

EFECTO DE LA POBLACION MICROBIAL SOBRE LAS PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO E IN SITU

L.N. Sánchez¹, A. Wills² y J. Figueroa³

Resumen

La digestibilidad in situ del tamo de cebada fue evaluada en el rumen de tres ovejos alimentados con diferentes dietas. El trabajo se desarrolló dentro de un diseño de Cuadrado Latino 3 x 3 con arreglo de parcelas. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las diferentes dietas, a partir de la hora 9 de incubación, presentándose mayor digestibilidad en las pruebas realizadas en el rumen de los ovejos que consumieron tamo de cebada. Estos resultados sugieren que la población microbial desarrollada en el rumen como efecto de la dieta consumida por el animal hospedero, puede afectar, al menos en forrajes con un alto contenido de fibra (tamo de cebada en este caso), los resultados obtenidos en pruebas de digestibilidad in vitro o in situ.

Introducción

El conocimiento de la digestibilidad de la dieta ofrecida en rumiantes permite estimar el valor nutritivo ya sea de la dieta completa o de alguno de los nutrientes que la componen. Si bien es cierto esta determinación no provee un dato exacto sobre el aprovechamiento del alimento por parte del animal, sí es una herramienta importante que permite hacer una valoración nutricional (Merchen, 1988).

Los métodos más conocidos para determinar la digestibilidad en rumiantes son: El método convencional, el cual se basa en la diferencia entre la cantidad de alimento o nutriente consumido por el animal y la cantidad de éstos excretada. Sin embargo, esta prueba requiere de un mayor manejo animal debido al uso de arneses o jaulas metabólicas que permitan la recolección total de las heces, motivo por el cual no es muy utilizado (Merchen, 1988). De otra parte el uso de sustancias inertes como marcadores, ya sea añadidas a la dieta o administradas oral o intraruminalmente (marcadores externos), o materiales no digeribles presentes naturalmente en el alimento (marcadores internos) (Merchen, 1988), hacen del método anterior una prueba más práctica, debido a que no es necesaria la recolección total de heces y las muestras pueden ser tomadas directamente del recto a espacios de tiempo determinados por el investigador. No obstante, el uso de marcadores hace que este tipo de pruebas incrementen su costo y requieran de un mayor manejo de técnicas de laboratorio.

Dos metodologías más prácticas para la determinación de la digestibilidad son utilizadas con mayor frecuencia en investigaciones en nutrición de rumiantes. La digestibilidad in situ (Romero, 1990), la cual consiste en la incubación del material a evaluar en el rumen de animales canulados, durante diferentes lapsos de tiempo; se coloca en bolsas de nylon con un tamaño de poro que permite el ingreso de microorganismos pero no la salida del material. Esta técnica se basa en la desaparición del material

1. Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia. Dg. 41 No. 49 – 58 Santafe de Bogotá
2. Zootecnista. MSc. Profesor Asistente. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490
3. Lic. Microbiología. MSc. Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490

incubado como efecto de la degradación microbial en el rumen y los resultados son calculados por la diferencia de peso en materia seca (MS) entre el material incubado y el material presente en la bolsa luego de la incubación. La digestibilidad in vitro (Judkins, et al., 1990; Marinucci, et al., 1992) por su parte, se desarrolla en tubos de ensayo al baño de maría a 39°C, en los cuales, bajo atmósfera de CO₂, simulando las condiciones del tracto digestivo del animal, se incuba el material de estudio con fluido ruminal fresco recolectado del rumen de animales canulados. Los resultados obtenidos son calculados por medio de la diferencia en MS entre el peso del material incubado y el peso del material presente en el filtrado de la incubación corregido por el peso de un blanco que asume la cantidad de material sólido presente en el fluido ruminal utilizado. Este método determina la degradación del material por parte de los microorganismos presentes en el fluido ruminal.

El desarrollo de las poblaciones microbiales en el rumen está íntimamente relacionado con el tipo de alimento (dieta) consumido por el animal hospedero, produciendo variaciones en la microbiota tanto de tipo cualitativo como cuantitativo entre especies (Leedle, et al., 1982). Las variaciones cualitativas están relacionadas con la especificidad de las diferentes especies microbiales hacia cierto sustrato, lo cual favorece su desarrollo y por ende su incremento numérico. De igual manera, los productos finales de la fermentación ruminal varían dependiendo del sustrato y tienen un efecto directo sobre el pH del fluido ruminal y este a su vez afecta la población microbial, en especial la población celulolítica (Orpin, 1976; Orpin, 1977; Ørskov y Ryle, 1990).

Se planteó el interrogante con respecto a la posibilidad de que la especificidad de la población microbial desarrollada en el rumen de animales que hagan parte de pruebas de digestibilidad in situ o animales donantes del fluido ruminal en pruebas de digestibilidad in vitro, como efecto de la dieta consumida, no esté capacitada enzimáticamente para degradar el material a evaluar.

Materiales y Métodos

Diseño Experimental. Los resultados fueron analizados en un diseño de Cuadrado Latino 3 x 3 con arreglo de parcelas, donde períodos y animales correspondieron al Cuadrado Latino, dieta a parcela principal, dinámica a subparcela y hora de muestreo a sub-subparcela. Adicionalmente se realizó una prueba de comparación múltiple por medio del método de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey (Steel and Torrie, 1980).

De acuerdo con el diseño, la fase experimental se dividió en tres períodos, en cada uno de los cuales se realizaron 2 dinámicas, cada dinámica comprendió muestreos sucesivos durante el día. Las horas de muestreo fueron 0 (antes de alimentar), 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 y 48.

Animales y Dietas. Como unidades experimentales se utilizaron tres machos ovinos enteros, de raza criolla, de 9-24 meses de edad, con fístula ruminal y cánula permanente. Los animales permanecieron estabulados en corrales individuales en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la

Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá a 2.630 m.s.n.m., y fueron alimentados con 1.500 g en base fresca de la dieta correspondiente una vez al día. En cada período se realizó una etapa de adaptación a la dieta de 14 días. Las dietas suministradas fueron, dieta 1-Heno de Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), dieta 2-Heno de Angleton (*Dichanthium aristatum*) y dieta 3-tamo de cebada (*Hordeum vulgare*) más un suplemento constituido por una mezcla de 200 g de melaza disueltos en 300 ml de agua, 19 g de urea y 1 g de flor de azufre (Tabla 1).

Prueba de digestibilidad. La técnica utilizada en esta prueba es descrita por Romero (1990), basada en la técnica utilizada por Ørskov et al. (1980).

Se utilizaron bolsas de nylon con 9 cm de longitud y 6 cm de ancho, con un tamaño de poro de 50 µm. Dentro de cada bolsa se depositó 1 g de tamo de cebada molido y cernido en una criba de 1 mm. Todas las bolsas fueron introducidas en el rumen y extraídas en cada hora de muestreo. Cada bolsa fue lavada con agua corriente a fin de retirar el exceso de contenido ruminal. Luego de las 24 horas

ANALISIS QUIMICO DE LAS DIETAS UTILIZADAS*

DETERMINACION	HENO DE KIKUYO	HENO DE ANGLETON	TAMO DE CEBADA
Materia Seca %	85.00	89.98	90.90
Proteína Cruda	17.10	3.95	5.18
Extracto Etéreo	2.02	1.83	0.02
Fibra en Detergente Neutro	59.12	77.21	78.42
Fibra en Detergente Acido	31.65	46.21	55.28
Hemicelulosa	27.46	30.99	23.14
Lignina	4.31	7.10	9.10
Silice	0.09	0.08	3.72

Tabla 1.

* Los datos reportados son porcentajes con base en MS.

de incubación el grupo de bolsas fue lavado bajo flujo continuo de agua hasta obtener un agua de lavado totalmente limpia. Las bolsas fueron secadas a 100°C durante 24 horas. Igual procedimiento se realizó con las bolsas correspondientes a las horas 36 y 48 de incubación, en forma conjunta.

Resultados y Discusión

El porcentaje de digestibilidad para cada una de las horas de incubación se reportan en la Tabla 2. Se puede observar que los datos de digestibilidad del tamo de cebada en los animales consumiendo heno de Angleton, no son consistentes, debido posiblemente a la baja calidad de este forraje reflejada en los datos de la Tabla 1, lo cual aparentemente redujo la población microbiana (determinado por observación al microscopio del fluido ruminal proveniente de los animales que consumían esta dieta).

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir de la hora 9 de incubación, presentándose en la dieta de Tamo de Cebada los mayores porcentajes de digestibilidad, que comparados con la dieta 1 (heno de Kikuyo), representan, en promedio, un 42% más de degradación del tamo de Cebada. Estos datos sugieren que la población microbiana desarrollada en los animales consumiendo tamo de cebada, posee una mayor capacidad

enzimática que le permite una mejor degradación de este sustrato.

Adicionalmente, se trabajaron todos los datos dentro del modelo matemático de Ørskov ($Y = a + b(1 - e^{-ct})$) (Ørskov et al., 1980) con el fin de determinar las diferencias entre las dietas 1 y 3 en las fracciones componentes del modelo. Los resultados de este análisis se encuentran en la Tabla 3, donde se puede observar que existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la fracción potencialmente degradable (b) siendo mayor en la dieta 3, lo que sugiere, al tratarse de incubaciones del mismo sustrato, la presencia de un factor externo al sustrato que favorece en la dieta 3 su digestibilidad, lo cual reafirmaría la teoría respecto a la especificidad de la microbiota desarrollada en este sustrato.

En el caso de la población de hongos anaeróbicos ruminales (HAR), los cuales son responsables del 40 – 70% de la degradación del material vegetal ingerido (Li y Heath, 1993), se conoce que su actividad enzimática es catábolito regulada en el medio (Morrison et al., 1990) por cuanto se expresa dependiendo del sustrato presente. La presencia de glucosa en medios de cultivo puede inhibir la degradación de celulosa por parte de *N. patriciarum* y el uso de xylosa como fuente de carbono por parte de *N. frontalis* (Theodorou et al. 1988). Adicionalmente existe una amplia evidencia acerca del efecto de la dieta sobre la población fúngica (Akin, 1987; Akin y Windham, 1989; Elliot et al., 1987; Fonty et al., 1989; Fonty y Joblin, 1991) que en caso de ser deprimidas (la población o su actividad enzimática), se

DIGESTIBILIDAD *in situ* DE LA MS DEL TAMO DE CEBADA EN DIFERENTES HORAS DE INCUBACION EN OVINOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS

HORA	HENO DE' KIKUYO	HENO DE' ANGLETON	TAMO DE' CEBADA
0	11.79(a) ± 1.40	12.00(a) ± 0.95	12.45(a) ± 1.97
1	11.01(a) ± 1.40	10.98(a) ± 1.45	11.68(a) ± 1.28
2	10.65(a) ± 1.21	11.75(a) ± 0.93	12.29(a) ± 1.74
3	11.26(a) ± 1.15	11.29(a) ± 0.84	12.51(a) ± 1.90
6	14.89(ab) ± 2.99	11.24(a)* ± 2.30	16.89(b) ± 3.41
9	16.55(b)* ± 1.39	11.46(a)* ± 2.42	21.33(c)* ± 3.43
12	18.28(bc)* ± 2.76	11.78(a)* ± 3.77	24.65(c)* ± 4.55
15	22.15(ce)* ± 2.02	12.84(a)* ± 3.92	29.90(d)* ± 3.55
18	23.60(ef)* ± 3.20	14.95(a)* ± 5.12	33.18(de)* ± 2.08
21	25.52(ef)* ± 3.59	14.95(a)* ± 4.02	37.17(ef)* ± 4.02
24	27.09(fg)* ± 3.64	16.85(a)* ± 6.09	39.85(f)* ± 2.18
36	30.36(gh)* ± 2.81	18.66(a)* ± 9.21	45.44(g)* ± 1.95
48	33.82(h)* ± 3.84	24.80(a)* ± 10.48	51.52(h)* ± 4.99

Tabla 2.

Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

* Indica diferencias significativas entre columnas ($P < 0.05$)

1. Los datos presentados en cada hora de muestreo son el promedio de seis datos correspondientes a 3 animales x 2 dinámicas.

FRACCIONES (a), (b), Y (c) DEL MODELO MATEMATICO DE ØRSKOV PARA LA DIGESTIBILIDAD DE LA MS DEL TAMO DE CEBADA EN DIFERENTES DIETAS

DIETA	a	b	c	a + b
Heno de Kikuyo	9.29	29.85 ^(a)	0.0374	39.15
Tamo de Cebada	8.71	58.41 ^(b)	0.0381	67.12

Tabla 3. Letras diferentes entre filas corresponden a diferencias significativas ($P < 0.05$)

deprimiría por ende la degradación de dietas altamente fibrosas. De otra parte, se han encontrado diferencias entre especies de HAR con respecto a su potencial de degradación (Sijtsma y Tan, 1993; Teunissen, 1991), lo cual indica que a pesar de estar presentes en una dieta específica, puede la especie presente, no poseer el potencial enzimático necesario para degradar otro tipo de sustrato.

De la misma forma, la población de bacterias fibrolíticas varía cuantitativa y cualitativamente

dependiendo de las características de la dieta base (Steward, 1991). En el caso de dietas altas en carbohidratos solubles, el pH del contenido ruminal llega a ser inferior a 6, lo que afecta el crecimiento de las especies fibrolíticas por la acumulación intracelular de aniones, disminuyendo la actividad degradativa de la fibra (Russell y Willson, 1996). Este efecto parece ser más importante en trabajos realizados in vitro que en los in vivo, probablemente por la mayor posibilidad de selección de las especies fibrolíticas más tolerantes a pH bajos, que se da en las pruebas in vivo (Van Gylswyk y Schwartz, 1984). Cuando la dieta está compuesta por sustratos altamente fibrosos, las condiciones ambientales ruminales serán adecuadas para el desarrollo de las especies con mayor potencial celulolítico, esto es, pH adecuado y disponibilidad del sustrato específico (celulosa y celulodextrinas) (Weimer, 1996).

Conclusiones

Las variaciones en la digestibilidad *in situ* en dietas fibrosas sugieren que las características de la dieta

base deben ser tenidas en cuenta al momento de realizar este tipo de pruebas, debido a que los resultados arrojados pueden estar sub o sobrevalorando el contenido nutricional del material evaluado.

A pesar de no haberse realizado esta determinación utilizando la prueba de digestibilidad in vitro,

debido a sus características es que hemos hecho mención de ella.

Es necesario realizar mayores trabajos a este respecto, involucrando mayor número de dietas y substratos, lo cual nos permitirá dilucidar en nuestro medio, con mayor exactitud, el efecto de la microbiota ruminal sobre este tipo de pruebas. **RMVZ**

Bibliografía

1. Akin DE. Association of rumen fungi with various farages grasses. *Animal Feed Sci and Tech.* 16:273-285. 1987.
2. Akin DE. and Windham WR. Influence of diet in rumen fungi. In: J.V. Nolan, R.A. Leng and D.I. Demeyer, The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Proceedings of an International Seminar Held at the University of New England, Armidale, Australia. Penambul Books. Armidale. NSW. pp. 75-81. 1989.
3. Elliot R., Ash AJ., Calderon-Cortés F., Northon BW. and Bauchop T. The influence of anaerobic fungi on rumen volatile fatty acid concentrations in vivo. *J Agric Sci.* 109:13-17. 1987.
4. Fonty G., Joblin KN. and Brownlee A. Contribution of anaerobic fungi to rumen functions. In: S. Hoshino, R. Onodera, H. Minato, H. Itabashi. The rumen ecosystem: The microbial metabolism and its regulation. Japan Scientific Societies Press. Japan. Pp. 73-81. 1989.
5. Fonty G. and Joblin KN. Rumen anaerobic fungi: Their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: T. Tesuda, Y. Sasaki and R. Kawashima. Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in ruminants. Porceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology. Sendai, Japon. pp. 655-680. 1991.
6. Judkins MB., Krysl LJ. and Barton RK. Estimating diet digestibility: A comparison of 11 techniques across six different diets fed to rams. *J Animal Sci.* 68:1405-1415. 1990.
7. Leedle JA., Bryant MP. and Hespell RB. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents in animals fed low - or high - forage diets. *Appl Environ Microbiol.* 44:402-412. 1982.
8. Li J. and Heath IB. Chytridiomycetous gut fungi of overlooked contributor to herbivore digestion. *Can J Microbiol.* 39:1003-1013. 1993.
9. Marinucci MT., Dehority BA. and Loerch SC. In vitro and in vivo studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *J Animal Sci.* 70:296-307. 1992.
10. Merchen NR. Digestion, absorbtion and excretion in ruminants. In: DC Church, The ruminal animal: Digestive physiology and nutrition. Waveland Press, Inc., Illinois, pp. 172-201. 1988.
11. Morrison M., Mackie RI. and Kistner A. Evidence that cellulolysis by an anaerobic ruminal fungus is catabolite regulated by glucose, cellobiose and soluble starch. *Appl Environ Microbiol.* 56:3227-3229. 1990.
12. Orpin CG. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas comunis*. *J Gen Microbiol.* 94:270-280. 1976.
13. Orpin CG. The rumen flagellate *Piromonas communis* life-history and invasion of plant material in the rumen. *J Gen Microbiol.* 99:107-117. 1977.
14. Ørskov ER., Hovell DB. and Mould F. The use of nylon technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop Animal Prod.* 5:195. 1980.
15. Ørskov ER. and Ryle M. Energy Nutrition in Ruminants. Elsevier Applied Science. pp. 114-115. 1990.
16. Romero F. Utilización de la técnica de digestion in situ para la caracterización de forrajes. En: ME. Rufz y A. Rufz. Nutrición de rumiantes: Guía Metodológica de Investigación. ALPA - IICA - Rispal. San José de Costa Rica. pp. 105-114. 1990.
17. Rusell JB. and Wilson DB. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J Dairy Sci.* 79:1503-1509. 1996.
18. Sijtsma L. and Tan B. Degradation and utilization of grass cell walls by anaerobic fungi isolated from yak, llama and sheep. *Animal Sci Tech.* 44:221-236. 1993.
19. Steel RGD. and Torrie JH. Principles and procedures of statistics. Second Edition. McGraw-Hill Book Company. 1980.
20. Steward CS. The rumen bacteria. In: JP. Jouany. Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. pp. 15-26. 1991.
21. Teunissen MJ., Op den Camp HJM., Orpin CG., Huis in 't Veld JHJ. and Vogels GD. Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and nonruminant herbivores during cultivation in a defined medium. *J Gen Microbiol.* 137:1401-1408. 1991.
22. Theodorou MK., Lowe SE. and Trinci AP.J. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *BioSystems.* 21:371-376. 1988.
23. Van Gylswyk NO. and Schwartz HM. Microbial ecology of the rumen of animals fed high-fibre diets. In: F.M.C. Gilchrist y R. I. Mackie. Herbivore nutrition. The Science Press (PTY) Ltd. South Africa. pp. 359-377. 1984.
24. Weimer PJ. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J Dairy Sci.* 79:1496-1502. 1996.