DEGRADABILIDAD *IN VITRO* DE LA PARED CELULAR DE *BOUTELOUA REPENS* EN LIQUIDO RUMINAL ENRIQUECIDO CON INÓCULOS PROTOTIPO DE BACTERIAS Y HONGOS CELULOLÍTICOS AISLADOS DE BOVINOS EN PASTOREO EN EL TRÓPICO COLOMBIANO.

M. L. Arcos[1] y T. E. Díaz M[1]
[1]Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. CORPOICA, C.I. Tibaitatá, A.A. 240142 Las Palmas, Bogotá, Colombia, S.A.

INTRODUCCION

La actividad celulolítica de bacterias y hongos ruminales permiten un aprovechamiento metabólico eficiente en rumiantes alimentados con forrajes de mala calidad. No obstante, sólo el 10-35% de la energía consumida es retenida como energía neta; porque el 20-70% de los carbohidratos estructurales pueden ser no digestibles (Varga y Kolver, 1997). La degradabilidad de los forrajes tropicales por bovinos depende de la estructura y composición química de la planta, y de la actividad microbiana en el rumen, factores asociados con la cinética de digestión (Van Soest 1982; Chesson y Forsberg, 1988). Los procesos de digestión *in vitro* han sido desarrollados usando líquido ruminal o celulasas y soluciones tampón para simular las condiciones del rumen. Se han aplicado procesos enzimáticos *in vitro* para forrajes y pajas de baja calidad; sin embargo, han sido relativamente insatisfactorios, porque las bacterias del rumen son más eficientes para digerir carbohidratos estructurales que enzimas fungícas purificadas y levaduras, alcanzando un nivel superior de digestión de la pared celular (Van Soest, 1994). Los sistemas *in vitro*, que incluyen fluido ruminal enriquecido con cepas altamente celulolíticas permiten estimar el potencial de degradación de los forrajes tropicales. Cepas de bacterias y hongos celulolíticos, específicas, aisladas de bovinos en pastoreo en un ecosistema tropical de Colombia a base de forrajes de muy baja calidad, fueron adicionadas *in vitro* a líquido ruminal, para evaluar la degradabilidad de la pared celular de *Bouteloua repens,* un forraje de baja calidad en zonas tropicales semiáridas.

MATERIALES Y METODOS

Diferentes concentraciones (4, 8, 12, 16 y 20 en %v/v) de cultivos puros del hongo celulolítico *Neocallimastix frontalis* (H), de cultivos mixtos de bacterias celulolíticas: 50% *Fibrobacter succinogenes* y 50% *Ruminoccocus flavefaciens* (B), de cultivos mixtos de bacterias celulolíticas: 25% *Fibrobacter succinogenes* y 75% *Ruminoccocus flavefaciens* (B1), y de cultivos mixtos de hongos y bacterias: 50% *Neocallimastix frontalis* y 50 % de *F. succinogenes* + *R. flavefaciens* (HB), aislados de bovinos en pastoreo sobre forrajes de baja calidad en un ecosistema tropical de Colombia, fueron usados para enriquecer fluido ruminal (C) *in vitro,* y evaluar la degradabilidad de FND de *Bouteloua repens*, una especie forrajera tropical.

Cepas bacterianas y cultivos (B): Las cepas fueron seleccionadas del Banco de germoplasma de microorganismos ruminales (BGMR) de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), con base en estudios previos, sobre crecimiento microbiano, actividad celulolítica y degradabilidad (Ossa et al.,2003).Se cultivaron a 39^{o}C durante 24 horas en un medio de crecimiento anaeróbico, utilizando celobiosa 0,5% (p/v) como fuente de carbono. Las concentraciones bacterianas de los inóculos prototipo fueron entre 5,72 y 10,12 x 10^{8} UFC ml^{-1}.Se evaluaron dos relaciones de cepas celulolíticas en las mezclas de inóculo: 50:50 y 25:75% de *F. succinogenes: R. flaveciens.*

Cepas de hongos y cultivos (H): Una cepa de alta actividad celulolítica de *Neocallimastix frontalis*, fue seleccionada del BGMR de CORPOICA. Fue cultivada a 39°C durante 120 horas en medio de crecimiento anaeróbico, utilizando glucosa 0.2% y celobiosa 0.5% (p/v) como fuentes de carbono. Las concentraciones fúngicas en el inóculo prototipo fueron determinadas entre 3,6 y 18 x 10^4 UFT ml^{-1}.

Cultivos mixtos (HB-HB1):Cultivos de bacterias y hongos fueron mezclados en relación 50:50. Se utilizó estos inóculos prototipo para enriquecer el líquido del rumen (C).

El líquido Ruminal (C): Fue obtenido de una vaca fistulada en pastoreo sobre Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y se utilizó una solución de McDougall y líquido ruminal clarificado (3:1), como tratamiento control.

Ensayo de degradabilidad de FND in vitro: Muestras de pared celular de la especie forrajera teatino (*Bouteloua repens,* 0,5 g), fueron incubadas in vitro a 39°C durante 48h, en tubos que contenían líquido ruminal (C, 50 ml) ó líquido ruminal (40 ml) más cultivos microbianos de bacterias específicas (B y B1), hongos (H), y bacterias y hongos (HB, 10 ml). La degradabilidad de la pared celular fue calculada por diferencia, midiendo el inicial y el residual de la pared celular después del tiempo de incubación. La composición química de *Bouteloua repens* fue: PB: 5,02%; FND 71,64% y FAD 47,19%

Análisis Estadísticos: Los datos fueron analizados por un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, 5 inóculos y 5 concentraciones de inóculos, usando el procesador GLM de SAS. Se determinaron, además, los efectos principales del tipo de inóculo y concentración de inóculo, así como la interacción inóculo por concentración. Las medias entre tratamientos fueron comparadas por medio de la prueba de Tuckey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fluido ruminal enriquecido con los inóculos prototipo incrementó la degradabilidad, comparado con el fluido ruminal no enriquecido. Diferentes relaciones de hongos y bacterias en el inóculo adicionado, afectaron los valores de degradabilidad de *Bouteloua repens* y las concentraciones de los inóculos (% v/v), también afectaron la degradabilidad *in vitro*. La interacción inóculo x concentración no fue significativa. Además, se observó una disminución en la degradabilidad con concentraciones de inóculo mayores del 4% y 8% (v/v). La degradabilidad de la FND de *Bouteloua repens* con líquido ruminal enriquecido en concentraciones de 4% (v/v) se mantuvo en rangos del 44,07% para el líquido ruminal (C), al 67,69% para el líquido ruminal más inóculos microbianos de bacterias y hongos (HB). La degradabilidad de la FND de *B. repens* no incrementó ($P > 0,05$) cuando se adicionó al fluido ruminal, inóculos de cultivos específicos del hongo *Neocallimastix frontalis* (44,07% vs 47,97%).Sin embargo, se observó un incremento altamente significativo ($P < 0,01$) en la degradabilidad de la FND (44,07% vs 67,69%), cuando el fluido ruminal fue enriquecido con inóculos que contenían cepas de *N. frontalis, F. succinogenes y R. flavefaciens* (HB). Así mismo, la adición de cepas específicas de las bacterias celulolíticas *F. succinogenes y R. flavefaciens* al fluido ruminal, incrementó en 12,6 unidades porcentuales la degradabilidad de la pared celular de *B. Repens*, de 44,07% a 56,76% ($P< 0,05$), (Tabla 1 y 2). En general, la degradabilidad de la FND de *Bouteloua repens* fue más alta ($P< 0,05$) para el líquido enriquecido con el tratamiento HB (67,69%) comparado con los tratamientos H (47,97%), B (56,76%) y C (44,07%). No se presentaron diferencias ($P> 0,05$), entre los tratamientos H y C. Un efecto sinérgico, representado por valores de degradabilidad de 19,7 unidades porcentuales mayores que H, y 10,93 mayores que B, fue observado para el líquido enriquecido con inóculos HB. Los resultados indican que

la adición de cepas de bacterias y hongos celulolíticos, altamente específicos, aislados de bovinos en pastoreo sobre forrajes de mala calidad, para enriquecer liquido ruminal a nivel *in vitro*; representa un buen acercamiento para estimar valores máximos de degradabilidad de forrajes tropicales.

Tabla 1. Degradabilidad *in vitro* de la pared celular de *Bouteloua repens* con inóculos microbianos -prototipo (%)

Tratamientos*	Concentración de los inóculos (%v/v)					
	0 **	4	8	12	16	20
B	44,07	56,76	54,33	53,63	50,59	48,77
B1	44,07	49,59	53,01	54,18	54,25	51,90
H	44,07	47,97	47,93	45,63	44,89	44,79
HB	44,07	67,69	62,72	59,65	54,78	61,01
HB1	44,07	64,90	58,91	49,35	42,63	43,39

*** inóculos enriquecidos-prototipo**:
B = 50% (v/v) *Fibrobacter succinogenes* + 50%(v/v) *Ruminococcus flavefaci*ens
B1 = 25% (v/v) *Fibrobacter succinogenes* + 75% (v/v) *Ruminococcus flavefaciens*
H = 100% (v/v) *Neocallimastix frontalis*
HB = *50% (v/v) [F.succinogenes (50%) + R.flavefaciens (50%)] + 50% (v/v) N. frontalis*
HB1=*50% (v/v) [F.succinogenes (25%) + R.flavefaciens (75%)] + 50% (v/v) N. frontalis*
****Control:** Sustrato FDN + 50 ml solución McDougall y líquido ruminal clarificado (3:1)
Ensayo: Sustrato FDN + 40 ml solución of McDougall líquido ruminal clarificado (3:1)+ 10 ml inóculo prototipo.

Tabla 2. Medias de la degradabilidad *in vitro* de la pared celular de *Bouteloua repens* con inóculos microbianos -prototipo (%)

	Tratamientos						EEM	MDS	P <
	Control	**B**	**B1**	**H**	**HB**	**HB1**			
Degradabilidad (%)	44,07^{d}	52,8^{b}	52,6 ^{b}	46,2 ^{c}	61,2 ^{a}	51,8 ^{b}	1,27	3,92	**
	Concentraciones								
	Control	**4**	**8**	**12**	**16**	**20**			
Degradabilidad (%)	44,07^{d}	57,4 ^{a}	55,4^{ab}	52,5^{bc}	49,4 ^{c}	50,0 ^{c}	1,27	3,92	*
Control Vs Otro									*
Tratam x Concentración									NS

a,b,c medias con diferentes letras son significativas (P<0.05); *: P<0.05 , **: P<0.01; NS: No significativo, MDS= Mínima Diferencia Significativa, EEM: Error estándar de la Media.

CONCLUSION

Estos resultados sugieren que el uso de aditivos microbianos basados en cepas de bacterias y hongos, altamente celulolíticos, puede conllevar ventajas productivas en los sistemas ganaderos tropicales.

BIBLIOGRAFÍA

Chesson, A., Forsberg,C.W.,**1988.** Polysaccaride degradation by rumen microorganism. In P.N. Honson (Ed.)The rumen microbial ecosystem.p 251.Elseiver Science Publisher.London, England.

Ossa F., Arcos M.L., Diaz T.E., and Pittroff W., 2003. Cell wall degradation of *Bouteloua repens in vitro* by pure cultures of *R. flavefaciens* and *F. succinogenes* isolate from cattle grazing tropical lowland pastures in Colombia. Rev:Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuarias. Vol. 4, 1: 29-35

Van Soest, P.J.,1994. Nutritional Ecology of Ruminant. 2nd ed. Ithaca, NY.Comstock, Comell University Press.

Van Soest, P.J., 1982. Nutritional Ecology of the Rumiant. Corvallis, Oregon, O&B Books.

Varga G., and Kolver E., 1997. Microbial and animal imitations to fibre digestion and utilisation. Journal of Nutrition. 127:819-823