COMPARACIÓN DE DOS PROCEDIMIENTOS PARA DETERMINAR LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN FERMENTADORES DE FLUJO SEMICONTINUO (RUSITEC)[1]

M.L. Tejido, M.D. Carro, S. López y M.J. Ranilla
Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, 24007 LEON

INTRODUCCIÓN

La determinación de la síntesis microbiana en el rumen es un proceso complejo, ya que es preciso obtener muestras representativas de la digesta que llega al intestino y del total de microorganismos ruminales. Asimismo, es necesario utilizar marcadores que permitan cuantificar la fracción nitrogenada de la digesta que es de origen microbiano. Debido a la dificultad que presenta el asilamiento de los microorganismos ruminales asociados a la fase sólida de la digesta (MAS), en muchos estudios se han utilizado pellets microbianos aislados a partir de la fase líquida del rumen (MAL) como muestra de referencia para determinar la síntesis de proteína microbiana (SPM). Este procedimiento no tiene en cuenta los microorganismos MAS adheridos a las partículas de digesta, los cuales pueden representar un porcentaje muy alto de la población microbiana ruminal total (Yang et al. 2001). Sin embargo, cuantificar la SPM a partir de la fase sólida y líquida del rumen complica metodológicamente la realización de los experimentos y encarece notablemente su coste. El objetivo del presente trabajo consistió en comparar dos procedimientos metodológicos para estimar la SPM en un sistema de fermentadores de flujo semicontinuo (RUSITEC). Mediante el primer procedimiento, la SPM se estimó como la suma del crecimiento de los microorganismos asociados a la fase y líquida del sistema. En el segundo procedimiento, la SPM se estimó a partir de una única muestra de digesta y un único pellet microbiano, aislado de la mezcla de ambas fases.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio se realizaron dos series de incubación utilizando un sistema de fermentadores de flujo semicontimuo (Rusitec) provisto de ocho fermentadores. En la primera serie de incubación (Ruistec 1) los fermentadores recibieron como substrato de fermentación una mezcla de almidón y de fibra de ballico (obtenida mediante extracción con detergente neutro) en proporción 30:70 (substrato F). En la segunda serie de incubación (Rusitec 2), los fermentadores recibieron un substrato formado por estos mismos ingredientes, pero en proporción 70:30 (substrato C). Ambos substratos se incubaron con dos fuentes de N, que se infundieron de forma continua disueltas en la saliva artificial (400 mg de N por vasija y día). En cada serie de incubación cuatro de los fermentadores recibieron como fuente de N únicamente cloruro amónico (tratamiento AMO) y los otros cuatro recibieron una mezcla al 50% de cloruro amónico y proteína purificada de soja (tratamiento PROT). En ambas series de incubación se utilizó ^{15}N ($(^{15}NH_4)_2SO_4$; 95% de enriquecimiento) como marcador microbiano, el cual se añadió a la saliva artificial.

Tras 12 días de incubación, durante los días 13 y 14 de cada experimento se tomaron muestras para determinar la SPM en las fases sólida y líquida del sistema.

[1] Este trabajo forma parte de los proyectos de investigación AGL-2004-04755-CO2-01/GAN y AGF98-0188 financiadod por el M.E.C.

La SPM en la fase sólida del sistema se estimó en el residuo sólido que se extrae diariamente tras incubar el substrato en bolsas de nailon durante 48 horas. Para ello se tomaron muestras de este residuo (digesta sólida) y se analizó su contenido en N no amoniacal (NNA) y el enriquecimiento en ^{15}N de esta fracción. Asimismo, se obtuvo un pellet de MAS tras el tratamiento de una porción del residuo sólido con metilcelulosa al 0,1 % (Ranilla y Carro, 2003). La SPM en la fase líquida del sistema se estimó en el efluente líquido que se recoge diariamente. Para ello se tomaron muestras del efluente (digesta líquida) y se analizó su contenido en NNA y su enriquecimiento en ^{15}N. A partir de muestras del efluente se aisló un pellet de MAL mediante centrifugación diferencial (Carro y Miller, 1999). La SPM diaria se calculó como la suma de los valores obtenidos en las fases sólida y líquida del sistema. Durante los días 15 y 16 las dos fracciones de la digesta (sólida y líquida) se mezclaron para obtener la "digesta total". Una fracción de esta digesta se utilizó para analizar su contenido en NNA y su enriquecimiento en ^{15}N y el resto para aislar un pellet representativo del total de las bacterias presentes en el sistema (MT).

La proporción de N microbiano en las digestas sólida, líquida y total se calculó dividiendo la relación $^{15}N/N$ en las digestas (sólida, líquida y total) entre la relación $^{15}N/N$ en el pellet microbiano correspondiente (MAS, MAL o MT, respectivamente). El efecto del tipo de fuente nitrogenada sobre el crecimiento microbiano y el efecto del procedimiento de estimación del crecimiento microbiano sobre la SPM se analizaron mediante un análisis de la varianza. La relación entre los valores obtenidos por ambos métodos se analizó mediante análisis de regresión.

3. RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los valores medios de SPM obtenidos para los tratamientos experimentales AMO y PROT y los dos métodos de determinación en ambas pruebas de RUSITEC (son los sustratos F y C).

Tabla 1. Efecto de los tratamientos experimentales y del procedimiento de determinación de la síntesis de proteína microbiana sobre la producción diaria de N microbiano (mg/d) en un sistema de fermentadores RUSITEC

Prueba experimental			e.e.d.[b]	P =
	Amoniaco	Proteína		
RUSITEC 1 (Substrato F)				
MAL + MAS	71,7	87,6	2,07	<0,001
MT	74,4	84,0	2,97	0,018
e.e.d.[b]	2.57	2.54		
P =	0.334	0.199		
RUSITEC 2 (Substrato C)				
MAL+ MAS	97,8	131	4,78	<0,001
MT	115	164	12,8	0,007
e.e.d.[b]	8,20	11,0		
P =	0,086	0,020		

[a] MAL+MAS: la producción diaria de N microbiano se calculó como la suma del N microbiano en las fracciones líquida y sólida de la digesta; MT: la producción diaria de N microbiano se calculó en la digesta total y se utilizó un pellet representativo de los microorganismos presentes en el sistema (MT) como muestra de referencia.

[b] e.e.d.= error estándar de la diferencia.

Mientras que en el RUSITEC 1 no se observaron diferencias (P>0,05) en la cantidad diaria de N microbiano debidas al método de determinación, en el RUSITEC 2 la utilización de los MT como pellet de referencia produjo mayores valores (P=0,086 y P=0,020 para los tratamientos "Amoniaco" y "Proteína", respectivamente) que la determinación del crecimiento microbiano a partir de las fases sólida y líquida del sistema (MAL+ MAS). Sin embargo, la utilización de uno u otro método no modificó, en ninguno de los experimentos, la interpretación de las diferencias observadas entre los tratamientos experimentales.

Cuando se analizaron las relaciones existentes entre los valores de la producción diaria de N microbiano obtenidos utilizando los dos métodos de determinación (Figura 1), se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa (P<0,001) entre los valores obtenidos a partir de la suma de las producciones en las fases líquida y sólida de la digesta (MAL + MAS) y los obtenidos a partir de la "digesta total" (MT).

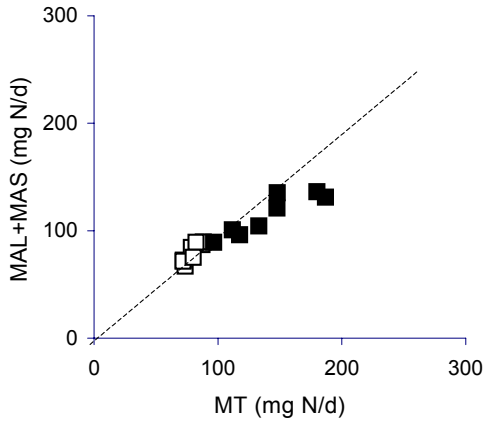


Fig. 1. Relación entre la producción diaria de N microbiano determinada utilizando los pellets MAL y MAS como pellets de referencia en un sistema Rusitec y los pellets totales (MT) (Substrato F (□) y substrato C (■)).
BAS + BAL = 0,567 (± 0,0474) BT + 34,8 (± 5,49) (r = 0,954; RSD= 1,83; P<0,001; n=16)

Los resultados obtenidos en esta prueba parecen indicar que la utilización de la "digesta total" y de los MT como un único pellet de referencia puede ser un procedimiento válido para estimar la SPM en el sistema RUSITEC.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carro MD y Miller EL. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82: 149-157.

Ranilla MJ y Carro MD. 2003. Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. *J. Anim. Sci.* 81: 537-544.

Yang WZ, Beauchemin KA y Rode LM. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736-2746.