Adhesión al sustrato y actividad de las bacterias ruminales en estudios *"in vitro"* con pared celular de paja de cebada

A. Barrios [1], M. Fondevila, J.F. Pérez y J. Balcells
Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza
Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza.
[1] Fac. de Agronomía, Universidad del Zulia, Aptdo. 526, Maracaibo, Venezuela.

Introducción

Para estudiar *"in vitro"* la degradación microbiana de sustratos celulósicos en respuesta a distintos factores experimentales es preciso estandarizar la metodología a emplear para determinar las variaciones microbianas tanto en la adhesión al sustrato como en la actividad enzimática sobre éste. Aunque las referencias disponibles acerca de la actividad de cepas puras de bacterias sobre sustratos puros es abundante, no lo es en relación a una población mixta ruminal.

Este trabajo se planteó para comparar la validez de la aplicación de diversas técnicas a estudios de adhesión bacteriana y de actividad degradativa sobre la pared celular vegetal, y estudiar la evolución de estos parámetros con el tiempo.

Material y métodos

Para evitar la interferencia de otros componentes del alimento, se empleó pared celular extraída de paja de cebada (Smith y Waldo, 1969). El producto (94.0 % de FND y 3.4 % de cenizas) se incluyó como sustrato de un medio de cultivo (0.5 % p/v) preparado a base de líquido de rumen centrifugado (40 % v/v) conteniendo un 0.25% de tripticasa como fuente de proteína. Cantidades alícuotas (8 ml) de medio se repartieron anaeróbicamente en tubos de Hungate, esterilizándose a continuación.

Para la obtención de inóculo se muestreó contenido ruminal de 2 ovejas alimentadas con heno de alfalfa y paja de cebada (50:50), que fue mezclado, homogeneizado y diluido a 1:10 en solución anaeróbica de dilución (ADS). Un ml de esta mezcla se inoculó asépticamente en cada tubo, incubándose (38 °C) durante 1.5, 3, 6, 9, 12 y 24 h.

La fracción bacteriana ligada al residuo sólido de fermentación (BAS) se obtuvo por centrifugación (500 x g) y lavado del residuo 2 veces con tampón fosfato 0.05 M a pH 6.7. La adhesión bacteriana se determinó bien por densidad óptica (DO) a 600 nm del sobrenadante obtenido tras desligar la BAS o bien a partir del contenido de bases púricas (Martín Orúe y col., 1995). Los tratamientos

de desligamiento comparados por DO fueron la adición de 4 ml de tampón fosfato y enfriamiento a 4 °C durante 10 minutos (F) o de 4 ml de solución de metilcelulosa 0.1 % (MC). La actividad enzimática de las bacterias adheridas al sustrato frente a diferentes polisacáridos (avicel, AV, carboximetilcelulosa, CMC y xilano, X) se evaluó por colorimetría (Somogyi, 1945), tras la extracción de las enzimas de la BAS mediante hidrólisis con lisozima (Silva y col., 1987).

Resultados y discusión

Inicialmente, se determinó la evolución de la adhesión bacteriana por DO, desligando la BAS mediante F o MC. Para evaluar la efectividad de los tratamientos de desligamiento, se determinó el contenido en bases púricas del residuo sólido despues del tratamiento y del sobrenadante de la extracción. Los resultados se presentan en la Tabla 1. Dada la baja liberación alcanzada por ambos tratamientos (menor del 33 %), se probó si el tiempo de exposición al tratamiento aumentaba su efectividad. La DO no aumentó ($P > 0.05$) al hacerlo el tiempo de tratamiento con F o MC de 10 a 30 minutos (valores medios de 0.35 y 0.29, respectivamente; $n = 6$; e.s.d. = 0.037) tras 24 h de incubación. Se concluye que, a pesar de ser un método simple y barato, la lectura de DO es poco fiable en estudios de adhesión que dependan de métodos poco eficientes de desligamiento de bacterias. Por ello, se decidió probar un método alternativo de valoración directa de la cantidad de bacterias, como es la concentración de bases púricas.

La Tabla 2 muestra la evolución de la adhesión bacteriana a la pared celular de paja determinada por la concentración de bases púricas en la BAS. La evolución de la concentración de purinas indica que la adhesión al sustrato es considerable a partir de las 9 h, y alcanza un máximo tras 24 h de incubación. El análisis de la concentración de purinas en el residuo de incubación aparece como un método analítico fiable en estudios de adhesión bacteriana. No obstante, no todas las bacterias adheridas al sustrato son capaces de degradarlo activamente. Además, transcurre un periodo de tiempo desde que la población celulolítica se adhiere hasta que se inicia su actividad degradativa.

La evolución en el tiempo de la actividad enzimática de la población adherida frente a diversos polisacáridos se incluye también en la Tabla 2. Los valores negativos se consideraron "0" para el análisis. La significación de la actividad frente a AV a las 12 h se debe más a la presencia de valores igualados a cero que a una actividad enzimática real. La actividad CMC-asa y X-asa se manifestó a partir de las 9 h, aumentando significativamente a las 24 h con CMC ($P < 0.01$) y a las 12 y 24 h con X ($P < 0.001$). La escasa cantidad de sustrato incubado, y por tanto de extracto enzimático (2 ml/ tubo), pudo limitar parcialmente la respuesta. La

determinación de la actividad enzimática es aplicable a estudios microbianos *in vitro*, pero es preciso aumentar su precisión para que sea fiable.

Referencias

Martín Orúe,SM, Balcells,J, Guada, JA, Castrillo,C, 1995. *Br. J. Nutr.,73* (en prensa)

Silva, A.T., Wallace R.J. y Ørskov, E.R., 1987. *Br. J. Nutr., 57* : 407-415.

Smith, L.W. y Waldo, D.R., 1969. *J. Dairy Sci., 52* : 2051-2053.

Somogyi, M., 1945. *J. Biol. Chem., 160* : 61-68.

Tabla 1: Evolución de la adhesión bacteriana a la fracción sólida, según la DO de la solución de bacterias liberadas por enfriamiento (F) o por metilcelulosa (MC). Se incluye la efectividad del tratamiento de desligamiento, según el contenido de purinas en el residuo (res.) y en la fracción líquida liberada (f.l.) (n = 3).

		6 h	9 h	12 h	24 h
F:	- DO	0.06±0.002	0.10±0.003	0.13±0.017	0.31±0.008
	- µmol purinas res.	81.2±6.86	------	-------	409.5±19.85
	- µmol purinas f.l.	20.4±1.38	------	-------	184.7±2.41
MC:	- DO	0.06±0.001	0.13±0.005	0.08±0.003	0.29±0.005
	- µmol purinas res.	84.3±8.17	------	------	381.6±17.06
	- µmol purinas f.l.	28.0±2.00	------	------	184.7±1.90

Tabla 2: Evolución de la adhesión bacteriana al sustrato estimada mediante la concentración de bases púricas (µmol / mg MS residuo), y evolución de la actividad enzimática del hidrolizado de la fracción bacteriana adherida (U.E./g MS residuo) frente a avicel (AV), carboximetilcelulosa (CMC) y xilano (X) (n = 4).

	adhesión	actividad enzimática		
hora	µmol / mg MS	AV	CMC	X
1.5	1.00 d	0.374 b	0.341 b	0.301 c
3	1.99 cd	0.000 b	0.000 b	0.509 c
6	2.03 cd	0.000 b	0.000 b	0.742 c
9	4.11 c	0.475 ab	0.784 b	1.466 c
12	9.56 b	0.787 a	1.264 ab	4.257 b
24	30.24 a	0.274 b	2.399 a	12.411 a
36	33.61 a	-----	-----	-----
e.s.d.	1.417	0.2218	0.5543	0.8580

letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)