

Actividad fitásica *in vitro* de los microorganismos del rumen y degradación *in situ* de un sustrato fibroso en ovinos alimentados con diferentes regímenes

Susmira Godoy^{1*} y Claudio F. Chicco²

RESUMEN

Carneros provistos de fistula ruminal fueron alimentados con tres dietas con diferentes relaciones forraje/ alimento concentrado: alta (F, 100%); mediana (FC, 50%) y baja en forraje (FCC, 20%). Se utilizó un sistema *in vitro* para medir la actividad fitásica, y suspensión *in situ* de bolsas de nylon con forraje molido, para determinar la degradabilidad de la materia seca (MS), materia orgánica (MO) y proteína (PC) y fósforo (P) residual. Adicionalmente, se determinó el pH del contenido ruminal. La actividad fitásica aumentó significativamente para los tratamientos con suplementación, con valores de 0,232; 0,229 y 0,313 U/kg para F, FC y FCC, respectivamente, siendo FCC mayor ($P<0,05$). No se observaron cambios aparentes en la degradación de la MS y MO. La proteólisis aumentó con la adición del concentrado, con valores mas elevados ($P<0,05$) para FCC. El P residual fue mayor ($P<0,05$) para el tratamiento FCC (50,7%). El pH disminuyó ($P<0,05$) con las dietas con concentrados,

1- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. CENIAP. Campus universitario UCV, Edf. 03. Apartado Postal 4653. Maracay 2101, Aragua. Venezuela. *Correo electrónico sgodoy@inia.gov.ve

2- Universidad Central de Venezuela. Fac. Ciencias Veterinarias. Maracay, Aragua. Venezuela.

alcanzando valores cercanos a 6, a las 8 horas de incubación. Se concluye que la suplementación con concentrados aumenta la actividad fitásica en el rumen, con modificaciones del patrón de fermentación de la microbiota, aparentemente a favor de los microorganismos adaptados a condiciones mas ácidas en el ambiente ruminal.

Palabras clave: Actividad fitásica, microbiota ruminal, degradación sustrato, fibra, ovinos.

***In vitro* phytase activity of rumen microorganism and *in situ* degradation of fibrous substrate in sheep fed different feeding regimes**

SUMMARY

Rams provided with rumen fistulae were fed diets containing three levels of forage/concentrate ratios: high (F, 100%), medium (FC, 50%) and low forage level (FCC, 20%). An *in vitro* method was used to determine phytase activity, and an *in situ* suspension of nylon bags, containing grounded forage, to measure degradability of dry matter (MS), organic matter (MO) and residual crude protein (PC) and phosphorus (P). In addition, pH was measured in rumen content. Phytase activity increased with the addition of concentrate, with values of 0.232, 0.229 and 0.313 U/kg, respectively for F, FC and FCC, being the latter higher ($P<0.05$). No differences were found in MS and MO degradability. Proteolysis was enhanced with the addition on concentrate, being this higher ($P<0.05$) for FCC. Rumen pH was decreased by the addition of concentrate ($P<0.05$), reaching values of 6 approximately, at 8 hours of incubation. Residual P was higher ($P<0.05$) in FCC treatment. It is concluded that feeding forages with the addition on concentrate results in an increment o microbe phytase activity in the rumen, associated with changes in the fermentation pattern, apparently promoting microorganisms adapted to more acid ruminal environment.

Key words: Phytase activity, rumen microbiota, substrate digestion fiber, sheep.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes utilizan el fósforo orgánico en forma de fitatos debido a la actividad fitásica de la microbiota presente en los compartimientos pregástricos. Sin embargo, Raun *et al.* (1956) señalan que la hidrólisis de los fitatos puede ser incompleta por saturación de la actividad enzimática, aún cuando, son escasas las investigaciones realizadas para confirmar estos hallazgos. Recientemente, Yanke *et al.* (1998) han estudiado la actividad fitásica de cultivos puros de bacterias del rumen bajo diferentes condiciones de alimentación. Estos estudios demuestran que la actividad fitásica es principalmente de origen bacteriano, confirmando los resultados de Raun *et al.* (1956). Además, señalan que la actividad fitásica se incrementa con el suministro de dietas altas en concentrados, a base de granos.

En contraposición, cuando se incluyen elevadas proporciones (mas del 50% de la dieta) de granos o subproductos de cereales y oleaginosas en las raciones para rumiantes, es posible que no ocurra la hidrólisis total del fósforo fitico, como señalado por Ellis y Tillman (1960), utilizando dietas que contenían 91% del fósforo total en la forma de fitatos.

Consecuentemente, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad fitásica *in vitro* de los microorganismos del rumen, provenientes de inóculos de ovinos con diferentes regímenes alimenticios, y la degradación *in situ* de un sustrato fibroso bajo los mismos niveles de alimentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales y dietas

Para medir la actividad fitásica *in vitro* de las bacterias del rumen, se llevó a cabo un experimento con carneros provistos de fistula ruminal, con peso promedio de 40 kg, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente, tres animales por tratamiento, a tres tipos de dietas: alta (F, 100%), media (FC, 50%) y baja (FCC, 20 %) en forrajes. El forraje (*Cynodon plectostachyum*) contenía 3,79% PC, 82,2% FDN, 0,21% P y 0,26% Ca. Los tratamientos FC y FCC se conformaron adicionando al forraje un alimento

concentrado (Cuadro 1), a niveles de incorporación de 50 (300g/animal/día) y 80% (600g/animal/día) de la dieta total, respectivamente.

Muestras del contenido ruminal y preparación del inoculo

De cada carnero, después de un período de adaptación a las dietas de 21 días, se tomaron, aproximadamente, 500 ml de liquido ruminal, previo filtrado a través de varios estratos de gasa de uso quirúrgico. Cada muestra fue subdividida en dos submuestras para los diferentes estudios. El fluido ruminal filtrado fue centrifugado a 1000 x g durante 5 minutos, para separar protozoarios y partículas de alimento. Del sobrenadante, se tomaron 150 ml para sedimentar las bacterias por centrifugación diferencial directa, a 25000 x g, durante 20 minutos (McAllister *et al.*, 1992).

Aproximadamente un gramo de bacterias, diluido en 10 ml de solución tampón tris-HCl 0,02 M y pH 7,5, fue triturado con un ultra turax, tres veces durante 15 segundos, dejándolo en reposo, entre cada molienda, por 10 minutos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 30 x g, durante 10 minutos, y luego de separado el sobrenadante, éste fue re-centrifugado a 13000 x g por 30 minutos (Bitar y Reinhold, 1972).

Actividad fitásica

La actividad fitásica de las bacterias del rumen se determinó por el método de Bitar y Reinhold (1972). Un ml del sobrenadante fue incubado a 39°C durante 30, 60 y 90 minutos, utilizando para ello una solución tampón acetato (0,25 M). Posteriormente, las muestras fueron incubadas con 5 mM de fitato de sodio (A) y sin fitatos (B), mas un blanco sin muestras, con fitato de sodio (C). Al finalizar el periodo de incubación, se interrumpió la reacción con 3 ml de TCA al 20%. Las muestras se centrifugaron a 100 x g, durante 10 min y al sobrenadante se determinó el fósforo inorgánico liberado, utilizándose el método de Fiske y Subbarow (1925). El fósforo liberado de la molécula de fitato de la muestra (A) fue corregido restando el fósforo inorgánico presente en la muestra (B) y en el blanco sin muestra (C), y se expresó como $\mu\text{mol P inorgánico liberado/g/ml/min}$. La actividad fitásica fue calculada de la siguiente manera: Unidad de fitasa= $(P \times 1000)/(\text{Peso} \times \text{tiempo})$, donde el fósforo se expresa en μmoles de fósforo liberado por la fitasa, Peso corresponde al tamaño de la muestra (g) y 60 minutos el tiempo de incubación. De este método, se define que una unidad de fitasa es la cantidad de fósforo inorgánico liberado por minuto de 5 mM

de una solución de fitato de sodio a una tasa 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$, a un pH de 5.5 y a una temperatura de 39°C.

Degradabilidad in situ

Mediante la técnica de suspensión *in situ* de bolsas de nylon se determinó la degradabilidad de la materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PC) y fósforo (P) del forraje en los diferentes tratamientos experimentales (F, FC y FCC). Se utilizaron nueve carneros fistulados, tres por tratamiento. En cada animal, vía fistula, se incubaron en el rumen 24 bolsas de nylon que contenían 5 g de forraje (*Cynodon nlemfluensis*) molido, con seis tiempos de incubación (3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) y cuatro réplicas por tiempo.

En el contenido residual de cada bolsa se determinó MS, MO, PC (AOAC, 1984) y P (Fiske y Subbarrow, 1925) y los valores se expresaron como porcentaje del contenido inicial. Además, en el contenido ruminal, se determinó pH a las 0, 2, 4 y 8 horas post consumo del alimento.

Análisis estadísticos

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias comparadas por el método de Tukey (Steel y Torrie, 1998). Se establecieron ecuaciones de regresión lineal entre las variables bajo estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad fitásica (Cuadro 2) de las bacterias del rumen (U/kg) fue mayor ($P < 0,05$) en los animales que consumían FCC (0,4810), con relación a los tratamientos F (0,3752) y FC (0,3749), lo que demuestra la habilidad de los microorganismos del rumen para hidrolizar fitatos a través de las fitasas microbianas, como señalado por Raun *et al.* (1956) y más recientemente por Yanke *et al.* (1998).

Asimismo, los resultados indican un incremento en la actividad fitásica como respuesta a los altos niveles de fitatos en la dieta, a consecuencia de la suplementación con elevadas proporciones de alimento concentrado. Yanke *et al.* (1998) y Reddy *et al.* (1982) obtuvieron valores de

actividad fitásica superiores a los señalados en este estudio, cuando se utilizaron dietas con 90% de granos, en relación con la dieta con 100% de heno.

La degradabilidad *in situ* de la MS y MO del forraje en el rumen fue similar para los distintos tratamientos, con valores (%), a las 72 horas de incubación, de 66,7 y 72,3 para F, de 63,6 y 68,7 para FC y de 67,5 y 72,0 para FCC, respectivamente para MS y MO dentro de cada tratamiento (Cuadro 3). Los resultados indican que la degradabilidad *in situ* de la MS y MO aparentemente no fue afectada por las condiciones experimentales de las dietas, con diferentes proporciones de alimento concentrado. Como indicado más adelante, a consecuencia de la adición de alimento concentrado, hay una reducción del pH cerca de 6,0. Esto sugiere un cambio en el patrón de fermentación con microorganismos adaptados a condiciones de bajo pH (Miwa *et al.*, 1997).

El contenido de PC residual (%) del forraje incubado fue similar para F (68,2) y FC (66,2) y más bajo ($P<0,05$) para FCC (49,9), lo que indica un cambio en la microflora ruminal, favoreciendo el desarrollo de los microorganismos, tanto bacterias como protozoos, que promueven una mayor actividad proteolítica, a medida que aumenta el nivel de alimento concentrado en la dieta (Barnett y Reid, 1961).

El P residual (%) del forraje (Cuadro 3) fue mayor ($P<0,05$) en el tratamiento FCC (50,7) que en F (31,7) y FC (33,6), lo que parece estar relacionado con la mayor actividad fitásica de los microorganismos, con mayor liberación de fósforo en el ambiente ruminal. El efecto de estas condiciones sobre la utilización del fósforo del forraje no está claramente definido, más allá de la actividad fitásica microbiana.

El pH del contenido ruminal para los tratamientos FC y FCC disminuyó con el tiempo de incubación con valores, a las 8 horas, de 5,95 y 5,61, respectivamente. Para F, el pH se mantuvo constante (6,4) a los diferentes tiempos de incubación (Cuadro 4). Debido a que el pH del contenido ruminal está estrechamente relacionado con la formación de AGV, este cae después de la ingestión de alimento, particularmente con dietas altas en alimentos concentrados, pero mucho menos cuando el animal es alimentado con forraje únicamente. El efecto de dietas altas en concentrados sobre el pH del rumen se debe a una mayor proliferación de

bacterias amilolíticas, a expensas de las que utilizan el sustrato fibroso (Hungate, 1966).

CONCLUSIONES

Los resultados indican un incremento en la actividad fitásica de los microorganismos del rumen en respuesta a altos niveles de fitatos en la dieta, que aparentemente no es proporcional con el incremento del nivel de suplementación con granos y subproductos. Esto sugiere una mayor actividad fitásica, con mayor liberación de fósforo, cuyo efecto sobre la utilización del elemento en el forraje no está claramente definido. Asimismo, la alimentación de ovinos, con elevadas proporciones de concentrados en la dieta (FCC), promueve una mayor actividad amilolítica y, probablemente, también proteolítica de la microbiota, lo que tiende a disminuir el pH del contenido del rumen. No hay aparente efectos sobre la utilización de la MS y MO del forraje.

AGRADECIMIENTOS

A ECOS-NORD-FONACIT (V99A01) y a FONACIT (Proyecto S1 2000000754) por el financiamiento parcial del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1984. Official Methods for Analysis. 15^{va} Ed. Washington, D.C. pp. 1984.1018.
- Bitar, K y H. Reinhold. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys. Acta*, 268: 442-452.
- Barnett, A.J.G y R.L. Reid. 1961. Reactions in the Rumen. Edward Arnold Publisher. London. 152 p.

- Ellis, L.C. y A.D. Tillman. 1960. Utilization of phytin phosphorus in wheat bran by sheep. *J. Anim. Sci.*, 50:606-607.
- Fiske, C. y E. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biological Chem.*, 66:375-384.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press. New York. 533p.
- McAllister, T.A., L.W. Rode, K.J. Cheng y J.G. Buchanan-Smith. 1992. Effect of formaldehyde-treated barley or escape protein on the ruminal environment and digestion in steers. *Can. J. Anim. Sci.*, 72:317-328.
- Miwa, T., H. Esaci, J. Umemori y T. Hino. 1997. Activity of H^+ -ATPase in ruminal bacteria with special reference to acid tolerance. *Applied Environ. Microbiol.*, 63:2155-2158.
- Raun, A., E. Cheng y W. Burroughs. 1956. Phytate phosphorus hydrolisis and availability to rumen microorganisms. *J. Agr. Food Chem.*, 4:869-871.
- Reddy, N.R., S.K. Sathe y D.K. Salunkhe. 1982. Phytases in legumes and cereals. *Advances in Food Chemistry*, 1-92.
- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1998. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrics Approach*. 2^{da} Ed. McGraw-Hill. New York, USA. 622pp.
- Yanke, L.J., H.D. Bae, L.B. Selinger y K.J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiol.*, 144:1565-1573.