

EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE TRES MÉTODOS DE DESLIGAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA FASE SÓLIDA DE LA DIGESTA RUMINAL EN FERMENTADORES RUSITEC

M.E. Martínez, M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido, C. Saro y M.D. Carro
Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León.

memarp@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La estimación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen requiere el uso de marcadores y el aislamiento de pellets microbianos representativos de las poblaciones ruminales. El aislamiento de las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) es complicado, ya que se necesita desligar las bacterias de las partículas de digesta y recuperar la mayor proporción posible de las que han sido desligadas. Existen varios estudios que han analizado la eficacia de diferentes tratamientos físico-químicos y mecánicos para desligar las BAS de la digesta (Whitehouse et al., 1994; Martín-Orúe et al., 1998; Ranilla y Carro, 2003), pero en ellos no se ha determinado la representatividad de los pellets obtenidos. Por ello, en este trabajo se determinó la eficacia de tres procedimientos de desligamiento (PD) y se comparó el perfil de las comunidades microbianas de los pellets con el de la digesta original.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando cuatro fermentadores tipo Rusitec que recibieron una dieta compuesta por heno de alfalfa (HA) y concentrado (CON) en proporción 30:70 (en materia seca; MS). El contenido en materia orgánica, proteína bruta y fibra neutro detergente de la dieta fue de 913, 173 y 376 g/kg MS respectivamente. El día 1 del experimento se inocularon los fermentadores con contenido ruminal procedente de 4 ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con la misma dieta. Cada fermentador recibió diariamente 9 g de HA y 21 g de CON, suministrados en dos bolsas de nailon que permanecieron dentro de los fermentadores durante 48 horas. Como marcador microbiano se infundió $^{15}\text{NHCl}$ de forma continua. Los días 12, 13 y 14, tras la retirada de las bolsas de los fermentadores, se mezclaron los contenidos de las bolsas con el mismo sustrato y se tomó una muestra para analizar N no amoniacal (NAN) y ^{15}N . El resto del material se sometió a tres métodos de desligamiento: 1) MET: el residuo se resuspensión en metilcelulosa al 0,1% en solución salina (0,9% NaCl), incubación 15 min en agitación a 39°C y mantenimiento a 4°C durante 24 h (Ranilla y Carro, 2003); 2) STO: suspensión en solución salina, tratado en el Stomacher durante 5 minutos a velocidad media y mantenimiento a 4°C durante 24 h; y 3) CSTO: congelación inmediata a -20°C durante 72 horas, descongelación a 4°C durante 24 h y tratamiento STO. En todos los tratamientos, pasadas 24 horas, el residuo se procesó para obtener un pellet bacteriano de BAS por centrifugación diferencial (Ranilla y Carro, 2003) en el que se determinó su contenido en MS, NNA y ^{15}N . El porcentaje de BAS desligadas se calculó como la pérdida de átomos de ^{15}N en exceso en la digesta sólida tras el tratamiento de desligamiento correspondiente. La proporción de BAS recuperadas de las desligadas se calculó a partir de los enriquecimientos en ^{15}N de la digesta antes y después del tratamiento de desligamiento y los de los pellets bacterianos. El porcentaje de recuperación total se calculó como: $((\% \text{ BAS recuperadas de las desligadas}) \times (\% \text{ desligamiento})) / 100$.

Los perfiles de las comunidades bacterianas de las digestas y los pellets se analizaron mediante SSCP (Polimorfismo conformacional de cadena simple). Tras la extracción del ADN de las muestras, éste se amplificó utilizando cebadores específicos del gen 16S rRNA (Hori et al., 2006), se purificó y se obtuvieron amplicones de cadena simple mediante digestión enzimática con λ -exonucleasa. La separación de los fragmentos de ADN de cadena simple se llevó a cabo en un gel de MDE al 0,625% en 1x TBE buffer durante 20 h a 20°C y 20 mA, utilizando un DCode System (Biorad, EEUU). La tinción del gel se realizó con

un kit de tinción de plata (Amersham Biosciences, Suecia). La imagen del gel se obtuvo mediante escáner y el patrón de bandas se analizó con el programa Quantity One® (BioRad, EEUU). Para la comparación de los perfiles de las comunidades microbianas en los pellets y en la digesta se utilizó como criterio la ausencia o presencia de bandas en los pellets en relación a las existentes en la digesta correspondiente, y el resultado se expresó como porcentaje de similitud. Los resultados obtenidos se analizaron según medidas repetidas en el tiempo. Los efectos del PD, sustrato, y la interacción PD x sustrato se consideraron fijos, y el día se consideró un efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, no observaron interacciones PD x sustrato significativas ($P=0,66$ a $0,96$) en ninguno de los parámetros analizados. Para los dos sustratos, STO produjo un porcentaje de desligamiento mayor ($P<0,05$) que MET, y CSTO produjo valores intermedios. Los valores de desligamiento obtenidos para HA fueron superiores ($P=0,04$) a los observados para CON, lo que podría indicar que las bacterias adheridas a las partículas de concentrado presentaron una mayor resistencia al desligamiento. El porcentaje de recuperación de las BAS desligadas fue superior al 90% y no se detectaron diferencias entre sustratos ($P=0,87$) ni PD ($P=0,84$). Estos valores son mayores que los obtenidos previamente por nuestro grupo tras aplicar diferentes PD a digesta procedente de fermentadores Rusitec (Ranilla y Carro, 2003), e indicarían una menor pérdida de bacterias en el proceso de centrifugación y asilamiento de los pellets. El tratamiento STO fue el método que resultó en la recuperación total de BAS más alta, con valores del 65,7 y 50,8% para HA y CON, respectivamente, si bien las diferencias con CSTO no fueron estadísticamente significativas ($P>0,05$). El tratamiento MET produjo valores de recuperación total menores del 60% para HA y de 45% para CON. Sin embargo, el porcentaje de similitud de las comunidades microbianas de los pellets MET con la digesta correspondiente fue mayor que el obtenido con STO, alcanzando valores superiores al 83% para los dos sustratos.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento de la digesta con STO fue el método más eficaz para desligar BAS, pero los porcentajes de similitud obtenidos señalan que MET fue el método que produjo un pellet más representativo. Estos resultados indicarían que el porcentaje de desligamiento y recuperación no deben ser utilizados como el único criterio para evaluar los procedimientos de desligamiento de las BAS. Aunque la eficacia de desligamiento de MET fue 8,7 y 14,4% menor que la del STO para HA y CON, respectivamente, los mayores porcentajes de similitud para la MET indicarían que puede ser considerado actualmente el método de elección para tratar la digesta en fermentadores Rusitec.

Tabla 1. Porcentajes (%) de desligamiento, recuperación y recuperación total de bacterias asociadas a la fase sólida de la digesta (BAS) desligadas de heno de alfalfa (HA) y concentrado (CON) incubados en fermentadores Rusitec tras aplicar tres procedimientos de desligamiento (PD), y porcentaje de similitud entre los perfiles de las comunidades microbianas en la digesta y en los pellets.

Item	Sustrato	PD ¹			EEM ²	Nivel de significación		
		MET	STO	CSTO		Sustrato	PD	Sustrato x PD
Desligamiento	HA	65,3 ^a	71,5 ^b	68,6 ^{ab}	1,46	0,04	0,004	0,77
	CON	48,6 ^a	56,8 ^b	53,4 ^{ab}				
Recuperación	HA	90,3	92,0	90,0	2,94	0,87	0,84	0,82
	CON	92,0	90,0	89,0				
Recuperación total	HA	58,9 ^a	65,7 ^b	61,6 ^{ab}	1,56	0,03	0,01	0,96
	CON	44,8 ^a	50,8 ^b	47,6 ^{ab}				
Porcentaje de similitud	HA	84,0 ^b	77,1 ^{ab}	72,5 ^a	2,80	0,91	0,02	0,66
	CON	86,4 ^b	82,4 ^b	67,8 ^a				

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

¹ ver texto para la descripción de los tratamientos.

² error estándar de la media.

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

- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. & Igarashi, Y. 2006. *J. Microbiol. Methods*. 66: 165-169.
- Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Zakraoui, F. & Castrillo, C. 1998. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 269-282.
- Ranilla, M.J. & Carro, M.D. 2003. *J. Anim. Sci.* 81: 537-544.
- Whitehouse, N.L., Olson, V.M., Schwab, C.G., Chesbro, W.R., Cunningham, K.D. y Lykos, T. 1994. *J. Anim. Sci.* 72: 1335-1343.

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE EVALUATION OF THREE PROCEDURES FOR DETACHING SOLID-ASSOCIATED BACTERIA FROM RUMINAL DIGESTA IN RUSITEC FERMENTERS

ABSTRACT: Three detachment procedures (DP) were evaluated for their ability to remove solid-associated bacteria (SAB) from alfalfa hay (AH) and concentrate (CON) digesta in Rusitec fermenters fed a 30:70 alfalfa hay:concentrate diet. ¹⁵NH₄Cl was used to label bacterial biomass, and PCR-SSCP analysis of the 16S ribosomal DNA was used to analyze the similarity between bacterial communities attached to the substrate and those in the pellet obtained after each DP. Treatments were: 1) MET: digesta was incubated with saline solution containing 0.1% methylcellulose (38°C, 15 min); 2) STO: residues were mixed with cold saline solution and homogenised with a stomacher (230 rev/min, 5 min); 3) CSTO: residues were immediately frozen (-20°C, 72 h), thawed (4°C, 24 h), and treated as in STO procedure. Common to all treatments was storing at 4°C for 24 h after the treatment and homogenization before isolation of SAB. Although STO was the most effective method to detach ruminal microbes from both AH (71.5%) and CON (56.8%), MET produced pellets with greater similarity to the bacterial communities attached to the substrates (84.0 and 86.4% for AH and CON, respectively) and therefore could be considered the most appropriate DP method for treating digesta from Rusitec fermenters.

Keywords: detachment, ¹⁵N, ruminal microbes, PCR-SSCP