EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA SOBRE LA SÍNTESIS MICROBIANA Y LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE DISTINTOS TIPOS DE PARED CELULAR

M.J. Ranilla, S. López y M.D. Carro

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

INTRODUCCIÓN

Algunos estudios recientes sugieren que, en contra de lo que se ha asumido hasta el momento, las bacterias celulolíticas del rumen pueden incorporar directamente aminoácidos y péptidos durante la síntesis de proteínas (Cruz Soto et al., 1994; Carro y Miller, 1999). Sin embargo, la estimulación de la síntesis microbiana por los péptidos y aminoácidos parece depender de la naturaleza del sustrato disponible por las bacterias para obtener energía. Si el crecimiento microbiano se encuentra limitado por la fuente energética, la adición de péptidos y aminoácidos podría no representar ninguna ventaja.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la adición de péptidos a cultivos *in vitro* de microorganismos ruminales sobre la síntesis de proteína microbiana y la fermentación de tres sustratos fibrosos de diferentes características.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se seleccionaron tres sustratos con diferente composición de su pared celular (fibra neutro detergente, FND): semilla de algodón, paja de alubia y pulpa de cítricos. Las paredes de los tres sustratos se obtuvieron mediante lavado del material con detergente neutro (Goering y Van Soest, 1970), y su composición química se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química (g/kg FND) de las paredes celulares de los tres sustratos incubados.

	Semilla de algodón	Paja de alubia	Pulpa de cítricos
Hemicelulosa	198	180	188
Celulosa	628	637	662
Lignina	174	183	150

El estudio se llevó a cabo en cultivos en serie de microorganismos ruminales *in vitro*. Se incubaron 500 mg de cada FND en botellas de 125 ml a las que se añadieron 35 ml de una mezcla de líquido ruminal y del medio de cultivo (1:2 v/v) descrito por Goering y Van Soest (1970), mantenida a 39ºC y en anaerobiosis. Como inóculo se utilizó líquido ruminal procedente de cuatro ovejas merinas fistuladas en el rumen alimentadas con heno de buena calidad.

Se utilizaron dos fuentes nitrogenadas: amoníaco (40 mg de cloruro amónico por botella; AMO) y una mezcla de cloruro amónico y péptidos (40 mg de cloruro amónico y 300 mg de tripticasa por botella, PEP). Como marcadores microbianos se utilizaron ^{15}N y ^{32}P.

Para cada tipo de fibra se incubaron 18 botellas (9 por fuente nitrogenada). La producción de gas se registró en 3 botellas por sustrato y tratamiento nitrogenado a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 48, 72 y 96 h. La fermentación se detuvo al cabo de 24 h en el resto de las botellas mediante su introducción en un baño de hielo. Los contenidos de las botellas se transfirieron a tubos de centrífuga y se centrifugaron a

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

20.000 *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles, el enriquecimiento en ^{15}N y el recuento de ^{32}P radioactivo. El residuo de incubación se liofilizó para determinar su contenido en FND, N no amoniacal (NAN), enriquecimiento en ^{15}N y ^{32}P radioactivo.

Los datos de producción de gas se ajustaron al siguiente modelo exponencial: $gas = A\ (1\text{-}e^{-c(t\text{-}lag)})$, en el que *A* es la producción asintótica de gas, *c* es el ritmo fraccional de producción de gas y *lag* es el tiempo de retraso. La proporción de N microbiano en la fracción NAN se estimó dividiendo el enriquecimiento en ^{15}N del residuo de incubación entre el del sobrenadante cuando la única fuente de N fue el amoníaco (AMO). En el caso de los cultivos PEP, la síntesis de proteína microbiana se calculó a partir de la incorporación total de ^{32}P y de la relación ^{32}P:N en los cultivos AMO. Para cada sustrato, el efecto de la fuente nitrogenada se estudió mediante análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal y como puede apreciarse en la Tabla 2, la semilla de algodón fue el sustrato con el ritmo fraccional de producción de gas (*c*) más lento, y la pulpa de cítricos el más rápido, con la paja de alubia en una posición intermedia, indicando diferencias entre los tres sustratos en cuanto a la disponibilidad de energía. El parámetro *c* fue mayor ($P<0,05$) cuando la paja y la pulpa se incubaron en presencia de péptidos, sin que se observaran diferencias ($P>0,05$) entre fuentes nitrogenadas para la semilla de algodón. Estos resultados están en línea con los obtenidos por otros autores (Cruz Soto et al., 1994), y podrían indicar un efecto positivo sobre la fermentación *in vitro* de la adición de péptidos en presencia de fuentes de energía rápidamente disponibles. A pesar de estas diferencias en los parámetros de producción de gas, no se observaron diferencias ($P>0,05$) entre AMO y PEP en la cantidad de FND degradada al cabo de 24 h en ninguno de los tres sustratos. La producción de AGV sólo fue significativamente mayor ($P<0,05$) con el tratamiento PEP en el caso de la paja de alubia.

La síntesis de proteína microbiana se vio estimulada ($P<0,05$) en presencia de péptidos cuando se incubaron la FND de la paja de alubia y la pulpa de cítricos, sin que se observara efecto con la semilla de algodón. Este hecho sugiere que, debido al lento ritmo de producción de gas de este sustrato y a su largo tiempo de retraso (*lag*), los péptidos no pudieron ser directamente captados por las bacterias cuando se encontraban disponibles, mientras que en el caso de la paja y la pulpa, las bacterias pudieron utilizar los péptidos presentes en el medio, lo que se tradujo en una mayor síntesis de proteína microbiana. Los datos correspondientes a la captación de amoníaco confirman esta hipótesis. El porcentaje de N microbiano formado a partir de amoníaco fue significativamente menor ($P<0,05$) con el tratamiento PEP para la paja de alubia y la pulpa de cítricos, indicando una captación directa de péptidos en lugar de amoníaco cuando estos se encontraban en el medio, sin que se observaran diferencias en la captación de amoníaco ($P>0,05$) entre AMO y PEP para la semilla de algodón.

La utilización de péptidos para la síntesis de proteína microbiana aumentó ($P<0,05$) la eficiencia de dicha síntesis (ESM) en términos de cantidad de proteína microbiana sintetizada por g de MS fermentada en el caso de la paja de alubia y de la pulpa de cítricos, sin que se observaran diferencias para la semilla de algodón. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Carro y Miller (1999), quienes

observaron un aumento en la eficiencia de la síntesis microbiana *in vitro* sobre un sustrato fibroso (FND) cuando se añadieron péptidos al medio de cultivo.

Tabla 2. Parámetros de la curva de producción de gas (*c* y *lag*), producción de gas estimada a las 24 h, FND degradada (dFND), producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y N microbiano en 24 h, eficiencia de la síntesis microbiana (ESM, mg N microbiano/ g MS fermentada) y captación de NH_3 (%) para muestras de FND de los tres sustratos incubados *in vitro*.

		AMO	PEP	e.e.d.
Semilla de algodón	*c* (h^{-1})	0,023	0,021	0,0008
	lag (h)	6,16	5,52	0,634
	gas 24 h (ml)	20,1[a]	17,9[b]	0,16
	dFND (mg)	26,0	27,7	1,78
	AGV (µmol)	463	478	111,0
	N microbiano (mg)	2,75	3,50	0,293
	ESM	21,0	25,0	1,62
	captación NH_3 (%)	76,9	61,0	10,71
Paja de alubia	*c* (h^{-1})	0,044[a]	0,054[b]	0,0035
	lag (h)	4,43	4,35	0,208
	gas 24 h (ml)	37,1	38,3	2,74
	dFND (mg)	38,1	37,4	8,73
	AGV (µmol)	808[a]	887[b]	19,6
	N microbiano (mg)	5,47[a]	7,01[b]	0,291
	ESM	28,3[a]	37,7[b]	2,00
	captación NH_3 (%)	80,4[a]	60,6[b]	5,27
Pulpa de cítricos	*c* (h^{-1})	0,072[a]	0,080[b]	0,0015
	lag (h)	3,93	3,77	0,171
	gas 24 h (ml)	78,9	79,4	1,27
	dFND (mg)	72,7	73,0	0,85
	AGV (µmol)	1722	1796	50,0
	N microbiano (mg)	8,10[a]	12,0[b]	0,380
	ESM	21,9[a]	32,3[b]	1,16
	captación NH_3 (%)	69,1[a]	38,5[b]	3,84

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

Los resultados obtenidos confirman que, cuando la pared celular (FND) representa la única fuente de energía disponible, los péptidos estimulan la síntesis de proteína microbiana *in vitro* dependiendo de las características de dicha pared celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carro, M.D. y Miller, E.L. 1999. *Br. J. Nutr.*, 82: 149-157.

Cruz Soto, R., Muhammed, S.A., Newbold, C.J., Stewart, C.S. y Wallace, R.J. 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 49: 151-161.

Goering, M.K. y Van Soest, P.J. 1970. *Agr. Handb. n 379, Agric. Res. Serv.*, USDA, Washington, USA.