

Indicadores correlacionados con la fuerza del inóculo de heces bovinas en la producción de gas *in vitro*

Alejandra Cubillos Cerquera*, Silvio J. Martínez Sáez**, Redimio M. Pedraza Olivera**, Marlene León González**, Cecilia E. González Pérez** y Guillermo Barreto Argilagos**

* Estudiante colombiana, graduada de máster en Producción Animal Sostenible, Mención Bovino en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba

** Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba

silvio.martinez@reduc.edu.cu

RESUMEN

Una de las limitaciones del uso de heces bovinas como inóculo en la producción de gas *in vitro* es la variabilidad de su fuerza. La existencia de indicadores de rápida determinación que caractericen y controlen la fuerza del inóculo podría mejorar la confiabilidad de su uso. El presente trabajo se trazó como objetivo encontrar la relación existente entre la densidad óptica y la biomasa de las células lavadas, y la viscosidad de la mezcla inóculo + medio mineral, con el volumen de gas *in vitro* producido, en una muestra determinada. Se trabajó con un patrón de *P. maximum* con probada homogeneidad. El lavado de las células se llevó a cabo por centrifugación a 1 000 rpm. Como medida de la viscosidad se utilizó el tiempo de vaciado de una jeringa. Existe correlación significativa ($P < 0,01$) entre el volumen de gas producido a las 48 h y la densidad óptica de las células lavadas medida a 550 nm, así como con su biomasa. No se encontró correlación con la viscosidad de la mezcla. Se sugiere la posibilidad de utilizar la densidad óptica, relativamente fácil de medir, para controlar la fuerza del inóculo mediante cambios en su nivel de dilución.

Palabras clave: producción de gas, heces, indicadores, densidad óptica, biomasa

Indicators Correlation with Bovine Feces Inoculum for Gas *in vitro* Production

ABSTRACT

Using bovine feces as inoculums for gas *in vitro* production poses a limitation concerning the inoculum power variability. Thus, finding indicators to fastly characterize and control the inoculum power could make it more reliable. This paper is aimed at determining the relationship of washed cells optical density and biomass, and inoculums + mineral medium mixture viscosity with gas *in vitro* volume. Cells were washed by centrifugation at 1 000 rpm. Viscosity was measured by the time a syringe is emptied. A significant correlation ($P < 0,01$) was detected between gas *in vitro* volume produced during 48 h and washed cells optical density and biomass value of 550 nm. No correlation was found for mixture viscosity. Results suggest the possibility of using optical density at different dilution levels to control inoculum power. Optical density is fairly easy to measure.

Key Words: gas production, feces, indicators, optical density, biomass

INTRODUCCIÓN

Cada día es un reto para los investigadores lograr métodos que sean rápidos, confiables, económica y bioéticamente sostenibles para evaluar los alimentos de los rumiantes. Con este fin se han utilizado múltiples técnicas, dentro de ellas ha sido de gran interés entre los nutricionistas la producción de gas *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas que se produce durante el proceso fermentativo (Peraza, 2001 y Rymer *et al.*, 2005).

Las heces bovinas se utilizaron como inóculo. Esto mostró resultados similares a los obtenidos con el uso de líquido ruminal y sin el estrés y posible daño que trae consigo el canularlos. Como importante limitación del uso de heces está la influencia que el animal donante del inóculo tiene sobre el volumen de gas producido (Martínez *et al.*, 2005). Rymer *et al.* (2005) recomiendan que la variante para contrarrestar el efecto del inóculo sería encontrar una forma de estandarizar su fuerza con algún indicador de rápida y fácil medición que lo caracterice. Resulta necesario entonces trabajar en la búsqueda de indicadores que de alguna ma-

nera representen la fuerza del inóculo al correlacionarse con el volumen de gas producido.

Entre los posibles indicadores a estudiar se encuentran: 1. la densidad óptica de la suspensión de microorganismos (células lavadas) después de centrifugada la mezcla (Elías *et al.*, 2005); 2. la biomasa seca de dichas células; 3. el tiempo de vaciado de un cilindro como una medida de la viscosidad (Rodríguez *et al.*, 1989).

El trabajo tuvo como objetivo determinar la relación existente entre la densidad óptica y biomasa de las células lavadas y el tiempo de vaciado como medida de la viscosidad del inóculo, con el volumen de gas *in vitro* producido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una muestra patrón homogénea de hojas y tallos de *Panicum maximum* cv. Likoni (Guinea) con aproximadamente 60 días de rebrote, seca y molida hasta 1 mm.

La técnica de producción de gas *in vitro* empleada, parte de los principios establecidos por Menke *et al.* (1979) con el uso de jeringas de cristal de 100 ml de capacidad (FORTUNA®, Häberle Labortechnik, Alemania) y apreciación de 1 ml para determinar la producción de gas, modificada para utilizar como inóculo heces bovinas recién depuestas que se disolvieron en medio mineral amortiguado (mma) en proporción 1+3.

El procesamiento de la muestra, la prueba de homogeneidad y la técnica de producción de gas con heces bovinas las describe Martínez (2008).

El lavado de las células se basó en los principios de la centrifugación diferenciada (Elías *et al.*, 2005). Porciones de la mezcla de heces diluidas 1 + 3 con mma y filtradas por malla de Dederón Mesh 20, fueron diluidas 50 veces. La mezcla así obtenida se depositó en los tubos de centrifuga previamente tarados, de cuatro en cuatro. Se centrifugaron a 1 000 rpm durante 10 min ; de esta primera centrifugación se obtuvo el sobrenadante con las células sin partículas gruesas que sería utilizado para medir la densidad óptica; el pellet obtenido se descartó. La mitad de cada uno de los sobrenadantes se volvió a centrifugar, esta vez a 6 000 rpm por 15 minutos para producir los blancos que servirían para restar de la DO la absorción de luz debida a pigmentos disueltos. El pellet de esta segunda centrifugación se utilizó para determinar la biomasa. Los tubos, con el pellet de células lavadas, se secaron en estufa a 105 °C durante dos horas. El por ciento de biomasa se-

ca fue calculado tomando como base la masa de la mezcla 1+3 llevada al tubo de centrifuga inicialmente.

La DO se determinó a 550 nm con el uso de un Espectrofotómetro Spekol 1 con lectura analógica y micrómetro para seleccionar la longitud de onda, y dos cubetas de vidrio de 1 cm de espesor. Para cada grupo de muestras a medir, el instrumento se calibraba con agua destilada como blanco y una solución 0,1 mol/L de dicromato de potasio, empleado como patrón interno para contrarrestar la posible existencia de errores sistemáticos debidos al instrumento.

El tiempo de vaciado como medida de la viscosidad se determinó para las heces diluidas 1+3 con el mma. Se vertieron 100 mL de la mezcla en una jeringa de cristal, y se tapó con el dedo su parte inferior. Se liberó la salida y con la ayuda de un cronómetro de precisión 0,1 para medir el tiempo de vaciado. El procedimiento de medición fue repetido cuatro veces para cada inóculo.

Los estudios de correlación y regresión lineal se llevaron a cabo con el programa SYSTAT versión 7 (1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación con la densidad óptica y el por ciento de biomasa

Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo. Otras partículas presentes también lo hacen. En la Fig. 1 se muestra que hay correlación significativa entre la densidad óptica y el volumen producido a las 48 horas. Aguirre (2009) enfatiza que un cultivo microbiano actúa como una suspensión coloidal con capacidad de absorber luz en dependencia de su concentración.

Dada la magnitud de la fase lag, cuando se usan heces depuestas, los valores de volumen de gas producidos a las 24 horas, resultan tener coeficientes de variación demasiado altos (mucho mayores que el 5 %) debido a que este tiempo está dentro de la fase de crecimiento logarítmico de los microorganismos, y pequeños cambios en la fase lag, generan grandes cambios de volumen producido. Por otro lado, los vo-

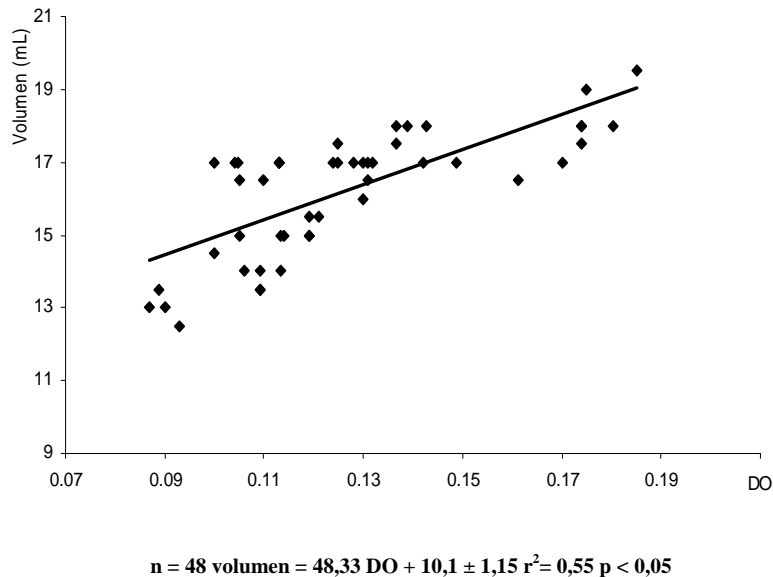


Fig. 1. Volumen de gas producido y la densidad óptica de las células lavadas

lúmenes medidos a las 72 horas o más, suelen ser menos sensibles a los cambios de inóculo porque para este tiempo ha disminuido su influencia y predomina la influencia de la muestra (Martínez *et al.*, 2005), por lo que se utilizó el volumen a las 48 horas.

El por ciento de biomasa seca de las células lavadas puede considerarse una medida de la cantidad de células presentes en el inóculo, y este a su vez, una medida de la fuerza del inóculo (Anón, 2009).

En la Fig. 2 se refleja la relación entre el volumen de gas producido a las 48 horas y el por ciento de biomasa de las células. Los datos del análisis de regresión muestran un buen nivel de correlación positiva a pesar de que la pendiente no es muy pronunciada.

Las correlaciones obtenidas (Figs. 1 y 2) sugieren la posibilidad de utilizar la densidad óptica de las células lavadas o la biomasa, como indicadores que permitan mitigar en alguna medida el efecto del inóculo al estandarizar su fuerza mediante cambios en los niveles de dilución. La masa de inóculo para una cantidad de mma sería inversamente proporcional a la densidad óptica de sus células lavadas. De esta manera podría estandarizarse el método para que haya siempre una biomasa celular dada, lo que disminuiría el efecto de la variabilidad en la concentración de microorganismos en las heces.

Relación con el tiempo de vaciado como medida de la viscosidad

Una de las técnicas más antiguas utilizadas en la caracterización de materiales poliméricos en solución es la viscosimetría (Rodríguez *et al.*, 1989). Se sustenta en el hecho de que la presencia de partículas disueltas o suspendidas en un líquido producen cambio en las propiedades de flujo del sistema. Sin embargo, del análisis de regresión para el tiempo de vaciado vs. volumen de gas acumulado se obtiene que, para las condiciones dadas, no hay correlación significativa ($p = 0,128$) entre ambos; por lo que es necesario cambiar las condiciones experimentales pues de la forma en que se trabajó el inóculo, ya diluido 1+3, puede enmascarar el efecto de la compactación inicial de las heces.

CONCLUSIONES

Existe correlación significativa positiva entre el volumen de gas producido para 48 h y los indicadores: biomasa de las células lavadas medidas a 550 nm y densidad óptica de dichas células, lo que sugiere la posibilidad de utilizar este indicador, de relativamente fácil medición, para controlar la fuerza del inóculo mediante cambios en su nivel de dilución. No se encontró, sin embargo, correlación significativa entre la viscosidad de la mezcla y su fuerza como inóculo.

RECOMENDACIONES

Utilizar la densidad óptica de células lavadas, como alternativa, en la corrección de las diferencias entre inóculos en la técnica de gas in vitro con heces bovinas depuestas.

Estudiar la influencia de la viscosidad de las heces antes de ser diluidas, con el uso de un viscosímetro.

REFERENCIAS

- AGUIRRE, A. (2009). *Métodos para evaluar comportamiento de biomasa en función del tiempo*. Extraído el 25 de noviembre de 2009, desde www.scribd.com/doc/23528392/peso-seco.
- ANÓN. (2009). *Biología celular, centrifugación y electroforesis. Técnicas de fragmentación y separación*

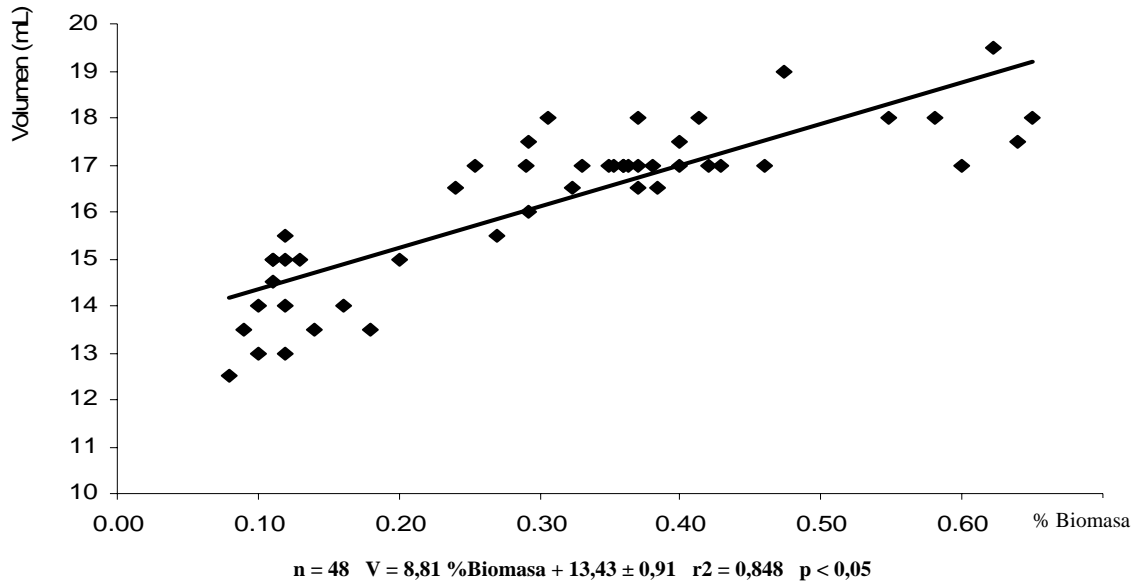


Fig. 2. Relación entre volumen (ml) y el por ciento de biomasa seca de células lavadas

de los componentes de las células. Extraído el 26 de octubre de 2009, desde http://bibmed.ucla.edu/ve/edocs_bmucla/MaterialDidactico/Micro/ActividadPractica.pdf.

ELÍAS, A. A.; ORTIZ, A.; VALDIVIE, M. y HERRERA, F. (2005). Influencia del tipo de cama en la digestibilidad *in vitro* de pollinazas determinada por células lavadas sin líquido ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39 (4).

MARTÍNEZ, S. J. (2008). *Heces vacunas depuestas como inóculo en la técnica de producción de gases para la valoración nutritiva in vitro de forrajes*. Tesis de doctorado en Ciencias Veterinarias, Universidad de Camagüey, Cuba.

MARTÍNEZ, S. J.; PEDRAZA, R.; GONZÁLEZ, E., LÓPEZ, M. y GUEVARA, G. (2005). Influence of the Donor Animal on the *In Vitro* Gas Production with the Use of Voided Bovine Faeces. *Livestock Research for Rural Development*, 17. Extraído el 12 de enero de 2009, desde <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/11/mart17129.htm>.

MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D. y SCHNEIDER, W. (1979). The Estimation of the Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feedingstuffs from the Gas Production when they are Incubated with Rumen Liquor In Vitro. *J. Agric. Sci.*, 93: 217-222.

PEDRAZA, R. M. (2001). Estimación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes con énfasis en las técnicas *in sacco* y de producción de gas *in vitro*. *Rev. Prod. Anim.*, 3 (1): 45-51.

RODRÍGUEZ, T.; MONTIEL, C. y ROMO, U. (1989). Viscosímetro de cilindros concéntricos de extremadamente bajos esfuerzos de corte. *Revista Mexicana de Física*, 35 (2). 211-281.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A., WILLIAMS, B. A. y GIVENS, D. I. (2005). *In Vitro* Cumulative Gas Production Techniques: History, Methodological Considerations and Challenges. *Animal Feed Science and Technology*, pp. 9-30.

Recibido: 12-7-2009

Aceptado: 2-9-2009