

COMPARACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS DE DESLIGAMIENTO DE BACTERIAS RUMINALES ASOCIADAS A LA FASE SÓLIDA DE LA DIGESTA EN UN SISTEMA *IN VITRO* (RUSITEC)

M.J. Ranilla, M.D. Carro y M.L. Tejido

Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, 24071 LEÓN

INTRODUCCIÓN

A pesar de los numerosos estudios llevados a cabo sobre la síntesis de proteína microbiana en el rumen, existen muy pocos datos definitivos sobre los factores que intervienen en la misma o en su eficiencia. Ello es debido, fundamentalmente, a la variedad de técnicas empleadas para cuantificar la producción de nitrógeno microbiano y a la dificultad para obtener una muestra representativa de la población bacteriana.

Diversos métodos para estimar la síntesis de proteína microbiana se basan en el uso de marcadores, y en especial, en la relación marcador:N de la población microbiana del rumen. Esta población microbiana se compone de dos fracciones: las bacterias que se encuentran en suspensión en la fase líquida (BAL), y las que se asocian a la fase sólida de la digesta (BAS). El aislamiento de las BAL es relativamente sencillo, por lo que se han venido utilizando como fracción representativa de todos los microorganismos presentes en el rumen. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos ruminales se encuentra asociada a las partículas no digeridas de alimento (BAS), y se sabe que su composición química es diferente a la de las BAL (Merry y McAllan, 1983). Puesto que la relación marcador:N difiere entre BAL y BAS, sería conveniente tener en cuenta ambas fracciones a la hora de estimar la síntesis de proteína microbiana.

El aislamiento de las BAS es más complicado que el de las bacterias de la fase líquida, ya que se requiere inhibir la adhesión de los microorganismos a las partículas de alimento y conseguir su desligamiento, así como recuperar la mayor proporción posible de las que han sido desligadas. La literatura recoge diversos tratamientos de desligamiento físico-químicos y mecánicos de las BAS, con resultados variables (Whitehouse et al., 1994; Martín-Orúe et al., 1998).

En este trabajo se estudió el efecto de diversos métodos de desligamiento de las BAS en un sistema *in vitro* de fermentadores semicontinuos (RUSITEC), que permite obtener las fases sólida y líquida de la digesta en compartimentos separados.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando un rumen artificial de tipo semicontinuo (RUSITEC; Czerkawski y Breckenridge, 1977) provisto de cuatro vasijas que recibieron una ración consistente en 80% de heno de alfalfa y 20% de un concentrado a base de maíz, soja y cebada. La incubación se prolongó durante 16 días: 12 días de adaptación a la dieta y 4 días de medida. El día 1 se inoculó el sistema con contenido ruminal (líquido y sólido) procedente de 4 ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con heno de alfalfa y concentrado en proporciones 50:50. El alimento (15,6 g de materia seca) se incubó diariamente en bolsas de nylon,

Trabajo financiado por la J.C.Y.L. (LE29/98 y LE38/01) y por la C.I.C.Y.T. (AGF 98-0188)

manteniéndose cada bolsa dentro de la vasija durante 48 horas. Como marcador microbiano se utilizó ^{15}N .

Tras su retirada de las vasijas, el contenido de las bolsas se pesó y se tomó una muestra de digesta sólida. El resto del material se sometió al tratamiento de desligamiento correspondiente. Los cuatro métodos de desligamiento estudiados fueron los siguientes:

- tratamiento CONTROL: el residuo sólido se diluyó con metilcelulosa al 0,1% en solución salina, se agitó a mano y se incubó a 37°C durante 30 minutos en agitación continua, mantenido posteriormente a 4°C y pH=2 durante 24 h.
- TWEEN 80 (TW): tratamiento control + suspensión en una solución salina con Tween80 al 0,1 % a 4°C y pH=2 durante 24 h.
- METANOL (ME): tratamiento control + suspensión en una solución salina con Tween 80 al 0,1% y metanol al 1% a 4°C durante 24 h.
- BUTANOL TERCIARIO (BU): tratamiento control + suspensión en una solución salina con Tween 80 al 0,1% y butanol terciario al 1% a 4°C durante 24 h.

En cada uno de los días de medida (días 13,14, 15 y 16) se asignó cada tratamiento de desligamiento a una vasija, de forma que se obtuvieron un total de cuatro réplicas por tratamiento. En todos los tratamientos, pasadas las 24 h el residuo se homogeneizó y filtró a través de dos bolsas de nylon de 40 μm . Posteriormente el residuo se resuspendió en la solución correspondiente, se mezcló y filtró de nuevo, repitiendo el proceso 5 veces. El filtrado final se utilizó para aislar un pellet bacteriano de las bacterias asociadas a la fase sólida por centrifugación diferencial sobre el que se determinó su contenido en MS, N y ^{15}N . Las muestras de digesta sólida antes y después del tratamiento de desligamiento se liofilizaron para para determinar su contenido en MS, nitrógeno no amoniacal (NAN) y ^{15}N .

El porcentaje de BAS desligadas se calculó como la pérdida de átomos de ^{15}N en exceso en la digesta sólida tras el tratamiento de desligamiento correspondiente. La proporción de BAS recuperadas de las desligadas se calculó a partir de los enriquecimientos en ^{15}N de la digesta antes y después del tratamiento de desligamiento y los de los pellets bacterianos. El porcentaje de recuperación total se calculó como $((\% \text{ BAS recuperadas de las desligadas}) \times (\% \text{ desligamiento})) / 100$.

El efecto del método de desligamiento sobre los distintos parámetros estudiados se estudió mediante análisis de varianza y se realizaron los siguientes contrastes: C1: control vs TW, ME y BU; C2: TW vs ME y BU; C-: ME vs BU.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, con el tratamiento control con metilcelulosa se obtuvo un porcentaje de desligamiento del 80,5%, similar a los valores descritos por Whitehouse et al., (1994) tras la incubación con metilcelulosa a 37 °C . En nuestro estudio, no se observaron efectos aditivos del tratamiento posterior con TW, ME o BU sobre el tratamiento control con metilcelulosa, ni existieron diferencias ($P > 0,05$) entre los distintos tratamientos de desligamiento en el porcentaje de BAS desligadas, obteniendo un valor medio de 80,1 %. Estos valores son mayores a los obtenidos con otros tratamientos basados en la homogeneización el enfriamiento de las muestras (Merry y McAllan, 1983; Martín-Orúe et al., 1998).

Tabla 1. Porcentajes de desligamiento, de recuperación de bacterias asociadas a la fase sólida de la digesta (BAS) desligadas, de recuperación de BAS totales y enriquecimiento en ^{15}N en BAS obtenidos con distintos métodos de desligamiento

tratamiento de desligamiento	% desligamiento	% recuperación BAS desligadas	% recuperación BAS totales	enriquecimiento ($^{15}\text{N}/\text{N}$ total) BAS
Control	80,5	68,9	55,6	0,4341
TW	78,9	68,9	54,1	0,4365
BU	79,4	68,8	54,6	0,4429
ME	81,7	69,0	56,1	0,4468
e.e.d.	2,45	7,38	5,50	0,00891
C1	NS	NS	NS	NS
C2	NS	NS	NS	NS
C3	NS	NS	NS	NS

e.e.d.: error estándar de la diferencia

C1: Control vs TW, BU y ME; C2: TW vs BU y ME; C3: BU vs ME; NS: no significativo (Ver texto para los diferentes tratamientos de desligamiento)

El porcentaje de recuperación de las BAS desligadas tampoco fue diferente ($P>0,05$) entre tratamientos de desligamiento, representando como media un 68,9% de las bacterias desligadas. De forma similar, no se observaron diferencias ($P>0,05$) en los porcentajes de recuperación de BAS totales entre los cuatro tratamientos de desligamiento, con un valor medio del 55,1%. Estos valores son superiores a los obtenidos por otros autores mediante diversos métodos de desligamiento, debido a que, como ya se ha indicado, nuestros valores de desligamiento fueron mayores a los encontrados en la literatura con otros métodos. El enriquecimiento en ^{15}N fue similar ($P>0,05$) en las BAS aisladas mediante los cuatro tratamientos, lo que podría indicar una composición homogénea de las poblaciones de bacterias aisladas por cualquiera de los métodos.

Los resultados obtenidos indican que la incubación con metilcelulosa a 37°C durante 30 minutos produce un desligamiento del 80% de las BAS, mayor que el obtenido por otros métodos físico-químicos. El uso de reactivos potencialmente peligrosos como el Tween 80, el butanol terciario y el metanol no mejora este porcentaje de desligamiento, por lo que puede evitarse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Czerkawski, J.W. y Breckenridge, G., 1977. *British Journal of Nutrition*, 38: 371-384.
- Martin-Orúe, S.M., Balcells, J., Zakraoui, F. y Castrillo, C. 1998. *Animal Feed Science and Technology*, 71: 269-282.
- Merry, R.J. y McAllan, A.B. 1983. *British Journal of Nutrition*, 50: 701-709.
- Whitehouse, N.L., Olson, V.M., Schwab, C.G., Chesbro, W.R., Cunningham, K.D. y Lykos, T. 1994. *Journal of Animal Science*, 72: 1335-1343.