

ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO: EFECTO DE MODIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA RETENCIÓN DE PROTOZOOS EN EL SISTEMA

Cabeza-Luna¹, I., Carro², M.D., Fernández-Yepes¹, J. y Molina-Alcaide¹, E.

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

²Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. molina@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Algunos estudios previos, realizados con fermentadores de flujo continuo (Muetzel *et al.*, 2009; Soto *et al.* 2012; 2013) y semi-continuo (Martínez *et al.*, 2010; Mateos *et al.*, 2013), han mostrado que durante el período de incubación se producen cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones microbianas ruminales. En todos estos estudios se observó un descenso marcado del número de protozoos, pero la evolución de otras poblaciones microbianas fue variable. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de dos modificaciones técnicas en fermentadores de flujo continuo para mejorar la retención de los protozoos y analizar la posible influencia en los parámetros fermentativos y en las poblaciones de bacterias, hongos y arqueas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 2 series de incubación de 14 días de duración cada una con 6 fermentadores de flujo continuo. En cada serie se asignaron al azar dos fermentadores a cada uno de los tratamientos experimentales: control (sin modificaciones), esponja (situada en la salida del efluente de los fermentadores) y filtro (formado por dos capas de nylon de 50 µm de tamaño de poro y situado en la salida del efluente). El primer día de cada serie de incubación los fermentadores se inocularon con 700 ml de fluido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen, que recibían una dieta constituida por heno de alfalfa y concentrado en proporción 50:50. El contenido ruminal se obtuvo inmediatamente antes de la administración del alimento, se mezcló y se filtró a través de 4 capas de gasa antes de inocular los fermentadores. El flujo de saliva artificial se fijó en 40 ml/h y se mantuvo un flujo continuo de CO₂ durante todo el experimento. Cada fermentador recibió diariamente 30 g de la misma dieta que recibían las ovejas. Tras el periodo de adaptación, los días 10 y 14 de cada serie de incubación, se tomaron muestras de los efluentes para analizar las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV), amoníaco y lactato. Asimismo, se recogieron unos 10 ml de efluente, en recipientes estériles que se congelaron (-20°C) para su posterior liofilización y extracción de ADN.

La extracción del ADN se realizó a partir de 50 mg de materia seca del fluido liofilizado siguiendo el método propuesto por Yu y Morrison (2004), incluyendo el tratamiento con un Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, EE. UU.) para lisar los microorganismos ruminales y la purificación del ADN con las columnas del kit QIAamp DNA stool (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU.). La cuantificación absoluta del ADN de bacterias y protozoos y la cuantificación relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, hongos y arqueas se realizaron mediante PCR cuantitativa en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) siguiendo la metodología descrita por Saro *et al.* (2014). Como estándar para la cuantificación de bacterias y protozoos se utilizó ADN extraído de pellets de bacterias y de protozoos que habían sido aislados del rumen de ovejas alimentadas con una dieta similar. Los valores obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y los datos de las 3 especies de bacterias celulolíticas, los hongos y las arqueas se expresaron en relación a la cantidad absoluta de bacterias según los cálculos descritos por Pfaffl (2001).

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza con el Proc MIXED del paquete estadístico SAS, utilizando un modelo con medidas repetidas en el tiempo, en el que el tratamiento, tiempo, interacción tratamiento x tiempo y el periodo se consideraron efectos fijos y el fermentador se consideró un efecto aleatorio. La significación estadística se estableció en P<0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ninguna de las dos modificaciones técnicas ensayadas afectó ($P>0,05$) a la concentración de ADN bacteriano ni a la abundancia relativa de hongos (Tabla 1), aunque la abundancia de arqueas tendió a ser diferente ($P=0,06$). Por el contrario, los fermentadores a los que se aplicaron la modificación técnica filtro y esponja presentaron una mayor concentración de ADN protozoario ($P<0,05$) que los fermentadores control, aunque este valor fue muy inferior al observado en el fluido ruminal utilizado como inóculo (268 $\mu\text{g ADN/g ml}$). La concentración de ADN protozoario y la abundancia relativa de hongos y arqueas fueron menores ($P<0,001$) el día 14 que el día 10 de incubación, aunque en el caso del ADN bacteriano se observó el efecto contrario. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mateos *et al.* (2013) en fermentadores Rusitec que recibían una dieta similar.

Tabla 1. Efecto de modificaciones técnicas (MTEC) en fermentadores de flujo continuo sobre las poblaciones microbianas y los parámetros fermentativos

Item	Día	Modificación técnica			eem ⁴	P-valor ⁵	
		Control ¹	Filtro ²	Esponja ³		MTEC	Tiempo
Poblaciones microbianas							
Bacterias totales	10	1,14	1,17	1,07	0,372	0,89	0,001
($\mu\text{g ADN/ml}$)	14	3,03	3,06	3,30			
Protozoos	10	3,51 ^a	7,42 ^b	7,72 ^b	0,847	0,01	0,001
($\mu\text{g ADN/ml}$)	14	1,47 ^a	3,62 ^b	3,30 ^b			
Hongos ⁶	10	0,196	0,171	0,143	0,0240	0,81	0,002
	14	0,072	0,010	0,099			
Arqueas ⁶	10	1,47	1,54	1,12	0,104	0,06	0,001
	14	0,85	1,01	0,96			
Parámetros fermentativos							
Ácidos grasos volátiles (AGV; mmol/d)							
Total AGV	10	56,2	52,8	54,4	3,51	0,95	0,69
	14	53,7	56,3	56,9			
Acético	10	30,6	29,6	30,6	2,12	0,82	0,60
	14	29,7	31,6	32,3			
Propiónico	10	13,2	12,1	12,5	0,81	0,96	0,56
	14	12,4	13,3	13,3			
Butírico	10	8,31	7,56	7,45	0,465	0,55	0,95
	14	7,84	7,85	7,70			
Otros AGV ⁷	10	4,18	3,79	3,79	0,274	0,51	0,36
	14	3,70	3,68	3,78			
Amoníaco (mg/d)	10	210	199	220	13,1	0,60	0,68
	14	204	220	211			
Lactato (mg/d)	10	6,98	5,99	6,69	0,872	0,73	0,01
	14	8,51	7,89	9,88			

¹sin modificaciones técnicas; ²provistos de un sistema de filtros; ³provistos de una esponja
⁴error estándar de la media; ⁵No se detectaron ($P=0,315$ hasta $0,858$) interacciones MTEC x tiempo para ningún parámetro ⁶ADN relativo al total de ADN bacteriano ($10^2 \times 2^{-(\text{Ct diana} - \text{Ct bacterias totales})}$) ⁷ Suma de los ácidos isobutírico, isoaléxico, valérico y caproico

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

Ninguna de las dos modificaciones técnicas afectó ($P>0,05$) a los parámetros fermentativos, que fueron similares a los observados en los fermentadores control (Tabla 1). Tampoco se

detectaron diferencias ($P>0,05$) en los parámetros fermentativos entre los dos días de muestreo (10 vs. 14), con la excepción de la producción de lactato, que fue mayor ($P=0,009$) el día 14 que el día 10. Estos resultados concuerdan con los observados por Martínez *et al.* (2011) en fermentadores de flujo semi-continuo, en los que, tras un período de adaptación de 8 días, los parámetros fermentativos se mantenían sin cambios hasta el final del período de incubación (14 días).

En resumen, las dos modificaciones técnicas estudiadas permitieron incrementar la población de protozoos en fermentadores de flujo continuo sin influenciar las poblaciones del resto de grupos microbianos. A pesar de ello, las concentraciones de ADN protozoario las concentraciones de ADN protozoario fueron inferiores a las presentes en el fluido ruminal utilizado para inocular los fermentadores (valor medio de los dos inóculos: 248 μg ADN/ml).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martínez, M.E. *et al.* 2010. *J. Dairy. Sci.* 93: 3699–3712.
- Martínez, M.E. *et al.* 2011. *Options Méditerranéennes, Serie A* 99: 121-126.
- Mateos, I. *et al.* 2013. *ITEA, XV Jornadas sobre Producción Animal. Tomo II*: 851-853.
- Muetzel *et al.* 2009. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151: 32-43.
- Pfaffl, M. W. 2001. *Nucleic Acids Res.* 29: e45-e45.
- Saro, C. *et al.* 2014. *Livest. Prod.* 160: 52-59.
- Soto, E. C. *et al.* 2012. *Anim. Prod. Sci.* 52: 813-822.
- Soto, E. C. *et al.* 2013. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185: 9-18.
- Yu, Z., y M. Morrison. 2004. *BioTechniques.* 36: 808-812.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL2011-22628 financiado por el MICINN. Se agradece el apoyo técnico de D. Alejandro Muñoz-Martínez.

MICROBIAL POPULATIONS IN CONTINUOUS-CULTURE FERMENTERS: EFFECTS OF TECHNICAL MODIFICATIONS

ABSTRACT. The objective of this work was to study the effect of two technical modifications (supplemented with sponge materials (ES) and provided with a filter system (FIL)) in continuous-culture fermenters on the microbial populations and ruminal fermentation parameters over the sampling period. 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. On days 10 and 14, samples were taken for analysis of fermentation parameters (volatile fatty acids, ammonia-N and lactate) and microbial populations. None of the technical modification affected ($P>0.05$) concentrations of bacterial DNA and the relative abundance of fungi and archaea, but protozoal DNA concentrations were higher ($P>0.05$) in ES and FIL fermenters than in the control ones. However, values of protozoal DNA were about 50 times lower than in the rumen fluid used as inoculum for the fermenters. The tested technical modifications did not affect ($P>0.05$) any fermentation parameter, and there were no differences in fermentation parameters between days 10 and 14, with the exception of lactate production which was higher ($P=0.009$) on day 14 than on day 10. In conclusion, the technical modifications tested maintained protozoa in continuous culture fermenters without any effect on fermentation parameters and other microbial populations, but protozoa concentrations were still lower than those in the rumen.

Keywords: continuous-culture fermenters, microbiota, fermentation, technical modifications