

UTILIZACIÓN DE ^{15}N Y BASES PURÍCAS COMO MARCADORES PARA ESTIMAR LA SÍNTESIS MICROBIANA *IN VITRO*

M.L. Tejido¹, M.D. Carro¹, M.J. Ranilla¹, S. López¹, M.J. Arín² y M.T. Díez²

¹ Dpto. de Producción Animal I, Universidad de León, 24071 León

² Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de León, 24071 León

INTRODUCCIÓN

Las dificultades que conlleva la determinación del crecimiento microbiano en el rumen de los animales ha hecho que muchos de los estudios sobre este tema se hayan realizado en condiciones *in vitro*. A pesar de ello, todavía no existe un método estandarizado que permita determinar la síntesis microbiana *in vitro*, y esta situación se complica por la falta de un marcador microbiano que cumpla todos requisitos para ser considerado "ideal". Dentro de los marcadores más utilizados se encuentran las bases purícas (BP) y el ^{15}N , y ambos son considerados por muchos autores como los marcadores de elección. Sin embargo, los resultados de los estudios que comparan ambos marcadores son contradictorios, ya que en algunos las BP sobrestiman la síntesis microbiana comparado con el ^{15}N , y en otros estudios la subestiman (Carro, 2001). El objetivo de este estudio fue comparar los resultados obtenidos con BP y ^{15}N cuando ambos se utilizan como marcadores microbianos para estimar la síntesis microbiana en condiciones *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del siguiente experimento se utilizó como sustratos almidón, celulosa y una mezcla de almidón-celulosa (50:50). Los sustratos (500mg) se incubaron en botellas de 125 ml a las que se añadieron 50 ml de una mezcla (1:4 v/v) de líquido ruminal y del medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970). Como inóculo se utilizó líquido ruminal procedente de 4 ovejas fistuladas en el rumen y alimentadas con heno de alfalfa y concentrado en proporción (70:30). El líquido ruminal se recogió 2 horas después de la administración de alimento y fue filtrado a través de 2 capas de nylon de 40 μm de poro. Al medio de cultivo se le añadió una disolución de ácido valérico, isovalérico e isobutírico y Na_2SO_3 para no limitar el crecimiento microbiano. Así mismo se añadió una solución de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como marcador microbiano. En cada bote de incubación se añadió 15 mg de N mediante 2 ml de una solución de amoníaco (AMO) o de una mezcla de amoníaco y proteína de soja (50:50; PROT). Cada sustrato se incubó con el líquido ruminal de cada una de las ovejas. Para cada sustrato, tratamiento nitrogenado y oveja se incubaron 9 botes a 39°C. Para el almidón el tiempo de incubación fue de 24 h, de 30 h para la mezcla de almidón-celulosa y de 36 h para la celulosa. Una vez finalizada la incubación el contenido de los 9 botes se homogeneizó mediante una batidora de varillas, y aproximadamente 300 g de la muestra fueron utilizados para obtener el pellet bacteriano mediante centrifugación diferencial. El resto de muestra (150 g) se liofilizó para obtener la digesta total. Sobre el pellet bacteriano y sobre la digesta total se analizó el contenido en N no amoniacal (NNA), ^{15}N y BP. Los

Trabajo financiado por la J.C.Y.L. (LE29/98 y LE38/01) y por la C.I.C.Y.T. (AGF98-0188)

análisis de ^{15}N se realizaron mediante espectrofotometría de masas y los análisis de BP mediante cromatografía líquida de alta eficacia.

El crecimiento microbiano se determinó mediante el uso de los marcadores: ^{15}N y bases púricas. Para ambos marcadores la estimación de la proporción de N de la digesta que es de origen microbiano se calculó dividiendo la relación marcador:N en la digesta por la relación marcador:N en el pellet bacteriano. La síntesis microbiana se calculó multiplicando la proporción de N microbiano por el contenido en NNA de cada bote. Los análisis de N^{15} en el pellet bacteriano y en la digesta se realizaron mediante espectrofotometría de masas y los análisis de bases púricas mediante HPLC.

Para cada sustrato, el efecto de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento microbiano y el efecto del marcador sobre la determinación del mismo se analizaron mediante una prueba de *t* de Student para el contraste de la igualdad de medias obtenidas a partir de observaciones pareadas. Adicionalmente, las relaciones entre los resultados obtenidos con los dos marcadores se estudiaron mediante análisis de correlación simple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de N microbiano estimada con ambos marcadores (Tabla 1) fue mayor ($P < 0,05$) cuando se empleó como fuente de nitrógeno la mezcla de amoníaco y proteína que al emplear amoníaco en el caso del almidón y del almidón-celulosa, pero no para la celulosa.

Tabla 1. Efecto de la fuente nitrogenada y del marcador microbiano (bases púricas (BP) y ^{15}N) sobre la determinación de la síntesis microbiana (mg N microbiano) en condiciones *in vitro*

Sustrato	Tratamiento nitrogenado	Marcador microbiano		BP vs ^{15}N (valor de P)
		BP	^{15}N	
Almidón	Amoníaco	21,41 ^a	17,94 ^a	0,150
	Proteína	23,68 ^b	19,10 ^b	0,110
	e.e.d. ¹	0,311	0,117	
Almidón + Celulosa	Amoníaco	21,39 ^a	14,53 ^a	0,001
	Proteína	22,70 ^b	15,82 ^b	0,002
	e.e.d. ¹	0,367	0,394	
Celulosa	Amoníaco	16,84	14,00	0,248
	Proteína	17,21	14,14	0,131
	e.e.d. ¹	0,962	0,127	

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

¹ error estándar de la diferencia

El empleo de BP para estimar el N microbiano condujo a valores mayores ($P < 0,01$) que los obtenidos utilizando ^{15}N al utilizar como sustrato la mezcla de almidón-celulosa. Para el resto de los sustratos también se observó un aumento numérico, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo ($P > 0,05$). Estos resultados están en línea con los obtenidos por Cecava et al. (1991) y Carro y

Cecava et al. (1991) y Carro y Miller (1999), quienes observaron una sobrestimación en el crecimiento microbiano estimado a partir de BP en comparación a los valores obtenidos con ^{15}N . Este hecho puede ser debido a que en el proceso de aislamiento del pellet bacteriano se produce la lisis de algunas células bacterianas. Dado que las BP se localizan exclusivamente en el interior de las bacterias, el proceso de lisis bacteriana puede determinar menores concentraciones de BP en el pellet aislado.

Cuando se analizaron de manera conjunta los valores obtenidos para los tres sustratos, se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre las estimaciones a partir de BP y de ^{15}N (Figura 1).

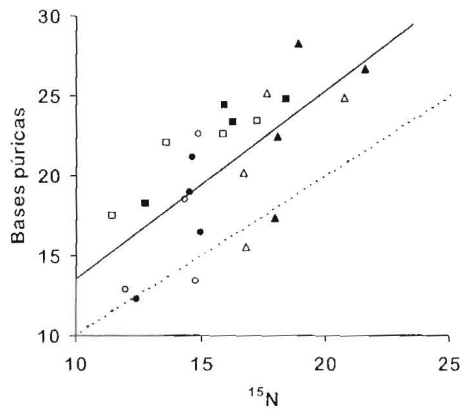


Fig. 1. Relación entre los valores de N microbiano obtenidos con ^{15}N y bases púricas (BP) como marcadores.

$$\text{BP} = 1,72 (\pm 4,208) + 1,182 (\pm 0,2610) \text{ } ^{15}\text{N}$$
$$r = 0,695; \text{RSD} = 3,26; P < 0,001$$

Almidón (Δ), almidón + celulosa ($\square$), celulosa (O). Los símbolos llenos corresponden al tratamiento con proteína y los vacíos al tratamiento con amoníaco.

Los resultados de este estudio muestran que los dos marcadores detectaron las mismas diferencias en la cantidad de N microbiano debidas a l tipo de fuente nitrogenada. A pesar de que los valores obtenidos con las BP fueron mayores que los estimados con ^{15}N , la relación obtenida entre ambos indicaría que tanto las BP como el ^{15}N pueden utilizarse para estudiar el efecto de diferentes factores sobre la producción de N microbiano *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carro, M.D. 2001. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales* (En prensa).

Carro, M.D. and Miller, E.L., 1999. *Proc. of the BSAS Winter Meeting 1999*. pp. 214.

Cecava, M.J., Merchen, N.R., Berger, L.L., Mackie, R.I. and Fahey Jr., G.C., 1991. *J. Anim. Sci.*, 69: 2230-2243.

Goering, M.K. and Van Soest, P.J. 1970. *Agric. Handb. n 379. Agric. Res. Serv., USDA*. Washington DC.