



Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales

Determinación In Vitro de la Digestibilidad de la Celulosa Contenida en Pasturas Autóctonas por una Cepa de *Fibrobacter Succinogenes* Aislada de Cabras Biotipo Criollo

Grilli D, Paez S, Egea V, Cerón M, Cobos E, Allegretti L, Arenas N.

Fac. de Ciencias Veterinarias y Ambientales, Universidad J.A. Maza Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo
CONICET diego.grilli@yahoo.com.ar

Resumen

Se realizó la determinación in vitro de la digestibilidad de la celulosa presente en seis especies forrajeras autóctonas (*Atriplex lampa*, *Geoffroea decorticans*, *Tricomaria usillo*, *Prosopis flexuosa*, *Mimosa ephedroides*, *Capparis atamisquea*) y en el heno de alfalfa (*Medicago sativa*), por una cepa de *Fibrobacter succinogenes*. Esta cepa fue aislada del rumen de caprinos biotipo Criollo de la región de Lavalle, Mendoza. Se utilizaron las principales especies forrajeras y las partes de las plantas consumidas por el ganado caprino en pastoreo. La digestibilidad de la celulosa contenida en *Medicago sativa* fue inferior a la digestibilidad observada en *Atriplex lampa*, *Geoffroea decorticans* y *Tricomaria usillo*, mientras que no hubo diferencias con *Prosopis flexuosa*, *Mimosa ephedroides* y *Capparis atamisquea*. El contenido de lignina de los forrajes estudiados sugiere que los tejidos no lignificados son mucho más degradados que los tejidos lignificados de los forrajes evaluados.

Introducción

Los animales rumiantes se caracterizan por alimentarse de forrajes debido a la posibilidad de degradar los carbohidratos estructurales contenidos en los vegetales (fibra), como celulosa, hemicelulosa y pectina; muy poco digestibles para las especies monogástricas. La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por la acción de las enzimas digestivas, y los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales (Relling y Mattioli, 2002). El aparato digestivo de los rumiantes consta de tres divertículos estomacales (retículo, rumen y omaso) que sirven para digerir la fibra y parte de la proteína del

alimento, y un estómago verdadero (abomaso) donde se produce la secreción gástrica. El 60-65% de la digestión de los nutrientes tiene lugar en el rumen, donde se produce la fermentación de aproximadamente las dos terceras partes del alimento ingerido, lo cual les permite a los microorganismos responsables de dicha fermentación, obtener la energía necesaria para su propio mantenimiento y crecimiento (Sydney y Lyford, 1988). Por este motivo, podemos decir que la nutrición del rumiante depende de la nutrición de los microorganismos ruminales (Relling y Mattioli, 2002).

En la región de Lavalle (Mendoza), las cabras componen su dieta con una alta proporción de especies arbustivas, las que constituyen una importante oferta de fibra. Se observó que las especies de mayor importancia forrajera fueron *Prosopis flexuosa*, *Atriplex lampa*, *Larrea cuneifolia*, *Tricomaria usillo*, *Geoffroea decorticans* y *Capparis atamisquea* (Allegretti et al., 2005). La digestibilidad de la materia seca y de la fibra observada en ciertas razas caprinas adaptadas a zonas áridas y alimentadas con dietas altamente lignificadas, supera la digestibilidad observada en razas europeas y en otros rumiantes domésticos (Silanikove and Brosh, 1989). Esto les permite lograr un mejor aprovechamiento de las especies forrajeras que predominan en estos ambientes áridos, indicando una buena adaptación a estas condiciones de producción. Esta adaptación puede deberse, entre otros factores, a una gran eficiencia en la utilización de la fibra (Silanikove, 2000), por lo que el estudio de las bacterias y enzimas fibrolíticas ruminales (celulolíticas y hemicelulolíticas) adquiere importancia en los sistemas de producción caprina en nuestro país. Las

bacterias celulolíticas se caracterizan por degradar la celulosa y hemicelulosa de la célula vegetal, los cuales se encuentran principalmente formando parte de la pared celular vegetal (Stewart et al., 1997). *Fibrobacter succinogenes* (*F. succinogenes*) es una de las bacterias celulolíticas más importante del rumen cuando los animales se alimentan con dietas de baja calidad nutricional (Bryant y Burkey, 1953). Los cultivos puros de las cepas de *F. succinogenes* S85 y A3c digieren *in vitro* a la celulosa contenida en los forrajes en mayor medida que varias de las otras especies bacterianas celulolíticas (Varel, 1991).

A partir de una cepa de *F. succinogenes* aislada del rumen de caprinos biotipo Criollo, se pretende determinar la digestibilidad *in vitro* de la celulosa contenida en las principales especies forrajeras autóctonas, seleccionadas naturalmente por estos caprinos. Este conocimiento permitirá en un futuro comprender los mecanismos de la degradación de la celulosa por dicha cepa. Esto es esencial para ampliar los conocimientos relacionados con el proceso de fermentación ruminal desarrollado por estos animales y en un futuro formular estrategias de manipulación de dicha fermentación, orientadas a mejorar la eficiencia en la producción de carne y leche de los caprinos en los sistemas áridos.

Materiales y método

En el presente estudio se utilizaron cabras biotipo Criollo, adultas, hembras, de 3 años de edad, que fueron sometidas a un proceso de fistulización quirúrgica según lo recomendado por Grilli et al. (2009). Durante dos estaciones climáticas (invierno y verano), se trasladaron los animales fistulizados al puesto "La Majada", ubicado en Lavalle, Mendoza. Los animales fueron pastoreados en el campo natural durante 15 días. La composición nutricional de los forrajes seleccionados por el ganado se realizó según las técnicas AOAC (1984) para materia seca, hemicelulosa, celulosa y lignina. Al finalizar los 15 días de pastoreo, se tomaron muestras de contenido ruminal a través de la fístula ruminal para el aislamiento de las bacterias anaerobias. Los cultivos con actividad celulolítica fueron acondicionados para la extracción de ADN (Koike y Kobayashi, 2001). La identificación genética de las cepas aisladas se realizó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Tajima et al. (1999), utilizando el kit QIA amp DNA Stool (Byodinamics®). Se utilizaron primers para amplificar el fragmento que codifica para el ARNr de la subunidad 16S de las siguientes bacterias celulolíticas: *F. succinogenes* (445 pares de base -bp-), *Ruminococcus flavefaciens* (835 bp) y *Ruminococcus albus* (176 bp). La identificación bioquímica de la cepa aislada se realizó por la determinación del patrón de fermentación de los siguientes carbohidratos: glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, ramnosa, maltosa, celobiosa, sacarosa, trehalosa, manitol, glicerol, dulcitol, adonitol, inositol, dextrina, rafinosa, almidón, xilano y carboximetilcelulosa (CMC); siguiendo las

especificaciones de Moore y Holdeman (1972). Se determinó el porcentaje de digestibilidad de la celulosa contenida en la alfalfa (*Medicago sativa*) y en 6 especies forrajeras nativas (*Prosopis flexuosa*, *Capparis atamisquea*, *Geoffroea decorticans*, *Mimosa ephedroides*, *Tricomaria usillo* y *Atriplex lampa*). Para ello, estos forrajes y las partes de las plantas consumidas por el ganado caprino fueron secados en una estufa a 60°C y luego molidos. Se preparó un medio de fermentación añadiendo 0,5% del forraje procesado como única fuente de energía. Los tubos fueron inoculados con 0,2 ml de un cultivo de 24 h de la cepa aislada. Los tubos fueron incubados a 39°C durante 14 días, en condiciones de anaerobiosis. El análisis de la celulosa contenida en los forrajes se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Dehority y Scott (1967) en los tubos inoculados y sin inocular. Los resultados del porcentaje de digestibilidad de la celulosa fueron analizados mediante un análisis de la varianza seguido por el procedimiento de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05. El análisis de correlación entre los porcentajes de digestibilidad de la celulosa y la composición nutricional de los forrajes evaluados fue analizado mediante el coeficiente de correlación de Pearson, con un nivel de probabilidad de 0,05. Todos los procedimientos estadísticos fueron determinados utilizando el software para estadística InfoStat versión 2009 (Di Rienzo et al., 2009).

Resultados y Discusión

Los resultados del PCR indican que se logró identificar una cepa wild type de la especie bacteriana *F. succinogenes* (Figura Nº 1), con un tamaño del fragmento de ADN amplificado de 445 bp. La misma fue caracterizada morfológicamente como pequeños bacilos de $2,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de largo y $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de ancho, Gram negativos, anaerobios estrictos e inmóviles.

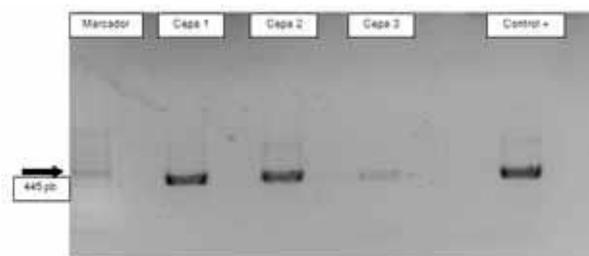


Figura Nº 1. Electroforesis en gel de Agarosa para identificar las bandas de 445 pb que permiten identificar el fragmento amplificado por PCR del ADN genómico de *F. succinogenes* que codifica para el ARNr de la subunidad ribosomal 16S. Los resultados del patrón de fermentación de los diversos carbohidratos indican que la cepa aislada produjo fermentación de la glucosa, manosa, galactosa, sacarosa, celobiosa y manitol; similar a lo reportado por Stewart et al. (1997). La cepa fue capaz de formar colonias con halos de hidrólisis alrededor de la CMC, similar a lo reportado por Hungate (1966). La evidencia de degradación de la CMC supone la presencia de actividad de las enzimas celulolíticas ω -(1,4) y/o (1,3)-D-glucanohidrolasa en la cepa aislada (Theater y Wood, 1982). Sin embargo,

sería necesario en un futuro, indagar más acerca de las características enzimáticas de la cepa aislada para evidenciar su rol en la variabilidad de la digestión in vitro de la celulosa. Los porcentajes de digestibilidad de la celulosa (media \pm D.E.) contenida en diversos forrajes, incubados durante 14 días con la cepa aislada, se observan en la Tabla N° 1.

Tabla 1 Porcentajes de digestibilidad (media \pm DE) de la celulosa contenida en diversos forrajes por la cepa de *Fibrobacter succinogenes*.

| Forrajes | Digestión de la celulosa (%) |
|-----------------------|-------------------------------|
| Medicago sativa | 19,10 \pm 4,72 ¹ |
| Prosopis flexuosa | 19,48 \pm 1,71 ¹ |
| Mimosa ephedroides | 29,49 \pm 9,26 ¹ |
| Geoffroea decorticans | 31,22 \pm 4,22 ¹ |
| Capparis atamisquea | 36,76 \pm 7,28 ² |
| Tricomaria usillo | 38,23 \pm 0,65 ² |
| Atriplex lampa | 50,36 \pm 4,49 ² |

La digestibilidad de la celulosa contenida en *Medicago sativa* (especie forrajera de excelencia para el ganado), fue inferior ($p < 0,05$) a la digestibilidad observada en *Atriplex lampa*, *Geoffroea decorticans* y *Tricomaria usillo*, mientras que no hubo diferencias con la digestibilidad observada en *Prosopis flexuosa*, *Mimosa ephedroides* y *Capparis atamisquea*. El coeficiente de correlación ($r = -0,81$; $p < 0,05$) entre el contenido de lignina de los forrajes evaluados y el porcentaje de digestibilidad de la celulosa contenida en dichos forrajes sugiere que los tejidos no lignificados son mucho más degradados que los tejidos lignificados de los forrajes evaluados. Esto sugiere que la lignina actuaría como una barrera física entre las bacterias celulolíticas y la celulosa presente en la pared celular de estas especies forrajeras (Jung y Engels, 2001). Los resultados obtenidos en este estudio han permitido ampliar los conocimientos para comprender en un futuro los mecanismos de degradación de la celulosa por la cepa bacteriana aislada. El estudio de la microbiota habitual del rumen es fundamental para comprender el proceso de fermentación ruminal y en un futuro formular estrategias de manipulación de dicha fermentación orientadas a mejorar la eficiencia en la producción de carne y leche de los caprinos en sistemas áridos.

Bibliografía

- Allegretti L, Passera C, Paez J, Ubeda A, Sartor C y Robles A. 2005. Capacidad sustentadora y composición botánica de la ingesta caprina en un ecosistema árido, Lavalle, Argentina. En: Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural (Volumen I). España. 405. pp 221-228.
- A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th Ed. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bryant M y Burkey L. 1953. Number and some predominant groups of bacteria in the rumen of cow fed different ration. *Journal of Dairy Science*. 36: 218-224.
- Dehority B y Scott H. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. 50: 1136-1141.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Grilli D, Páez S, Egea V, Degarbo S, Lausi O, Arenas N, et al. 2009. Counts of ruminal bacteria collected by nasal tube or ruminal fistula in Somalia's sheep. XXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. *Biocell* ISSN 03279545. 33: A76.
- Hungate R. 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press, New York. pp 553.
- Jung H y Engels F. 2001. Alfalfa stem tissues: rate and extent of cell-wall thinning during ruminal degradation. *Journal of Agricultural Science* 49: 3-13.
- Koike S y Kobayashi Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *ruminococcus flavesfaciens*. *FEMS Microbiol.Lett.* 204:361-366.
- Moore W y Holdeman L. 1972. Identification of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*. 25: 1306.
- Relling, A y Mattioli, G. 2002. Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Editorial EDULP. Argentina. pp 4-72.
- Silanikove, N. 2000. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Ruminant Research* 35: 181-193.
- Silanikove, N y Brosh, A. 1989. Lignocellulose degradation and subsequent metabolism of lignin fermentation products by the desert black Bedouin goat fed on wheat straw as a single component diet. *British Journal of Nutrition* 62, 509±520.

- Stewart C, Flint H y Bryant M. 1997. The rumen bacteria. En: Stewart, C y Hobson, P. The rumen microbial ecosystem. England. pp 10-73. Sydney J y Lyford J. 1988. Growth and development of the ruminant digestive system. En: The ruminant animal: digestive physiology and nutrition (DC Churchh, ed), A Reston Book, Prentice Hall, Canada Inc, Toronto, ON, Canada, pp. 44-63. Tajima K, Aminov R I, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, et al. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 159-169.
- Theater R y Wood P. 1982. Use of Congo Red Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. Applied Environmental Microbiology. 43: 777-780.
- Varel V, Jung H y Krumholz L. 1991. Degradation of cellulose and forage fiber fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in coculture with phenolic monomer-degrading bacteria. Journal of Animal Science. 69:4993-5000.