

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**“INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE QUEBRACHO
(*Schinopsis balansae*) Y *Yucca schidigera* EN LA DIETA SOBRE LA
ECOLOGÍA MICROBIANA RUMINAL, FERMENTACIÓN Y
PRODUCCIÓN DE CH₄ Y CO₂”**

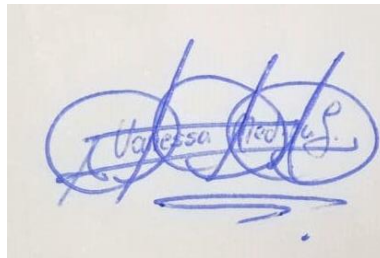
VANESSA JACQUELINE MEDINA JINES

Tutor: Ing. MARCOS A. BARROS RODRÍGUEZ, Ph.D

CEVALLOS – ECUADOR

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo, Vanessa Jacqueline Medina Jines, portadora de la cedula de identidad número: 1805504105, libre y voluntariamente enuncio que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: **“INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE QUEBRACHO (*Schinopsis balansae*) Y *Yucca schidigera* EN LA DIETA SOBRE LA ECOLOGÍA MICROBIANA RUMINAL, FERMENACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CH₄ Y CO₂”**, es genuino, original o único y personal. En dicha virtud, expreso que el contenido plasmado es de mi sola responsabilidad legal y académica, con excepción en la parte que se indican las fuentes de información examinadas.



Vanessa Jacqueline Medina Jines

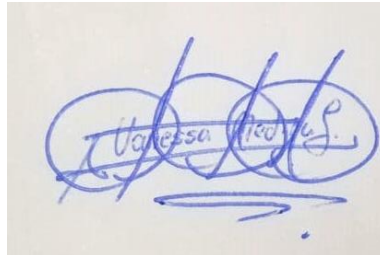
C.I. 1805504105

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar el Informe final del Proyecto de Investigación titulado: **“INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE QUEBRACHO (*Schinopsis balansae*) Y *Yucca schidigera* EN LA DIETA SOBRE LA ECOLOGÍA MICROBIANA RUMINAL, FERMENACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CH₄ Y CO₂”**, autorizo a la institución (Universidad Técnica de Ambato), para que este documento esté disponible para su lectura, consulta o procesos de investigación, según las normas de la Universidad.

Cedo mis derechos de forma patrimonial de mi proyecto, con fin de transmisión pública mediante las regulaciones de la Institución, siempre y cuando la reproducción no suponga ganancias económicas potenciales.



Vanessa Jacqueline Medina Jines

C.I. 1805504105

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE QUEBRACHO (*Schinopsis balansae*) Y *Yucca schidigera* EN LA DIETA SOBRE LA ECOLOGÍA MICROBIANA RUMINAL, FERMENACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CH₄ Y CO₂”

APROBADO POR:



Firmado electrónicamente por:
**MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS**

Ing. Marcos Pérez Salinas

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**EUCLIDES EFRAIN
LOZADA SALCEDO**

Dr. Efraín Lozada

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**JORGE RICARDO
GUERRERO LOPEZ**

Ing. Ricardo Guerrero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por una vida bendecida llena de salud y sabiduría, por su guía la cual me permitió llegar hasta este punto de mi vida. A mi familia, especialmente a mi mamá Miriam por ser mi ejemplo de perseverancia, fuerza y coraje en el cumplimiento de mis metas. A mi papá Nelson por sus buenos consejos y su apoyo incondicional, a mis hermanas Viviana y Johana por estar siempre presentes, siendo mi inspiración pese a todas las adversidades atravesadas durante esta etapa de mi vida brindándome su amor, a mi sobrina Ivanna que con su carisma e inocencia llena de alegría mis días.

Agradezco a todos los docentes de la Universidad Técnica de Ambato que fueron pilares fundamentales de mi aprendizaje, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión, de manera especial, al Ing. Mg. Marcos Barros PhD. tutor de mi proyecto de investigación.

Vanessa Jacqueline Medina Jines

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo se lo dedico principalmente a mis padres Miriam y Nelson por ser mi inspiración y apoyo en este proceso de obtención de uno de mis deseos más anhelados, por su amor y trabajo en todos estos años. A mi abuelito Cicerón Jines por ser mi segundo padre educándome siempre en valores de honestidad y respeto.

A la memoria de mi abuelita Rosa Miranda quien desde mi niñez me educó en el amor y respeto a los animales, a el ángel más bonito en el cielo mi hijo Elliot a quien le atribuyo mi fuerza y coraje para conseguir mis objetivos sin rendirme en los momentos más difíciles.

Vanessa Jacqueline Medina Jines

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes investigativos	3
1.1.1 Producción de Rumiantes en Ecuador	3
1.1.2 Gases de efecto invernadero.....	3
1.1.3 Compuestos bioactivos	4
1.1.4 Taninos.....	5
1.1.5 Saponinas.....	6
1.2 Objetivos.....	8
CAPITULO II.- METODOLOGÍA.....	9
2.1 Materiales.....	9
Equipos	9
Materiales de campo.....	9
2.2 Métodos	11
2.2.1 Animales, alimentación y tratamientos experimentales.....	11
2.2.2 Aditivos	12
2.2.3 Periodo de Adaptación	12
2.2.4 Consumo Voluntario y digestibilidad del alimento	12
2.2.5 Análisis químicos.....	13
2.2.6 Producción de gas metano y CO₂ <i>in vitro</i>	13
2.2.7 Diseño experimental y análisis estadístico	14
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1 Análisis y discusión de resultados	15
3.2 Verificación de hipótesis	18
CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	19
4.1Conclusiones.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20

ANEXOS	26
--------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 2. Digestibilidad (%) y población de protozoarios ruminales (\log_{10}) en ovinos inoculados con niveles de extracto de quebracho (taninos) y extracto de <i>Yucca schidigera</i> (saponinas).	15
Tabla 3. Parámetros de la producción de gas, metano y dióxido de carbono en ovinos inoculados con niveles de extracto de quebracho (taninos) y extracto de <i>Yucca schidigera</i> (saponinas).	17

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de la adición de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* en la dieta sobre la ecología microbiana y función ruminal en ovinos. Se utilizaron 5 ovinos de raza mestiza de aproximadamente 50 kg de peso. Esta investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias – UTA. Se evaluó la producción in vitro de gas metano (CH₄) y Dióxido de carbono (CO₂). Se elaboró una dieta base compuesta por 60% forraje de maíz y 40 % alfalfa. Los tratamientos evaluados fueron T1: dieta base + 19,7μl de extractos de Quebracho/animal día-1, T2: dieta base + 38,7μl de extractos de Quebracho/animal día-1, T3: dieta base + 5g de extractos de *Y. schidigera*/animal día-1, T4: dieta base + 9,8g de extractos de *Y. schidigera*/animal día-1, T5: dieta base sin aditivos. La digestibilidad de la Materia Seca y Materia Orgánica (DMS, DMO) fue mayor (P=0.0001) en el tratamiento con dosis baja de tanino (T1; 61.2%) y los tratamientos que contenían saponinas (T3; 60.6 y T4; 62.3 respectivamente). Con respecto a los microorganismos del rumen, la menor (P=0.0001) población de protozoarios tanto Holotricos como Entodiniomorfos se observó en el tratamiento T4 (0.82 y 0.10 respectivamente). Los parámetros de producción de gas, metano y dióxido de carbono muestran un efecto de reducción (P=0.0001) al tratamiento con mayor contenido de inoculación de saponinas (T4; 265.1 mLgas/0.5 g MS Fermentable), no obstante, el tratamiento que mostró mayor producción de los gases de efecto invernadero entérico fue el T5 (tratamiento control) con 158.4 mLgas/0.5g MS Fermentable superior al T4. Bajo las condiciones de este estudio, se puede concluir que existe un efecto con capacidad de mitigación de la producción de gases, así como, de mejorar la digestión de la fibra y de reducción de la población de protozoos a nivel ruminal cuando se le suministra dosis superiores 8 g de saponina/animal/día en ovinos que consumen dietas con base en forrajes.

Palabras clave: quebracho (*Schinopsis balansae*), *Yucca schidigera*, producción de gas, metano, Dióxido de carbono

SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the influence of the addition of Quebracho (*Schinopsis balansae*) and *Yucca schidigera* extract in the diet on microbial ecology and ruminal function in sheep. Five mixed breed sheep weighing approximately 50 kg were used. This research was carried out at the Faculty of Agricultural Sciences - UTA. The *in vitro* production of methane gas (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) was evaluated. A base diet composed of 60% corn forage and 40% alfalfa was prepared. The treatments evaluated were T1: base diet + 19.7µl of Quebracho extracts/animal day-1, T2: base diet + 38.7µl of Quebracho extracts/animal day-1, T3: base diet + 5g of extracts *Y. schidigera*/animal day-1, T4: base diet + 9.8g of extracts of *Y. schidigera*/animal day-1, T5: base diet without additives. The digestibility of Dry Matter and Organic Matter (DMS, DMO) was higher (P=0.0001) in the low dose tannin treatment (T1; 61.2%) and the treatments containing saponins (T3; 60.6 and T4; 62.3 respectively). Regarding the rumen microorganisms, the smallest (P=0.0001) population of protozoa, both holotrics and Entodiniomorphs, was observed in the T4 treatment (0.82 and 0.10 respectively). The gas, methane and carbon dioxide production parameters show a reduction effect (P=0.0001) to the treatment with a higher content of inoculation of saponins (T4; 265.1 mLgas/0.5 g DM Fermentable), however, the treatment that showed the highest production of enteric greenhouse gases was T5 (control treatment) with 158.4 mLgas/0.5g DM Fermentable higher than T4. Under the conditions of this study, it can be concluded that there is an effect with the mitigation capacity of gas production, as well as improving fiber digestion and reducing the protozoa population at the ruminal level when doses are administered. higher 8g of saponin/animal/day in sheep consuming forage-based diets.

Keywords: tannin, saponin, gas production, methane, Carbon dioxide

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Producción de Rumiantes en Ecuador

En Ecuador la producción de rumiantes está basada en monocultivos de gramíneas en dependencia de la condición climática de cada región, predominando en zonas cálidas y tropicales monocultivos de gramíneas y en zonas templadas mezclas forrajeras de gramíneas y leguminosas rastreras (**León et al. 2018**). Estas plantas poseen altas cantidades de fibra por lo que al ser incluidas en la dieta de rumiantes incrementan la producción de gases principalmente metano producto de la fermentación microbiana ruminal, que al ser liberado al medio ambiente producen el deterioro del mismo, además que la liberación de estos gases al medio ambiente supone un gasto energético en el animal el mismo que podría ser aprovechado para la producción (**Ugbogu et al. 2019**). Una alternativa viable para disminuir la emisión de gases de efecto invernadero y tener eficiencia en el gasto energético es la modificación de la dieta disminuyendo los carbohidratos estructurales, utilizando mayor fuente de carbohidratos no estructurales, juntamente con la implementación de aditivos como los taninos y las saponinas (**Benchaar et al. 2008**).

1.1.2 Gases de efecto invernadero

El aumento de las emisiones de GEI pueden traer consecuencias desastrosas al medio ambiente, el CH₄ es considerado el segundo GEI más producido después del CO₂ a partir de la fermentación entérica de los rumiantes, no obstante, en términos de capacidad contaminante el CH₄ se estima es 21 veces más fuerte que el CO₂,

haciéndose fundamental su disminución (**Moumen, Azizi, Chekroun y Baghour, 2016**).

Las dietas de mala calidad favorecen al crecimiento y la actividad de microorganismos en el rumen y predisponen a una mayor generación de GEI, como consecuencia se obtienen bajos rendimientos en los animales al desperdiciar gran parte de la energía disponible para la producción (2-12%) (**Núñez Torres, Barros Rodríguez, Sanchez y Guishca-Cunuhay, 2018**).

Una alternativa viable para disminuir la emisión de gases de efecto invernadero y tener eficiencia en el aprovechamiento energético es la modificación de la dieta disminuyendo la cantidad de carbohidratos estructurales, utilizando fuentes ricas de carbohidratos no estructurales, en conjunto con la implementación de aditivos como compuestos bioactivos (taninos y saponinas) (**Benchaar et al. 2008**).

1.1.3 Compuestos bioactivos

Definiéndose como compuestos bioactivos a una amplia variedad de sustancias químicas que no se involucran en los procesos bioquímicos de crecimiento y reproducción de las plantas, encontrándose variaciones en su contenido acorde la localización geográfica, época de cosecha, condiciones ambientales, procesamiento y almacenamiento (**Patra y Saxena, 2010**).

El aprovechamiento de recursos forrajeros no convencionales como el incorporar a la alimentación extractos de árboles, arbustos y semillas con potencial actividad metanogénica es bien aceptada debido principalmente a la presencia de metabolitos secundarios como taninos, aceites esenciales, saponinas y flavonoides (**Núñez-Torres y Rodríguez-Barros, 2019; Sandoval-Pelcastre, Ramírez-Mella, Rodríguez-Ávila y Candelaria-Martínez, 2020**).

1.1.4 Taninos

Los taninos son polifenoles de origen vegetal, se clasifican como condensados e hidrolizables, los primeros son polímeros de flavonoides unidos covalentemente mientras que los segundos son unidades polifenólicas esterificadas unidas a un núcleo carbohidrato (**Aguerre et al. 2020**). Los taninos poseen varias propiedades entre la que destaca la capacidad de precipitar proteínas al conformarse por grupos hidroxilo que le permiten formar enlaces cruzados con proteínas, minerales y otras macromoléculas, lo que conduce a la formación de complejos tanino-proteína a través de enlaces de hidrógeno, por lo cual los taninos aumentan el paso de la proteína microbiana al duodeno e incrementa la productividad y maximiza la utilización de la proteína (**Mlambo & Mapiye. 2015**). Estos complejos son estables y resistentes a la degradación en el rumen en un pH comprendido entre 5.0 - 7.0, mientras que se disocian en un pH menor en el abomaso (**Aguerre et al. 2020**).

1.1.4.1 Mecanismo de acción

Informes reportan que la suplementación con extracto de taninos posee diversos beneficios en los rumiantes al disminuir la degradación de proteínas en el rumen y la excreción de nitrógeno urinario, por otra parte, eleva la actividad enzimática antioxidante en el hígado y disminuye la población parasitaria gastrointestinal (**Aguerre et al. 2020**).

Los mecanismos por los cuales los taninos reducen la metanogénesis ruminal se relacionan con una disminución de la disponibilidad de hidrógeno (H_2), el cual a través de la fermentación de azúcares en ácidos grasos volátiles se convierten en CH_4 (**Junior et al. 2017**). Además, se evidencia que la adición de taninos en la dieta puede reducir el número de arqueas metanogénicas y consecuentemente la producción de gases de efecto invernadero (**Molino et al. 2018**). Del mismo modo, los taninos favorecen la proliferación de microorganismos celulíticos en el rumen (**Mlambo and Mapiye 2015**). **Ammar et al. (2009)** mencionan que al alimentar ovejas con heno de alfalfa e

incorporar taninos condensados a razón de 50 g de quebracho /kg de materia seca mejoró la digestibilidad *in vitro* y la actividad fermentadora en el rumen.

Por otra parte, **Aguerre et al. (2020)** sostienen que los taninos provenientes del quebracho pueden reducir la digestibilidad de nutrientes al inhibir las enzimas digestivas, el crecimiento y la actividad microbiana del rumen, efectos que se ven directamente influenciados en dependencia con la especie de rumiante, el tipo y dosis de tanino y el tiempo de adaptación a la dieta. Altos niveles de ingesta de taninos pueden producir toxicidad y en algunos casos incluso la muerte, estos efectos adversos no se reflejan en el potencial toxico de los taninos, si no en los subproductos resultantes de la degradación de los mismos, por tanto, el consumo frecuente de alimentos ricos en taninos supone una adaptación generando mecanismos de defensa como modificaciones en la microflora ruminal (**Makkar 2003**).

1.1.5 Saponinas

Denominados también compuestos bioactivos, estos se dividen en esteroides y triterpenoides, la actividad metanogénica de estos compuestos se da de manera indirecta al disminuir el número de protozoarios que habitan el rumen, mismos que producen alrededor del 9 – 37% del CH₄ total, la capacidad de supresión de protozoarios se da al desintegrar la membrana mediante la creación de complejos con esteroides en su periferia (**Vélez-Terranova et al., 2014**).

Las saponinas esteroideas poseen propiedades tenso activas o detergentes al contener compuestos solubles en agua y grasa, contiene un núcleo soluble en grasa con una o varias cadenas laterales de carbohidratos, los cuales son solubles en agua (**Chepete et al., 2012**). El interés en la adición de saponinas en la dieta de rumiantes se atribuye principalmente a su acción conocida sobre los protozoos del rumen (**Guyader et al. 2017**), siendo de esta manera un eficaz agente defaunante (**Santoso, 2012**). Este compuesto se encuentra en su mayoría en plantas angiospermas en las cuales cumple

la función de protegerlas contra bacterias y enfermedades causadas por hongos (Ugbogu et al. 2019). Las saponinas ejercen un efecto inhibitorio al crecimiento de protozoos afectando la integridad de la membrana celular ayudando a la mitigación de CH₄ en rumiantes (Guyader et al. 2017).

1.1.5.1 Mecanismo de acción

La acción de las saponinas radica en su afinidad con los esteroides de la membrana de los microorganismos principalmente el colesterol, como resultado de esto se obtiene una disminución de la proteólisis bacteriana, mayor aprovechamiento de N y disminución de la metanogénesis (McMurphy et al. 2014). En base a estos antecedentes Liu, C., Li, Z., Du, J. and Shan, (2007) determinaron que la adición de extracto de *Yucca schidigera* en la alimentación de rumiantes disminuyó la concentración de amoníaco en respuesta a la merma del número de protozoos ruminales. Del mismo modo, Chepete et al. (2012) sugieren que el extracto de *Yucca schidigera* redujo la generación de metano entérico.

La *Yucca schidigera* conocida también como “Daga española” es una planta originaria de los desiertos del sureste de Estados Unidos y el noreste de México, el extracto de *Yucca schidigera* contiene saponinas esteroides, las saponinas están presentes en una gran cantidad de plantas en las que destaca su capacidad para formar espumas similares al jabón por lo cual se le ha atribuido distintas acciones biológicas en los rumiantes (Xu, Rinker, McLeod and Harmon, 2010). Este extracto ha sido ampliamente utilizado en la industria ganadera y avícola para el control de la producción de amoníaco y el control de olor en las excretas, tanto en la adición directa en el pienso como en las instalaciones (Santacruz-Reyes and Chien, 2012). Santoso (2012) determinó que la adición de *Yucca schidigera* en la alimentación de ovejas redujo considerablemente la concentración de amoníaco en el rumen y la excreción de N en la orina, por otra parte, mejoró el suministro de N microbiano y su posterior síntesis.

1.2 Objetivos

Objetivo General

Evaluar la influencia de la adición de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* en la dieta sobre la ecología microbiana y función ruminal en ovinos.

Objetivos Específicos

Determinar la influencia de la adición del extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* en la dieta sobre la fermentación ruminal en ovinos *in vitro*.

Evaluar el efecto de la adición de una dieta a base extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* sobre la producción de gas metano entérico *in vitro*.

Analizar el efecto de la adición de una dieta a base de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* sobre la producción dióxido de carbono *in vitro*.

CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

Equipos

- Equipo PCR
- Espectrofotómetro
- Balanza Analítica (capacidad 1000g; 0,0001 gramos)
- Cromatógrafo de gases
- Digestor de fibra
- Transductor de gas o presión
- Baño maría
- Estufa
- Refrigeradora
- Estufa
- Desecador
- Tanque de CO₂

Materiales de campo

- 5 Ovinos
- Jaulas metabólicas
- Bebederos
- Comederos
- Jeringas de alimentación

- Frascos de digestión ambar de 100 ml
- Primer
- Kit de extracción de ADN
- Bandeja de recolección de muestras
- Licuadora
- Crisoles
- Vasos de precipitación
- Agitador
- Pinzas
- Vasos de precipitación
- Matraces aforados
- Imanes
- Guantes de látex
- Tubos Eppendorf
- Pipetas
- Fundas de papel y plásticas
- Panca de maíz
- Alfalfa
- Extracto de *Schinopsis balansae* (quebracho)
- Extracto de *Yucca schidigera*

Materiales de escritorio

- Cuaderno
- Lápiz
- Hojas
- Marcadores
- Cámara
- Computadora
- Impresora

2.2 Métodos

2.2.1 Animales, alimentación y tratamientos experimentales

El trabajo de investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el sector El Tambo, parroquia la Matriz, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Para el desarrollo de la investigación se utilizaron 5 ovinos de raza mestiza de aproximadamente 50 kg de peso, entre ellos 3 machos y 2 hembras no gestantes, los cuales fueron utilizados como donantes de líquido ruminal mediante el uso de sondas de alimentación nasogástricas. Los animales se sometieron a un sistema de estabulación en donde se alojaron en jaulas metabólicas hechas de madera, cada jaula posee un comedero y acceso al agua ad libitum. El alimento se suministró en dos horarios, por la mañana y por la tarde (08:00 y 16:00 respectivamente).

Se empleó una dieta base para los 5 tratamientos, misma que estaba compuesta por los siguientes sustratos; 60% forraje de maíz y 40% alfalfa, en la que se incorporó en forma de aditivo los extractos de Quebracho (*Schinopsis balansae*) que contiene altas concentraciones de tanino, y extracto de *Yucca schidigera* como fuente de saponina.

Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera:

T1: dieta base + 19,7 μ l de extractos de Quebracho/animal día-1

T2: dieta base + 38,7 μ l de extractos de Quebracho/animal día-1

T3: dieta base + 5g de extractos de *Y. schidigera*/animal día-1

T4: dieta base + 9,8g de extractos de *Y. schidigera*/animal día-1

T5: dieta base sin aditivos

2.2.2 Aditivos

Extracto de *Schinopsis balansae* (quebracho)

Se recogieron hojas de quebracho las cuales fueron secadas, después de este proceso se las dividió en cortes de 1 a 2 cm. Se utilizaron proporciones de 1gr de soluto (hojas) en 8 ml de solvente (metanol, etanol y agua destilada), siendo la mezcla sometida a una temperatura de 25°C por 48h, posteriormente se colocó en baño maría a una temperatura de 30°C por 1h. Finalmente se filtró en un recipiente para su almacenamiento a una temperatura de 4 °C.

2.2.3 Periodo de Adaptación

El periodo de adaptación comenzó con un acoplamiento inicial de 7 días a la dieta la cual consistía en 7 kg de alimento dividido en 60% panca de maíz y 40% alfalfa. Posteriormente se inició el periodo de adaptación a los aditivos el cual basado en las recomendaciones de investigaciones anteriores fue de 20 días.

2.2.4 Consumo Voluntario y digestibilidad del alimento

El consumo voluntario se realizó mediante el método directo el cual consiste en el alimento ofrecido – el alimento rechazado en 24 horas, se suministró 7kg de alimento/oveja/día. La digestibilidad del alimento se lo realizó mediante la recolección de heces en un periodo de 5 días cada 24h, luego de la recolección estas fueron pesadas para posteriormente tomar una muestra de cada tratamiento para realizar los análisis de digestibilidad aparente de los nutrientes.

2.2.5 Análisis químicos

La ceniza y el contenido de materia seca (MS) se determinaron según la metodología de la AOAC (1990). La fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) fueron determinadas mediante el método 12 y 13 respectivamente, ANKOM2000 analizador de fibra (ANKOM Technology, Macedon, NY, EEUU).

2.2.6 Producción de gas metano y CO₂ *in vitro*

La producción de gas se realizó mediante el método descrito por Theodorou et al. (1994). Para esto, se extrajo por separado el contenido ruminal (líquido y la fracción sólida) de los animales donadores los cuales fueron sometidos previamente a un periodo de adaptación a los aditivos. El contenido ruminal fue recolectado en la mañana antes de proporcionar el alimento, una vez recolectado se mantuvo a una temperatura de 39 °C en recipientes plásticos hasta su transporte al laboratorio, para ser procesado dentro de la primera hora de recolección.

El medio rico en nitrógeno (saliva artificial) fue preparado con un día de anticipación según lo descrito por Menke & Steingass. (1988), el método consistió en la elaboración de una solución buffer compuesta de Bicarbonato de sodio más Bicarbonato de amonio, también una solución de macro minerales a base de Fosfato de sodio dibásico, Fosfato de potasio monobásico y Sulfato de magnesio. Además, se elaboró una solución reductora formada con cisteína y se agregó resazurina como indicador. La saliva artificial se sometió a un flujo continuo de Dióxido de carbono durante una hora y media, sumergido en baño maría a 39.5 °C.

Se colocaron 0.500 mg de MS de los tratamientos en botellas de vidrio ambar con una capacidad de 100 ml, se colocó 60 ml de inóculo para ser incubado en proporciones 70:30 (saliva artificial/inóculo; contenido ruminal) bajo flujo constante de CO₂, posteriormente se incubó a una temperatura de 39-40 °C en una estufa. La medición

de la presión de gas y el volumen fueron medidos manualmente en los siguientes tiempos 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas posterior a la incubación con un transductor de presión y jeringas plásticas. Se utilizaron 5 botellas como repetición de cada tratamiento y 5 botellas adicionales como blancos.

2.2.7 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el desarrollo de esta investigación se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial. En el cual se obtuvo 5 tratamientos con 6 repeticiones. Se realizó un análisis de variación (ADEVA) para verificar la significación o no de los promedios. Además, se utilizó la prueba de TUKEY al 5% para la comparación de los mismo. Los tratamientos con sus respectivas repeticiones fueron realizados *in vitro*.

CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

Digestión y microorganismos ruminales

En la Tabla 2 se puede apreciar que la digestibilidad de la Materia Seca y Materia Orgánica (DMS, DMO) fue mayor ($P=0.0001$) en el tratamiento con dosis baja de tanino (T1; 61.2%) y los tratamientos que contenían saponinas (T3; 60.6 y T4; 62.3 respectivamente). Con respecto a los microorganismos del rumen, la menor ($P=0.0001$) población de protozoarios tanto Holotricos como Entodiniomorfos se observó en el tratamiento T4 (0.82 y 0.10 respectivamente).

Tabla 2. Digestibilidad (%) y población de protozoarios ruminales (\log_{10}) en ovinos inoculados con niveles de extracto de quebracho (taninos) y extracto de *Yucca schidigera* (saponinas).

Tratamientos	DMS	DMO	Protozoos	
			H	E
T1	61.2a	64.5a	1.31b	2.68b
T2	52.7b	60.0b	1.01c	1.12c
T3	60.6a	63.4a	1.09c	1.10c
T4	62.3a	64.7a	0.82d	0.10d
T5	54.5b	59.1b	3.18a	3.72a
ESM	8.21	6.01	0.401	0.411
Valor P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

^{a,b,c} Medias con letras diferentes dentro de una misma columna difieren significativamente ($p<0.05$). ESM: error estándar de la media. T1: dieta base + 19,7 μl / de extracto de quebracho/animal día⁻¹, T2: dieta base + 38,7 μl / de extracto de quebracho/animal día⁻¹, T3: dieta base + 5 g/extracto de *Yucca schidigera*/animal día⁻¹, T4: dieta base + 9.8 g/extracto de *Yucca schidigera*/animal día⁻¹, T5: dieta base (sin extractos). H; Holotricos, E; Entodiniomorfos

La menor digestibilidad de la MS y MO observada en T2 se debe quizá a la alteración de los microorganismos ruminales como respuesta a la presencia elevada de taninos condensados y su capacidad para formar complejos con las proteínas y carbohidratos e impedir la actividad microbiana y consecuentemente mermar la digestibilidad de los nutrientes de la ración (**Patra y Saxena, 2011; Norris et al., 2020**).

Resultados similares fueron reportados por **Piñeiro-Vázquez et al. (2017)** quienes evidenciaron una reducción lineal sobre la digestibilidad de la MS y MO (19,1% y 18,4% respectivamente) conforme la cantidad de taninos condensados se incrementaban en la ración (4% kg MS). **Ahnert et al. (2015)** indican similitud en sus resultados debido a que la inclusión de extracto de tanino de quebracho $\geq 4\%$ redujo la digestibilidad de la MS, MO, FDA y FDN. Por otra parte, la mayor digestibilidad de la MS y MO observada en T1, T3 y T4 se relacionan a la baja cantidad de compuestos bioactivos presentes en la ración y la no manifestación de efectos potencialmente negativos sobre la capacidad de fermentación ruminal (**Patra et al. 2017**). Resultados que concuerdan con los expuestos por **Holtshausen et al. (2009)** quienes evidenciaron una marcada disminución de la digestibilidad de la MS y MO con niveles medios y altos de saponinas y **Piñeiro-Vázquez et al. (2017)** con taninos.

La menor población de protozoos en T4 se debe posiblemente al efecto de las saponinas sobre determinados microorganismos que habitan el rumen principalmente protozoos, puesto que desintegran su membrana al crear complejos de esteroides en su superficie y posteriormente provocar su progresiva **desintegración (Wallace et al. 2002)**. Estos resultados concuerdan con los reportados por **Zhou et al., (2011)** quienes evaluaron saponinas de Té y evidenciaron la reducción de la población de protozoos. Del mismo modo **Wallace et al., (1994)** probaron extracto de *Y. schidigera* y observaron inhibición en movimiento de los protozoos.

Parámetros de producción de gas, metano y dióxido de carbono entérico

Los parámetros de producción de gas, metano y dióxido de carbono muestran un efecto de reducción ($P=0.0001$) al tratamiento con mayor contenido de inoculación de saponinas (T4; 265.1 mLgas/0.5 g MS Fermentable), no obstante, el tratamiento que mostró mayor producción de los gases de efecto invernadero entérico fue el T5 (tratamiento control) con 158.4 mLgas/0.5g MS Fermentable superior al T4 (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de la producción de gas, metano y dióxido de carbono en ovinos inoculados con niveles de extracto de quebracho (taninos) y extracto de *Yucca schidigera* (saponinas).

Trat	Gas		CH ₄		CO ₂	
	B	C	B	C	B	C
T1	334.0b	0.021b	93.1b	0.010b	132.3b	0.011a
T2	300.5c	0.020b	86.4c	0.013b	123.6c	0.010a
T3	330.0b	0.026a	90.4b	0.011b	120.5c	0.012a
T4	265.1d	0.022b	78.9d	0.010b	101.3d	0.013a
T5	423.5a	0.027a	149.2a	0.018a	168.8a	0.013a
ESM	8.11	0.0014	6.71	0.0014	3.82	0.0041
Valor P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0581	0.0001	0.0602

^{abc} Medias con letras distintas entre columna difieren significativamente ($p<0.05$). B; producción total de gas, CH₄ ó CO₂, C; tasa de producción de gas en % hora. ESM: error estándar de la media. T1: dieta base + 19,7 µl/ de extracto de quebracho/animal día⁻¹, T2: dieta base + 38,7 µl/ de extracto de quebracho/animal día⁻¹, T3: dieta base + 5 g/extracto de *Yucca schidigera*/animal día⁻¹, T4: dieta base + 9.8 g/extracto de *Yucca schidigera*/animal día⁻¹, T5: dieta base (sin extractos).

La menor producción de gas observada en T4 se debe al posible efecto de las saponinas sobre los microorganismos generadores de gases efecto invernadero, principalmente protozoos y arqueas metanógenas, debido a la relación simbiótica existente entre estos

dos tipos de microorganismos y su deterioro crearía un medio hostil para la población de arqueas metanogénicas, como consecuencia a la disminución del número de protozoos (**Ku-Vera et al. 2020**), echo que se evidencio en la presente investigación.

Resultados similares fueron expuestos por **Lila et al., (2003)** quienes evaluaron la adición de saponina y evidenciaron reducción en la producción de CH₄ *in vitro*.

Contrario a lo expuesto anteriormente, la mayor producción de gases en T5 se debe quizá a la presencia de mayor numero de protozoos y metanógenos como respuesta a la ausencia de compuestos bioactivos (**Wang et al., 2012**).

3.2 Verificación de hipótesis

La adición de extracto de *Schinopsis balansae* (quebracho) y extracto de *Yucca schidigera* disminuyeron la producción de CH₄ y CO₂ y modificaron la ecología microbiana ruminal y fermentación.

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se evaluó la influencia de la adición de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* en la dieta sobre la ecología microbiana y función ruminal en ovinos. Bajo las condiciones de este estudio, se puede concluir que existe un efecto con capacidad de mitigación de la producción de gases, así como, de mejorar la digestión de la fibra y de reducción de la población de protozoos a nivel ruminal cuando se le suministra dosis superiores 8 gr de saponina/animal/día en ovinos que consumen dietas con base en forrajes.
- Se determinó la influencia de la adición del extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* en la dieta sobre la fermentación ruminal en ovinos *in vitro*.
- Se valuaó el efecto de la adición de una dieta a base extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* sobre la producción de gas metano entérico *in vitro*.
- Se analizó el efecto de la adición de una dieta a base de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) y *Yucca schidigera* sobre la producción dióxido de carbono *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguerre, M., Duval, B., Powell, J., Vadas, P. and Wattiaux, M., 2020. Effects of feeding a quebracho–chestnut tannin extract on lactating cow performance and nitrogen utilization efficiency. *Journal of Dairy Science*, 103(3), pp.2264-2271.
- Ahnert, S., Dickhoefer, U., Schulz, F., y Susenbeth, A. (2015). Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. *Livestock Science*, 177, 63-70.
- Ammar, H., López, S., Kammoun, M., Bodas, R., Giráldez, F. and González, J., 2009. Feeding quebracho tannins to sheep enhances rumen fermentative activity to degrade browse shrubs. *Animal Feed Science and Technology*, 149(1-2), pp.1-15.
- Beauchemin, K; McGinn, S; Martinez, T; McAllister, T. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle1. *Journal of Animal Science* 85(8): 1990-1996.
- Benchaar, C; McAllister, T; Chouinard, P. 2008. Digestion, Ruminal Fermentation, Ciliate Protozoal Populations, and Milk Production from Dairy Cows Fed Cinnamaldehyde, Quebracho Condensed Tannin, or *Yucca schidigera* Saponin Extracts. *Journal of Dairy Science* 91(12): 4765-4777.
- Chepete, H., Xin, H., Mendes, L., Li, H. and Bailey, T., 2012. Ammonia emission and performance of laying hens as affected by different dosages of *Yucca schidigera* in the diet. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3), pp.522-530.
- de Hoyos-Martínez, P; Merle, J; Labidi, J; Charrier – El Bouhtoury, F. 2019. Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. *Journal of Cleaner Production* 206: 1138-1155.
- Fernández, H; Catanese, F; Puthod, G; Distel, R; Villalba, J. 2012. Depression of rumen ammonia and blood urea by quebracho tannin-containing supplements

fed after high-nitrogen diets with no evidence of self-regulation of tannin intake by sheep. *Small Ruminant Research* 105(1-3): 126-134.

Fievez, V., Babayemi, O., & Demeyer, D. (2005). Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science And Technology*, 123-124, 197-210. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.05.001

González, N., Galindo, J., González, R., Sosa, A., Moreira, O., & Delgado, D. et al. (2006). Utilización de la técnica de PCR en tiempo real y de la producción de gas in vitro para determinar el efecto del ácido bromoetano sulfónico en la metanogénesis y la población microbiana ruminal. *Revista Cubana De Ciencia Agrícola*, 40(2), 8.

Guyader, J; Eugène, M; Doreau, M; Morgavi, D; Gérard, C; Martin, C. . 2017. Tea saponin reduced methanogenesis in vitro but increased methane yield in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100(3): 1845-1855.

Holtshausen, L; Chaves, A; Beauchemin, K; McGinn, S; McAllister, T; Odongo, N; Cheeke, P; Benchaar, C. . 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92(6): 2809-2821.

Junior, F; Cassiano, E; Martins, M; Romero, L; Zapata, D; Pinedo, L; Marino, C; Rodrigues, P. . 2017. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. *Livestock Science* 203: 21-29.

Ku-Vera, J. C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S. S., Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Arango, J., ... y Solorio-Sánchez, F. J. (2020). Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 584.

León, R; Bonifaz, N; Gutiérrez, F. . 2018. Pastos y forrajes del Ecuador. 1 ed. Quito, Editorial Universitaria Abya-Yala, p.37-43.

- Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T., y Itabashi, H. (2003). Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3330-3336.
- Liu, C., Li, Z., Du, J. and Shan, A., 2007. The Effect of *Yucca schidigera* Extract on Ruminal Fermentation and Parameters Traits in Sheep. *Agricultural Sciences in China*, 6(1), pp.121-128.
- Makkar, H. . 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49(3): 241-256.
- McMurphy, C; Sexten, A; Mourer, G; Sharman, E; Trojan, S; Rincker, M; Coblenz, W; Lalman, D. . 2014. Effects of including saponins (Micro-Aid®) on intake, rumen fermentation and digestibility in steers fed low-quality prairie hay. *Animal Feed Science and Technology* 190: 47-58.
- Mlambo, V; Mapiye, C. . 2015. Towards household food and nutrition security in semi-arid areas: What role for condensed tannin-rich ruminant feedstuffs?. *Food Research International* 76: 953-961.
- Molina-Botero, I; Arroyave-Jaramillo, J; Valencia-Salazar, S; Barahona-Rosales, R; Aguilar-Pérez, C; Ayala Burgos, A; Arango, J; Ku-Vera, J. . 2019. Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Animal Feed Science and Technology* 251: 1-11.
- Molino, S; Fernández-Miyakawa, M; Giovando, S; Rufián-Henares, J. . 2018. Study of antioxidant capacity and metabolization of quebracho and chestnut tannins through in vitro gastrointestinal digestion-fermentation. *Journal of Functional Foods* 49: 188-195.
- Moumen, A., Azizi, G., Chekroun, K. B., y Baghour, M. (2016). The effects of livestock methane emission on the global warming: a review. *International Journal of Global Warming*, 9(2), 229-253.

- Norris, A. B., Tedeschi, L. O., Foster, J. L., Muir, J. P., Pinchak, W. E., & Fonseca, M. A. (2020). AFST: Influence of quebracho tannin extract fed at differing rates within a high-roughage diet on the apparent digestibility of dry matter and fiber, nitrogen balance, and fecal gas flux. *Animal Feed Science and Technology*, 260, 114365.
- Núñez Torres, O. P., Barros Rodríguez, M., Sanchez, D., y Guishca-Cunuhay, C. (2018). Comportamiento productivo, degradación ruminal y producción de gas in vitro en ovinos alimentados con dietas a base de residuos pos-cosecha de *Chenopodium quinoa*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(3), 765-773.
- Núñez-Torres, O. P., y Rodríguez-Barros, M. A. (2019). Subproductos agrícolas, una alternativa en la alimentación de rumiantes ante el cambio climático. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 6(1), 24-37.
- Patra, A. K., y Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198-1222.
- Patra, A. K., y Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 24-37.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1-18.
- Piñeiro-Vázquez, A. T., Canul-Solis, J. R., Alayón-Gamboa, J. A., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Solorio-Sánchez, F. J., ... y Ku-Vera, J. C. (2017). Energy utilization, nitrogen balance and microbial protein supply in cattle fed *Pennisetum purpureum* and condensed tannins. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(1), 159-169.
- Ramírez-Restrepo, C; Tan, C; O'Neill, C; López-Villalobos, N; Padmanabha, J; Wang, J; McSweeney, C. . 2016. Methane production, fermentation characteristics,

and microbial profiles in the rumen of tropical cattle fed tea seed saponin supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 216: 58-67.

Roque, B; Salwen, J; Kinley, R; Kebreab, E. . 2019. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. *Journal of Cleaner Production* 234: 132-138.

Sandoval-Pelcastre, A. A., Ramírez-Mella, M., Rodríguez-Ávila, N. L., y Candelaria-Martínez, B. (2020). Árboles y arbustos tropicales con potencial para disminuir la producción de metano en rumiantes [Tropical trees and shrubs with potential to reduce the production of methane in ruminants]. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23 (33), 1-16.

Santacruz-Reyes, R. and Chien, Y., 2012. The potential of *Yucca schidigera* extract to reduce the ammonia pollution from shrimp farming. *Bioresource Technology*, 113, pp.311-314.

Santoso, B., 2012. Rumen Fermentation Characteristics and Methagenesis in Sheep Fed Silage-Based Diet Supplemented with *Yucca Schidigera* or *Yucca Schidigera* Combined with Nisin. *Buletin Peternakan*, 28(1), p.1.

Theodorou, M., Williams, B., Dhanoa, M., McAllan, A., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science And Technology*, 48(3-4), 185-197. doi: 10.1016/0377-8401(94)90171-6

Theodorou, M; Williams, B; Dhanoa, M; McAllan, A; France, J. . 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48(3-4): 185-197.

Ugbogu, E; Elghandour, M; Ikpeazu, V; Buendía, G; Molina, O; Arunsi, U; Emmanuel, O; Salem, A. . 2019. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *Journal of Cleaner Production* 213: 915-925.

- Vélez-Terranova, M., Gaona, R. C., y Sánchez-Guerrero, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3), 489-499.
- Wallace, R. J., Arthaud, L., y Newbold, C. J. (1994). Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 60(6), 1762-1767.
- Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B., & Newbold, C. J. (2002). Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(10), 1458-1468.
- Wang, J. K., Ye, J. A., y Liu, J. X. (2012). Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. *Tropical animal health and production*, 44(4), 697-706.
- Xu, M; Rinker, M; McLeod, K; Harmon, D. . 2010. *Yucca schidigera* extract decreases in vitro methane production in a variety of forages and diets. *Animal Feed Science and Technology* 159(1-2): 18-26.
- Yuste, S; Amanzougarene, Z; de la Fuente, G; de Vega, A; Fondevila, M. . 2019. Rumen protozoal dynamics during the transition from milk/grass to high-concentrate based diet in beef calves as affected by the addition of tannins or medium-chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology* 257: 114273.
- Zhou, Y. Y., Mao, H. L., Jiang, F., Wang, J. K., Liu, J. X., y McSweeney, C. S. (2011). Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 93-100.

ANEXOS



Anexo1. Elaboración y suministro de aditivos

	
<p>Macerado de <i>Schinopsis balansae</i></p>	<p>Filtrado de macerado de <i>Schinopsis balansae</i></p>
	
<p>Extracto de quebracho (<i>Schinopsis balansae</i>) dosis 1 y 2; <i>Yucca schidigera</i> dosis 1 y 2</p>	<p>Suministro de extracto de quebracho</p>

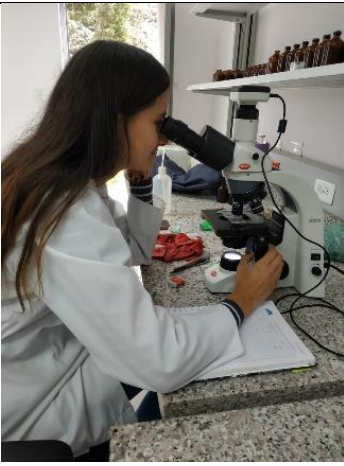

Anexo 2. Fermentación ruminal *in vitro*

	
<p>Elaboración saliva artificial</p>	<p>Materiales utilizados en la elaboración de la saliva artificial</p>
	
<p>Inmovilización de los animales</p>	<p>Obtención de líquido ruminal</p>
	
<p>Medición de presión</p>	<p>Medición de N y CO₂</p>

Anexo 3. Digestibilidad y degradación ruminal

	
Tamizaje heces – obtención MS	Obtención de FDN y FDA

Anexo 4. Conteo de protozoos

	
Observación y conteo de protozoos mediante el uso de la cámara de Neubauer	Identificación de un microorganismo protozario