1122, 1981.
- Ku-Vera, J. C. Manipulación del metabolismo energético de los rumiantes en los trópicos: opciones para mejorar la producción y la calidad de la carne y leche. *IV Congreso Internacional Producción Animal Tropical*. La Habana, 2013.
- Leng, R. A. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Anim. Prod. Sci.* 54 (5):519-543, 2014.
- McSweeney, C. S.; Palmer, B.; Bunch, R. & Krause, D. O. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7):3075-3083, 1999.
- Prieto-Manrique, E. Efecto de la suplementación con aceites vegetales a vacas pastoreando con/sin sistema silvopastoral intensivo con leucaena sobre los ácidos grasos en la leche y la producción de metano *in vitro*. Sistemas silvopastoriles. Aportes a los objetivos de desarrollo sostenible. *IX Congreso Internacional de Sistemas Silvopastoriles*. Cali, Colombia: CIPAV, 2017.
- Rivera, J. E.; Molina, C. H.; Molina, J. J.; Molina, E. J.; Chará, J. & Barahona, R. Determinación de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) provenientes de la orina y el estiércol bovino en dos sistemas de pastoreo orientados a la producción de leche. *Actas del III Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles, VII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales*. Misiones, Argentina: Ediciones INTA. p. 565-569, 2015.

- Rodríguez, R.; de la Fuente, G.; Gómez, S. & Fondavila, M. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits *in vitro*. *Anim. Prod. Sci.* 54 (8):1039-1046 2013.
- Rodríguez, R.; González, Niurca; Alonso, J.; Domínguez, Marbelis & Sarduy, Lucía. Nutritional value of foliage meal from four species of tropical trees for feeding ruminants. *Cuban J. Agric. Sci.* 48 (4):371-378, 2014.
- Ruiz, T. E. Siembra, establecimiento y biomasa de *Leucaena leucocephala*. *II Taller Internacional Silvopastoril Cuba-Colombia*. Bogotá: CORPOICA, Instituto de Ciencia Animal. p. 115, 2005.
- Zhou, Y. Y.; Mao, H. L.; Jiang, F.; Wang, J. K.; Liu, J. X. & McSweeney, C. S. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:93-100, 2011.

Recibido el 12 de agosto del 2017

Aceptado el 29 de marzo del 2018