

MODIFICACIONES TÉCNICAS EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO: EFECTOS SOBRE LA POBLACIÓN DE PROTOZOOS Y LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Cabeza-Luna I¹., Carro M.D²., Muñoz-Martínez A¹, Molina-Alcaide E¹.

¹Estación Experimental del Zaidin (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada

²Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria. 28040 Madrid

molina@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Los sistemas in vitro de simulación de la fermentación ruminal constituyen herramientas muy útiles para el estudio de la función ruminal. El mantenimiento de poblaciones microbianas representativas de las existentes en el rumen de los animales es uno de los requisitos que deberían cumplir los sistemas in vitro, pero la disminución del número de protozoos en los fermentadores es un hecho bien constatado (Moumen et al., 2009; Martínez et al., 2011). Dado el importante papel que los protozoos desempeñan en la función ruminal, el diseño de modificaciones técnicas que permitan mantener estas poblaciones en fermentadores supondría un importante avance para su utilización en el estudio del ecosistema ruminal. El objetivo del presente trabajo fue analizar dos modificaciones técnicas para mejorar la retención de los protozoos en fermentadores de flujo continuo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo 2 series de incubación de 14 días de duración cada una con 6 fermentadores de flujo continuo. En cada serie de incubación se asignaron al azar dos fermentadores a cada uno de los tratamientos experimentales: CON (control; sin modificaciones), ES (esponja situada en la salida del efluente de los fermentadores) y FIL (filtro formado por dos capas de nylon de 50 µm de tamaño de poro y situado en la salida del efluente). Se utilizaron cuatro ovejas fistuladas en el rumen como donantes de inóculo ruminal. Los animales recibieron una dieta constituida por heno de alfalfa y concentrado en proporción 50:50, administrada una vez al día. Tras 10 días de adaptación a la dieta se tomó contenido ruminal de las ovejas en ayunas, se mezcló, se filtró a través de 4 capas de gasa y se introdujeron 700 ml del filtrado en cada uno de los fermentadores. El flujo de saliva fue de 40 ml/h y se mantuvo constante el flujo de CO₂. Cada fermentador recibió diariamente 30 g la misma dieta que recibían las ovejas. El pH del contenido de los fermentadores se midió dos veces al día, durante todos los días de incubación. Los días 2, 6, 10 y 14 de cada serie de incubación se tomaron muestras de los efluentes para analizar las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. Adicionalmente, se tomaron muestras (10 ml) del contenido de los fermentadores, que se diluyeron en 10 ml de formaldehído para el recuento de protozoos. A una alícuota de 1 ml de la disolución anterior se añadieron 5 µl de una solución de verde malaquita, se dejó reposar la mezcla durante 12 horas y se añadió 1 ml de glicerol como fijador. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su recuento. El recuento se realizó por visualización directa en microscopio óptico y se diferenció entre protozoos entodiniomorfos y holotricos (Dehority, 1993). Se hizo el conteo de cada muestra por duplicado y si la variabilidad era mayor del 10% se realizaba otro recuento. Los datos se analizaron mediante ANOVA (PROC MIXED del paquete estadístico SAS) utilizando un modelo de medidas repetidas en el tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento experimental no afectó ($P > 0,10$) al número de protozoos, a las concentraciones de amoníaco y de ácidos grasos volátiles (AGV) ni a la relación acético/propiónico (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución durante el período de incubación de la población de protozoos y de la concentración de amoníaco y ácidos grasos volátiles (AGV) en fermentadores de flujo continuo sin modificaciones técnicas (CON) y provistos de una esponja (ES) y de un sistema de filtros (FIL)

	TR	Tiempo (T; días)				Probabilidad (P =)			
		2	6	10	14	eem	TR	T	TRxT
Protozoos ($\times 10^3/\text{ml}$)									
Total	CON	62,9 ^b	22,2 ^a	13,2 ^a	9,3 ^a	7,17	0,83	<0,001	0,93
	ES	64,3 ^b	19,2 ^a	16,6 ^a	15,5 ^a				
	FIL	58,2 ^b	20,4 ^a	17,3 ^a	19,5 ^a				
Entodiniomorfos	CON	56,4 ^b	18,9 ^a	11,6 ^a	8,5 ^a	6,67	0,82	<0,001	0,96
	ES	49,8 ^b	17,1 ^a	14,6 ^a	14,8 ^a				
	FIL	53,1 ^b	18,4 ^a	15,6 ^a	18,0 ^a				
Holotricos	CON	6,50 ^b	3,30 ^a	1,67 ^a	0,85 ^a	1,58	0,21	<0,001	0,41
	ES	4,50 ^b	2,10 ^a	1,98 ^a	0,70 ^a				
	FIL	5,08 ^b	2,00 ^a	1,65 ^a	1,50 ^a				
pH	CON	6,49 ^b	6,14 ^a	6,10 ^a	6,08 ^a	0,037	0,56	<0,001	0,61
	ES	6,53 ^c	6,27 ^b	6,11 ^a	6,12 ^a				
	FIL	6,54 ^b	6,25 ^a	6,16 ^a	6,20 ^a				
Amoníaco (mg/100 ml)	CON	42,0 ^c	36,8 ^b	32,0 ^a	29,0 ^a	1,65	0,19	<0,001	0,54
	ES	42,4 ^c	31,2 ^b	26,2 ^a	26,7 ^a				
	FIL	40,1 ^c	32,7 ^b	27,4 ^a	26,9 ^a				
Total AGV (mmol/l)	CON	53,7 ^a	72,3 ^b	77,7 ^b	73,0 ^b	2,71	0,52	<0,001	0,79
	ES	53,8 ^a	73,7 ^b	75,0 ^b	72,1 ^b				
	FIL	50,6 ^a	72,0 ^b	68,8 ^b	71,2 ^b				
Acético (mol/100 mol)	CON	60,7 ^b	55,0 ^a	54,4 ^a	55,1 ^a	0,69	0,24	<0,001	0,55
	ES	60,5 ^b	56,1 ^a	56,0 ^a	56,7 ^a				
	FIL	61,3 ^b	54,6 ^a	56,0 ^a	56,2 ^a				
Propiónico (mol/100 mol)	CON	18,9 ^a	22,9 ^b	23,5 ^b	23,4 ^b	0,43	0,97	<0,001	0,96
	ES	18,9 ^a	22,5 ^b	23,3 ^b	23,3 ^b				
	FIL	18,8 ^a	23,2 ^b	23,0 ^b	23,4 ^b				
Butírico (mol/100 mol)	CON	13,8 ^a	15,2 ^b	14,7 ^b	14,6 ^{ab}	0,31	0,45	<0,001	0,54
	ES	13,7	14,1	13,8	13,6				
	FIL	13,6 ^a	15,1 ^b	14,3 ^{ab}	14,0 ^a				
Otros AGV (mol/100 mol)	CON	6,7 ^a	6,9 ^{ab}	7,4 ^b	6,9 ^{ab}	0,22	0,10	0,019	0,22
	ES	6,9	7,3	6,9	6,5				
	FIL	6,3 ^a	7,1 ^b	6,7 ^{ab}	6,4 ^a				
Ac/Pr (mol/mol)	CON	3,24 ^b	2,41 ^a	2,32 ^a	2,31 ^a	0,077	0,54	<0,001	0,86
	ES	3,23 ^b	2,49 ^a	2,42 ^a	2,46 ^a				
	FIL	3,29 ^b	2,36 ^a	2,44 ^a	2,42 ^a				

¹ error estándar de la media

a, b, c en la misma fila, los valores con diferente letra difieren ($P < 0,05$)

Tanto los protozoos entodiniomorfos como los holotricos disminuyeron ($P < 0,05$) a partir del día 2 de incubación, al igual que ocurrió con el pH, las concentraciones de amoníaco, acético y butírico y la relación acético/propionico. Por el contrario, las concentraciones de AGV totales y de propiónico aumentaron a partir del día 2 de muestreo, pero se mantuvieron sin variaciones ($P > 0,10$) a partir del día 6 de incubación hasta el final del experimento. No se observaron interacciones tratamiento x tiempo de muestreo ($P = 0,22$ a $0,96$) en ningún parámetro. El descenso de los protozoos en los primeros días de incubación en fermentadores de flujo continuo se observó también en un trabajo previo de nuestro grupo en el que los fermentadores se alimentaron con dietas basadas en heno de alfalfa (Moumen et al., 2009). Karnati et al. (2009) utilizaron un sistema de filtros en fermentadores de flujo continuo, que recibían una dieta 70:30 forraje:concentrado, y lograron mantener concentraciones de protozoos ($17\text{--}22 \times 10^3/\text{mL}$) similares a las observadas en el presente estudio. Si bien las diferencias en el número de protozoos entre tratamientos experimentales no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$), hay que señalar que el último día de muestreo la concentración de protozoos en los fermentadores con esponja y con filtros fue 1,7 y 2,1 veces mayor, respectivamente, que en los fermentadores sin modificaciones técnicas, si bien las concentraciones fueron menores que las observadas en ovejas que recibían dietas similares (Martínez et al., 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dehority, B.A. 1993. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Karnati, S.K.R, Z. Yu, J.L. Firkins. 2009. J. Dairy. Sci.92: 3861-3873.
- Moumen, A., D.R. Yáñez-Ruiz, M.D. Carro, y E. Molina-Alcaide. 2009. Options Méditerranéennes, Serie A, 85: 303-306.
- Martínez, M.E., M.J. Ranilla, S. Ramos, M.L. Tejido, M.D. Carro. 2011. Options Méditerranéennes, Serie A 99: 97-102.
- Martínez, M.E., M.J. Ranilla, M.L. Tejido, C. Saro, M.D. Carro. 2010. J. Dairy. Sci.93: 3699-3712.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL2011-22628 financiado por el MICINN. Se agradece el apoyo técnico de Dña. Julia Fernández Yepes.

TECHNICAL MODIFICATIONS IN CONTINUOUS CULTURE FERMENTERS: EFFECTS ON PROTOZOA POPULATIONS AND FERMENTATION

ABSTRACT. The objective of this work was to study the effect of technical modifications (sponge and filters) in continuous-culture fermenters on the number of protozoa and ruminal fermentation parameters. The effect of the fermentation time was studied as well. Six fermenters fed a 50:50 alfalfa hay:concentrate diet, inoculated with rumen liquor from sheep fed the same diet, were used in two incubation runs of 14 days each. Protozoa numbers of both Entodinia and Holotricha genera and concentrations of VFA and ammonia were determined on days 2, 6, 10 and 14 after inoculation. No effects ($P > 0,10$) of technical modifications were observed either in protozoa numbers or fermentation parameters, although on day 14 protozoa numbers in fermenters provided with sponge and filters were 1.7 and 2.1 times, respectively, higher than those in control fermenters. On the contrary, incubation time affected ($P < 0,001$) all the studied parameters. No treatment x sampling time interaction ($P = 0,22$ to $0,96$) was observed. It is concluded that technical modifications used in this study do not allow for protozoa population maintenance in continuous-culture fermenters.

Keywords: continuous-culture fermenters, protozoa, ruminal fermentation, technical modifications