

## ESTUDIO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DURANTE 24 HORAS DE INCUBACIÓN EN EL SISTEMA ANKOM<sup>RF</sup>

Martínez, G., Abecia, L., Soto, E., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. y Yáñez-Ruiz, D. R.  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada.

[gonzalo.martinez@eez.csic.es](mailto:gonzalo.martinez@eez.csic.es)

### INTRODUCCIÓN

Un sistema ideal *in vitro* que simule la fermentación ruminal, debe permitir un crecimiento de los microorganismos similar al que ocurre en el rumen a lo largo del período de incubación considerado (Soto et al., 2009). Los cultivos no renovados de microorganismos ruminales permiten determinar *in vitro* la producción de gas promovida por la fermentación de una determinada dieta, habiéndose utilizado a lo largo de los últimos 20 años para evaluar el efecto de aditivos sobre la fermentación ruminal (Pell et al., 1998). El uso de estas técnicas permite disminuir el número de animales intervenidos quirúrgicamente, además de ser relativamente baratas y sencillas. Aunque dichos sistemas implican gran cantidad de ventajas, también plantean inconvenientes, como los derivados de la no liberación del gas acumulado en el interior de los frascos de fermentación, con el consiguiente aumento de la presión hasta niveles no fisiológicos (Rymer et al., 2005) o la no renovación de los nutrientes, que sí ocurre en el animal. El mayor inconveniente puede derivar de un crecimiento microbiano inadecuado, aunque este aspecto ha sido poco estudiado tanto en los sistemas utilizados de forma convencional como en los nuevos sistemas que se están desarrollando para superar las citadas limitaciones y optimizar la simulación de la fermentación ruminal. Además, conviene destacar la necesidad de conocer el crecimiento microbiano en los sistemas *in vitro*, para relacionar el efecto de la dosis de aditivos y principios activos sobre la microbiota.

El objetivo de este trabajo fue estudiar en el sistema Ankom<sup>RF</sup> Gas Production la evolución de la concentración de las bacterias totales en relación al inóculo y cuantificar la producción de gas durante 24 horas de incubación de una dieta constituida por heno de alfalfa y avena (1:1), empleando inóculo ruminal de caprino.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon cultivos no renovados de microorganismos ruminales (Ankom<sup>RF</sup> Gas Production, Ankom, NY, EEUU) para incubar durante 24 h una dieta a base de heno de alfalfa y avena (1:1). Se realizaron dos series de incubaciones en frascos de vidrio de 310 ml de capacidad, y se incubaron 0,5 gramos de muestra molida a 1mm de grosor, con dos frascos sólo con inóculo (blancos). A cada frasco se le añadieron 60 ml de un inóculo compuesto por contenido ruminal filtrado y una solución tampón (Menke y Steingass, 1988) en una relación 1:3. El inóculo ruminal se obtuvo de 3 cabras de raza granadina, canaladas en rumen y alimentadas con la misma dieta incubada *in vitro*. El contenido ruminal de cada animal se extrajo antes de la toma de alimento, se filtró a través de 2 capas de gasa bajo un flujo de CO<sub>2</sub> y se mezcló con la solución tampón. Los frascos se mantuvieron en un baño de agua a 39° C durante 24 horas y la presión en los frascos se registró automáticamente cada minuto, utilizándose los valores obtenidos para calcular el volumen total de gas producido mediante la fórmula  $V = V_i \times P_{psi} \times 0.068004084$ . El gas producido en cada frasco se liberó automáticamente cuando la presión interna llegó a 2 psi. En cada serie de incubación se abrieron dos frascos a cada uno de los tiempos de incubación siguientes: 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, se congeló a -80°C el contenido total de los frascos para detener la fermentación y, posteriormente, se liofilizó. De la misma manera se procedió con el resto de las muestras: alícuotas del contenido ruminal entero, así como de sus fracciones líquida y sólida tras la filtración, y de la mezcla que constituyó el inóculo de los frascos de fermentación. A partir de las muestras liofilizadas se realizó la extracción de ADN total utilizando el kit QIAmp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). El ADN se empleó para la cuantificación absoluta de bacterias totales, mediante PCR a tiempo real, amplificando un fragmento de unas 120 pares de bases del gen 16S rRNA. Se usaron cebadores específicos y universales de eubacterias (Maeda et al., 2003). Para cuantificar las copias génicas se emplearon patrones consistentes en extractos del plásmido pCR<sup>®</sup>4-TOPO (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA), recombinado con el fragmento diana anteriormente mencionado. Para la amplificación de los patrones y de las muestras problema se utilizó la mezcla comercial iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 2X y el sistema de amplificación – detección iCycler – iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El número de copias génicas se expresó por unidad de muestra fresca de la que procedía el extracto de ADN considerado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de gas acumulada durante las primeras 24 horas siguió un modelo exponencial propio de este tipo de fermentaciones (Figura 1). La cuantificación de las copias del rRNA 16S en las fracciones sólida y líquida del contenido ruminal mostró que la filtración implica la pérdida de una parte muy importante de la biomasa bacteriana presente en el rumen, y que la fracción líquida, normalmente empleada para la preparación del inóculo de sistemas in vitro, contiene un 38% menos de biomasa de bacterias que la fracción sólida (Figura 2). Esto concuerda con las proporciones de bacterias asociadas a las fases sólida y líquida del contenido ruminal encontradas por otros autores (Cheng et al., 1995). La mezcla de la fracción líquida del contenido ruminal con la solución tampón provoca una disminución adicional de la biomasa bacteriana, que resultó del 13 % de la biomasa presente en el contenido del rumen. El descenso de la biomasa bacteriana debido al proceso de preparación del inóculo junto con el hecho de que la población de bacterias presente en la fracción sólida sea manifiestamente distinta a la de la fracción líquida, en términos de estructura y diversidad (Kong et al., 2010), sugiere la necesidad de revisar el procedimiento estandarizado para la preparación del inóculo que se emplea en los sistemas de simulación ruminal in vitro con objeto de utilizar un inóculo ruminal más representativo del contenido ruminal.

Es destacable que la biomasa bacteriana del inóculo aumente tras el inicio de la incubación observándose un incremento del 170%, con respecto a la biomasa existente en el inóculo inicial, tras las 4 horas primeras de incubación, incremento que se ralentiza con la progresión del periodo de incubación (36% a las 4-8 h, y 11% a las 8-12 h en que se alcanzó el crecimiento microbiano máximo). A partir de las 12 horas se produjo una inflexión en la tendencia, disminuyendo la biomasa bacteriana. En el intervalo 12-16 horas se registró un importante descenso del 53 % en la biomasa presente, la cual siguió descendiendo aunque de manera menos importante hasta las 24 horas. La producción de gas en cada intervalo estudiado siguió un modelo parecido al observado en el crecimiento bacteriano, con producciones mayores en los intervalos de mayor crecimiento bacteriano.

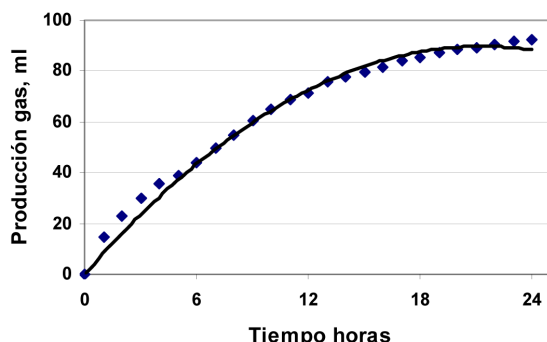
Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos de nuestro grupo de investigación realizados con un sistema de producción de gas tradicional (Soto et al., 2009), que mostraron que a las 24 horas se alcanzaba una biomasa bacteriana similar a la del inóculo ruminal de partida. En el caso del sistema in vitro utilizado en este trabajo a las 24 horas se alcanzan valores superiores a los de la mezcla del inóculo ruminal y el tampón iniciales, con un crecimiento bacteriano muy notable entre las 0 y las 12 horas. Este importante incremento podría deberse, en parte, al sistema de regulación de la presión interna en el frasco de fermentación, como consecuencia de la liberación automática del gas cuando la presión alcanza un valor de 2 psi.

Nuestros resultados muestran que el filtrado al que se somete el contenido ruminal durante la preparación del inóculo para sistemas in vitro conlleva un descenso muy importante de la biomasa bacteriana. Sin embargo, las condiciones del sistema Ankom<sup>RF</sup> Gas Production favorecen que durante la incubación se produzca un crecimiento muy significativo de la biomasa bacteriana con respecto a los sistemas que no permiten la liberación automática del gas de fermentación. Los valores de masa bacteriana obtenidos tras 12 horas de incubación son muy similares a los del líquido ruminal filtrado que se emplea como inóculo. No obstante la concentración media que se alcanza no llega a los niveles del contenido ruminal original, aspecto que ha de ser tenido en cuenta para extrapolar los resultados obtenidos in vitro a condiciones in vivo.

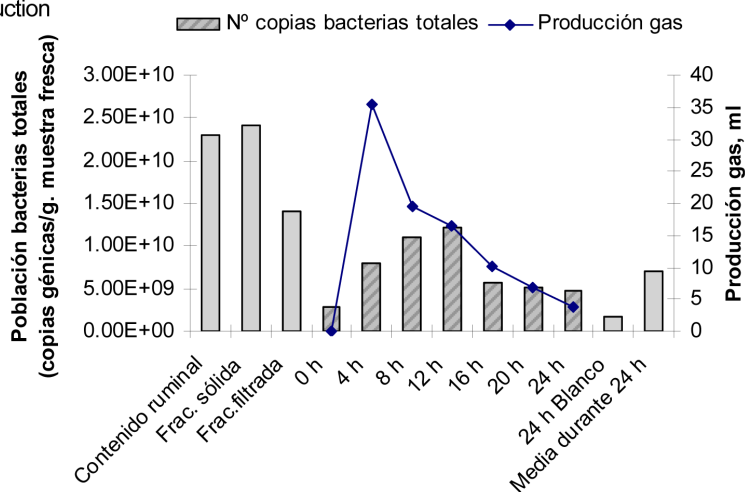
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cheng, K. J., McAllister, T. A., Costerton, J. W., 1995. *Microbial Biofilms*. Cambridge University Press.
- Kong, Y., Teather R. y Forster R. 2010. *FEMS Microbiol Ecol* 74, 612-622.
- Maeda H., Kokeguchi S., Arai, H., Tanimoto I., Nishimura, F. y Takashiba S. 2003. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 39: 81-86.
- Menke, K. H. y Steingass, H. 1988. *Animal Research and Development*, 7 – 55.
- Pell, A.N., Pitt, R.E., Doane, P.H. y Schofield, P. 1998. *British Society of Animal Science. Occasional Publication*, 22. 45–54.
- Rymer, C., Huntington J.A., Williams B.A. y Givens D.I. 2005. *Animal Feed Scie. and Techn.* 123–124, 9–30.
- Soto E. C., Molina-Alcaide, E., Khelil, H. y Yáñez-Ruiz, D. R. 2009. *AIDA. Tomo II*, 766-768.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2008AGL2008-04707-C02-01). G. Martínez agradece la concesión de una beca predoctoral del programa FPI 2009 del Ministerio de Ciencia e Innovación. También se agradece la asistencia técnica de J. Fernández, I. Jiménez y T. García.



**Figura 1.** Producción de gas acumulada durante 24 horas de incubación en un sistema Ankom<sup>RF</sup> Gas Production



**Figura 2.** Valores medios de copias génicas (*16S rRNA*) de bacterias totales en las distintas fracciones del contenido ruminal y a lo largo de las primeras 24 horas de incubación en un sistema Ankom<sup>RF</sup> Gas Production. Evolución en la producción de gas los intervalos de 4 horas estudiados.

### BACTERIAL GROWTH IN THE ANKOM<sup>RF</sup> IN VITRO FERMENTATION SYSTEM OVER 24 HOURS OF INCUBATION

**ABSTRACT:** *In vitro* systems that simulate rumen fermentation should allow for a microbial growth similar to what occurs in the rumen. Although these systems have been widely used over the last 20 years, there is little information about the evolution of the microbial communities compared with the rumen. Furthermore, these systems have the restriction of high pressure that accumulates in the jars. The aim of this work was to study the bacterial growth in the Ankom<sup>RF</sup> *in vitro* fermentation system over 24 hours using rumen inoculum from goats and a diet based on alfalfa hay and oats (1:1). Total bacteria were quantified by using qPCR on DNA extracts of jars' content at 4 hours intervals along the 24 hours of incubation and of the inoculum. Results showed that the use of the rumen liquid fraction as inoculum involves a decrease in the original bacterial biomass. However, the decrease is fully compensated by a rapid bacterial growth during incubation, reaching a biomass equivalent to that in the original rumen liquid fraction. Nevertheless, the average concentration over the 24 hours of incubation was lower than in the rumen content, which might be considered for extrapolating *in vitro* results to *in vivo* conditions.

**Keywords:** bacterial biomass, *in vitro*, rumen fermentation.