

EFFECTO DE LA RELACIÓN FORRAJE:CONCENTRADO Y DEL TIPO DE FORRAJE DE LA DIETA SOBRE LAS POBLACIONES DE PROTOZOOS EN EL RUMEN DE OVEJAS Y EN FERMENTADORES RUSITEC

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido y M.D. Carro
Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León
memarp@unileon.es

INTRODUCCIÓN

El sistema de fermentadores Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977) es uno de los más utilizados en los estudios *in vitro* sobre la fermentación ruminal. Los protozoos constituyen una parte importante de la biomasa microbiana del rumen, y su caracterización, así como el estudio de su evolución en los fermentadores, resulta fundamental a la hora de extrapolar los resultados obtenidos a sistemas *in vivo*. Aunque diversos trabajos han analizado el efecto de diferentes factores de la dieta sobre las poblaciones protozoarias *in vivo* (Abe et al., 1981; Hristov et al., 2001) e *in vitro* (Abe y Kumeno, 1973; Carro et al., 1995) no existen hasta la fecha estudios que hayan comparado los resultados obtenidos en ovejas y en fermentadores Rusitec cuando ambos reciben las mismas dietas. En este trabajo se analizó el efecto de la relación forraje:concentrado y del tipo de forraje sobre las poblaciones de protozoos en el rumen de ovejas y en fermentadores Rusitec.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio *in vivo* se llevó a cabo utilizando cuatro ovejas fistuladas en el rumen, 16 fermentadores Rusitec y 4 dietas que consistieron en heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado en proporción 70:30 (AL70 y GR70) y 30:70 (AL30 y GR30). Cada oveja recibió las 4 dietas en un diseño de cuadrado Latino 4 x 4 administradas a un nivel de 55 g/kg peso vivo^{0,75} para minimizar la selección. Tras 12 días de adaptación, se muestreó el fluido ruminal inmediatamente antes de la administración del alimento los días 13 y 14, y 5 ml de fluido ruminal se mezclaron con 5 ml de una solución fijadora (35% de formaldehído) para el posterior recuento de protozoos.

Para la prueba *in vitro* se dispuso de ocho ovejas fistuladas en el rumen. Dos ovejas recibieron cada una de las cuatro dietas. El día 1 se inocularon los 4 fermentadores de cada tratamiento con contenido ruminal (líquido y sólido) procedente de las dos ovejas que recibían la dieta correspondiente. Cada fermentador recibió diariamente 30 g de dieta administrados a las 9:00 h en el interior de dos bolsas de nailon (forraje y concentrado por separado). Los tiempos de retención fueron de 48 y 24 horas para el forraje y el concentrado, respectivamente, y el flujo de la fase líquida fue de 736,94 ml/día (tasa de dilución de 5,12%/h). Las muestras para el recuento de protozoos fueron tomadas del contenido del fermentador inmediatamente antes de la administración del alimento los días 13 y 14. Los protozoos se contaron por duplicado utilizando una cámara Hausser Nageotte Bright-Line (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) y se clasificaron en subfamilias según Dehority (1993). Cuando el coeficiente de variación fue mayor del 10% se repitió el recuento. Los resultados se analizaron independientemente para cada sistema de fermentación. En ambos casos, los factores analizados fueron la relación F:C, el tipo de forraje (FOR) y la interacción de ambos. El modelo utilizado para el análisis de los resultados *in vivo* incluyó la oveja como efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En concordancia con lo observado por Abe et al. (1972), no existió un efecto significativo sobre el número de protozoos pertenecientes a la familia Isotrichidae del tipo de forraje ($P=0,63$) ni de la relación F:C ($P=0,78$) en el rumen de las ovejas (Tabla 1), mientras que en los fermentadores esta familia desapareció al incubar dietas con un 70% de concentrado. Tanto en el rumen como en los fermentadores se observó un efecto ($P=0,003$ y $0,03$,

respectivamente) del tipo de forraje sobre los Entodiniinae, siendo más numerosos con las dietas que contenían AL en las ovejas y con las que contenían GR en los fermentadores. In vivo, la subfamilia Diplodiniinae presentó poblaciones mayores ($P<0,001$) en las dietas con un 70% de forraje, sin diferencias debidas al tipo de forraje ($P=0,55$), mientras que en los fermentadores esta subfamilia no se detectó cuando se administraron dietas con un 70% de concentrado. Ni la relación F:C ($P=0,10$) ni el tipo de forraje ($P=0,14$) afectaron a los Ophryoscolecinae en el rumen, mientras que en los fermentadores este grupo desapareció completamente, posiblemente debido a su elevado tiempo de regeneración (Dehority, 2004).

Tabla 1. Concentraciones de protozoos ($\times 10^3/\text{mL}$) en el fluido ruminal de ovejas y fermentadores Rusitec que recibían dietas con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado en proporciones de 70:30 (70) o 30:70 (30).

	Dieta				EEM ²	Efecto ($P =$) ¹		
	AL70	GR70	AL30	GR30		F:C	FOR	F:C x FOR
Ovejas								
Isotrichidae	48,5	48,1	50,7	58,2	12,17	0,63	0,78	0,75
Entodiniinae	1092 ^{bc}	676 ^a	1317 ^c	896 ^{ab}	101,2	0,06	0,003	0,98
Diplodiniinae	40,4 ^{ab}	19,4 ^a	71,2 ^{bc}	78,4 ^c	11,17	<0,001	0,55	0,24
Ophryoscolecinae	8,30	2,31	22,9	9,61	5,965	0,10	0,14	0,56
Total	1189 ^{bc}	746 ^a	1462 ^c	1042 ^b	113,9	0,03	0,004	0,92
Isotrichidae (%)	4,08 ^{ab}	6,45 ^b	3,46 ^a	5,59 ^{ab}	1,04	0,24	0,04	0,72
Entodiniinae (%)	91,7	90,6	90,1	85,9	2,02	0,22	0,15	0,61
Rusitec								
Isotrichidae	0,17 ^b	0,07 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	0,036	0,009	0,20	0,20
Entodiniinae	6,63 ^{ab}	8,82 ^b	3,11 ^a	7,96 ^{ab}	1,35	0,15	0,03	0,31
Diplodiniinae	0,17 ^c	0,07 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,20	<0,001	0,03	0,03
Ophryoscolecinae	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-
Total	6,97 ^b	8,96 ^b	3,11 ^a	7,96 ^b	1,36	0,11	0,03	0,27
Isotrichidae (%)	2,44 ^b	0,78 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	0,54	0,008	0,16	0,16
Entodiniinae (%)	95,1 ^a	98,4 ^{bc}	100 ^c	100 ^c	0,53	<0,001	0,03	0,03

^{a, b, c} dentro de cada fila, los valores con diferente superíndice difieren ($P<0,05$).

¹ F:C: relación forraje:concentrado; FOR: tipo de forraje.

² error estándar de la media.

De acuerdo con resultados previos (Abe et al., 1981; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009), el número total de protozoos en el rumen fue mayor en las dietas con un 70% de concentrado ($P=0,03$), con valores superiores para AL que para GR ($P=0,004$). Por el contrario, el número de protozoos en los fermentadores fue mayor para las dietas que contenían GR ($P=0,03$) en comparación con las que contenían AL, y no se vio afectado por la relación F:C ($P=0,11$). La proporción de Isotrichidae en el rumen de las ovejas fue mayor con las dietas con GR que con las que contenían AL (valores medios de 3.77 y 6.02%, respectivamente). El porcentaje de Entodiniinae en las ovejas no fue afectado por ninguno de los dos factores, mientras que en los fermentadores ambos influyeron significativamente ($P<0,001$ y $0,03$ para la relación F:C y tipo de forraje, respectivamente) alcanzando proporciones del 100% con las dietas con 70% de concentrado. En el rumen no existió ninguna interacción entre la relación F:C y el tipo de forraje, pero en los fermentadores se observaron interacciones para los Diplodiniinae ($P=0,03$) y el porcentaje de Entodiniinae ($P=0,03$).

Los resultados obtenidos indican que los fermentadores no reprodujeron los cambios en las poblaciones de protozoos observados in vivo cuando se administraron las diferentes dietas. Una posible causa de las diferencias observadas es el menor número de protozoos presente en los fermentadores, ya que los grupos con mayores tiempos de generación (Isotrichidae,

Diplodiniinae, Ophryoscolecinae) son arrastrados de forma selectiva fuera del sistema a medida que transcurren los días de incubación (Abe y Kumeno, 1973; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Carro et al., 1995). En el rumen, las poblaciones de protozoos se mantienen estables en el tiempo pese a las fluctuaciones diarias relacionadas con la administración de alimento y el ritmo de paso de la fase sólida y líquida (Abe et al., 1981). Algunos protozoos tienden a asociarse a la fracción fibrosa del alimento y a las zonas dañadas de las fibras vegetales. Esto podría explicar la ausencia de ciertos protozoos en los fermentadores que recibieron las dietas con 70% de concentrado.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL-2004-04755-CO2-01/GAN financiado por el M.E.C. M.E. Martínez disfruta de una beca F.P.U. del M.E.C. (AP2005-1797).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M., Kumeno, K. 1973. *J. Anim. Sci.* 36: 941-948.
- Abe, M., Shibui, H., Iriki, T., Kumeno, F. 1972. *Br. J. Nutr.* 29: 197-202.
- Abe, M., Iriki, T., Tobe, N., Shibui, H. 1981. *Appl. Environm. Microbiol.* 41: 758-765
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2009. *J Anim Sci* 2009.87:622-631.
- Carro, M.D., Lebzien, P., Rohr, K. 1995. *Small Rum. Res.* 15: 113-119.
- Czerkawski JW, Breckenridge, G. 1977. *Br. J. Nutr.* 38: 371-384.
- Dehority, B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of ruminal ciliate protozoa. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Dehority, B. A. 2004. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 333-338.
- Hristov, A.N., Ivan, M., Rode, L.M., McAllister, T.A. 2001. *J.Anim. Sci.* 79: 515-524.

EFFECT OF FORAGE:CONCENTRATE RATIO AND TYPE OF FORAGE ON PROTOZOA POPULATION IN SHEEP RUMEN AND RUSITEC FERMENTERS

ABSTRACT: The aim of this study was to study the effects of forage:concentrate (F:C) ratio and type of forage in the diet on protozoa populations in sheep rumen and Rusitec fermenters. The four experimental diets had F:C ratios of 70:30 (HF) or 30:70 (HC) and either alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage. Protozoa counting was done on two consecutive days after 12 days of feeding the diets. Neither F:C ratio ($P=0.63$) nor the type of forage ($P=0.78$) affected Isotrichidae numbers in sheep. Entodiniinae represented 91.2 and 88.0% of total protozoa for HF and HC diets, respectively. Diplodiniinae and total protozoa numbers were greater ($P<0.001$ and 0.03) for HC diets compared to HF ones, but Ophryoscolecinae numbers were not affected ($P>0.10$) by any of the dietary factors. Protozoa were maintained in all fermenters, but their numbers were between 83 (HFGR) and 470 (HCAL) times lower than those in sheep rumen. Isotrichidae and Diplodiniinae protozoa disappeared from the fermenters fed the HC diets, but they were present in low numbers ($0.07-0.17 \times 10^3/\text{mL}$) in the ones receiving the HF diets. Ophryoscolecinae protozoa were completely washed out of all fermenters, probably due to their long generation time. Entodiniinae represented 100% of all protozoa in the fermenters fed the HC diets, indicating that no other protozoa were able to survive. In the fermenters fed HF diets, Entodiniinae were 95.1 and 98.4% of total protozoa for AL and GR diets, respectively.

Keywords: *protozoa, forage:concentrate, sheep, Rusitec*