

# EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS ACÉTICO, BUTÍRICO Y PROPIÓNICO EN EL CO-CULTIVO: *ASPERGILLUS ORYZAE*- *BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS*.

## EVALUATION OF THE CONCENTRATION OF THE ACETIC, BUTYRIC AND PROPIONIC ACIDS IN THE CO-CULTURE: *ASPERGILLUS ORYZAE*- *BUTYRIVIBRIO FIBRISOLVENS*.

LARA MANTILLA C.<sup>1</sup>

### **PALABRAS CLAVES:**

Bacteria celulolítica, hongo no ruminal, probiótico

### **KEYWORDS:**

Cellulolytic ruminal bacteria, non-ruminal fungi, probiotic.

### **RESUMEN**

*Se realizó un estudio en co-cultivo entre el hongo Aspergillus oryzae y la bacteria ruminal celulolítica Butyrivibrio fibrisolvens, cuyo objetivo fue determinar “in vitro” el efecto del hongo sobre la producción de los ácidos acético, propiónico y butírico por parte de la bacteria. El medio de cultivo se preparó utilizando líquido ruminal filtrado, centrifugado, autoclavado y diluido al 40% con agua, y 0,05 p/v de pastos Angleton (Dichamthium aristatum) (Córdoba, Colombia). Las condiciones de cultivo fueron en anaerobiosis, y el tiempo de incubación de 24 horas. A partir del sobrenadante fueron determinadas las concentraciones de los ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases. Se estudiaron dos relaciones bacteria-hongo: 1:1 y 1:3. Como resultado se observó un efecto negativo de Aspergillus oryzae sobre Butyrivibrio fibrisolvens, que se reflejó en la disminución en la producción de ácidos grasos volátiles.*

### **ABSTRACT**

*A study in co-culture between Aspergillus oryzae with the cellulolytic ruminal bacteria Butyrivibrio fibrisolvens was carried out aiming the “in vitro” determination of the effect of the fungi on the production of acetic, propionic and butyric acids by the bacteria. The culture medium was prepared using filtered, centrifuged, autoclaved and ruminal liquid diluted to 40% with water, and 0,05 % p/v of Angleton grass [Dichamthium aristatum] [Cordoba, Colombia]. Culture was performed in anaerobic conditions for 24 hours.*

---

Recibido para evaluación: Abril 7 de 2008. Aprobado para publicación: Julio 10 de 2008

1 Ph.D. Investigadora principal proyecto. Directora GRUBIODEQ. Grupo de Biotecnología. Departamento de Química. GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba. Km 3 via Cereté. Montería. Córdoba. Colombia.

The concentrations of volatile fatty acids in the supernatant were determined by gas chromatography. Two bacteria-fungi relations were studied: 1:1 and 1:3. The results showed a negative effect of *Aspergillus oryzae* on *Butyrivibrio fibrisolvens* which was reflected in a decrease in the production of volatile fatty acids.

## INTRODUCCIÓN

El hongo no ruminal *Aspergillus oryzae* es un microorganismo que ha sido utilizado como aditivo en la dietas de los rumiantes, habiendo sido considerado como un próbico debido el beneficio observado en la nutrición animal [1], Investigaciones al respecto han mostrado una mayor degradación de los alimentos [2,3], un aumento en la producción de leche y una mejora de su composición, reflejada en mayores porcentajes de grasa, proteína y sólidos disueltos, [1], o una disminución de los síntomas de estrés por calor [4]. Los mecanismos por los que se producen estos efectos no se conocen con exactitud.

Trabajos realizados “*in vitro*” han demostrado que la utilización del hongo permite un mejoramiento en la degradación de la fibra, aumentando la producción de ácidos grasos volátiles [2]. Por otra parte, estudios de interacciones en co-cultivo entre *Aspergillus oryzae* y cepas celulolíticas de *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* han demostrado incrementos en el número de estos microorganismos [5,6, 7] lo cual permite una mayor digestión de la fibra [8,4].

Otro ejemplo de la acción de *Aspergillus oryzae* sobre microorganismos ruminales lo constituye la estimulación del crecimiento “*in vitro*” del hongo celulolítico *Neocallimastix frontales*. En estudios de la Universidad Estatal de Washington, se observó que en presencia del aditivo microbiano, el hongo predominante en el rumen modificaba tanto su forma como fisiología. Se encontró un aumento del 27 % en la población de *Neocallimastix frontales*, incrementos del 37 % de la proteína y aumento del 87 % en la secreción de celulasa [9,10].

Otros ensayos han reportado incrementos en el número de bacterias proteolíticas [7,11] y de bacterias utilizadas de lactato, como *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas lactilytica* y *Selenomonas ruminantium* [6].

Los resultados experimentales obtenidos de los estudios en co-cultivo entre el hongo *Aspergillus oryzae* y diferentes bacterias ruminales han brindado información de los efectos positivos del hongo sobre las bacterias, especialmente las celulolíticas; estas observaciones han

sido tenidas en cuenta a la hora de utilizar el microorganismo como aditivo próbico en la nutrición animal.

En Colombia, los sistemas de producción bovina emplean forrajes en pastoreo como fuente de alimentos debido a su bajo costo; sin embargo, la dependencia del pastoreo tiene como desventajas los efectos de las variaciones climáticas y las condiciones físico-químicas de los suelos. De esta manera, durante las épocas secas se presentan disminuciones importantes en la disponibilidad y calidad del forraje, efecto denominado ‘estacionalidad forrajera’, que reduce la carga animal, los niveles productivos y las tasas de crecimiento. [12,13]. El Departamento de Córdoba, considerado la Capital Ganadera de Colombia, no escapa a la situación planteada.

Teniendo en cuenta la problemática que afronta el sector productivo ganadero, y con miras futuras de obtener un preparado próbico que se ajuste a la necesidades de la zona, se llevó a cabo la presente investigación utilizando microorganismos autóctonos que pertenecen al banco de cepas del laboratorio GRUBIODEQ, y que no corresponden a cepas comerciales de colección, con el fin de obtener respuestas acordes con las condiciones propias de adaptación y demás aspectos influyentes. El objetivo del trabajo fue evaluar en co-cultivo, el efecto del hongo *Aspergillus oryzae* sobre la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico producidos por la bacteria ruminal celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* a dos relaciones microbianas (1:1 y 1:3); lo anterior para establecer la posible existencia de algún efecto positivo en la producción de los ácidos a través del co-cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismos utilizados:** La bacteria celulolítica ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens* y el hongo no ruminal *Aspergillus oryzae*, utilizados en el experimento son cepas nativas que pertenecen al banco de cepas del Laboratorio GRUBIODEQ.

La bacteria fue aislada a partir del contenido ruminal de vacunos de raza Romosinuana fistulados en el rumen. Las muestras extraídas fueron sembradas en medios de cultivo preparados a partir de líquido ruminal filtrado,

centrifugado, autoclavado y diluido al 40% con agua, y 0,05 p/p de pastos Angleton [*Dichanthium aristatum*] (Córdoba, Colombia). Las condiciones de cultivo fueron de anaerobiosis, temperatura de 40 °C y un tiempo de incubación de 24 horas [14].

El hongo *Aspergillus oryzae* fue obtenido a partir de arroz de la siguiente manera: en pequeños frascos de 70 ml de capacidad se preparó un medio de cultivo con 20 g de grano y 40 ml de agua destilada, y se llevó al autoclave durante 15 minutos a 103,42 kPa. Terminado el proceso se dejó enfriar, y sobre el medio se inoculó una pequeña cantidad de granos enteros de arroz provenientes de graneros comerciales y se llevó a incubación a temperatura ambiente (25 °C) durante cinco días. Al finalizar el tiempo se logró el crecimiento del hongo.

La identificación de los microorganismos (bacteria y hongo) se llevó a cabo utilizando métodos tradicionales de observación macroscópica en medios apropiados, y microscópica con tinciones específicas, claves taxonómicas y pruebas bioquímicas [14,15, 16].

#### **Determinación de la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico en el co-cultivo hongo – bacteria:**

En frascos de 70 ml se adicionaron 30 ml de un medio de cultivo preparado a partir de contenido ruminal clarificado al 40% (v/v) y pasto Angleton (*Dichanthium aristatum*) (0,5 % p/v) propio de la zona, ajustando el pH a 6,4; Se inocularon los dos microorganismos en relación 1:1 ( $0,7 \times 10^8$  células viables), en condiciones de anaerobiosis, y el conjunto fue saturado con  $CO_2$ ; los frascos fueron tapados herméticamente e incubados a una temperatura de 40 °C, y durante un tiempo de 24 horas. Cumplido el tiempo de incubación se tomaron 10 ml de sobrenadante, determinándose el pH y la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico por cromatografía de gases, empleando los derivados butil ésteres. [17]. La técnica fue desarrollada, modificada y adaptada a las condiciones del equipo, Cromatógrafo Perkin Elmer. El mismo experimento se repitió cambiando la relación de microorganismos a 1:3 (bacteria –hongo). También se evaluó la concentración de los ácidos producidos por la bacteria celulolítica sola, en el medio sin el hongo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

**Análisis estadístico:** Se realizó un diseño experimental completamente al azar y se aplicó análisis estadístico **SAS**

con prueba de (Tukey) para observar las variaciones en las concentraciones de los ácidos y del valor de pH.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Tabla 1 se resumen los resultados de concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico, al igual que el valor de pH, obtenidos en: a) medio sin microorganismos; b) medio con la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* ( $0,7 \times 10^8$  células viables); (c) medio de cultivo con la bacteria –hongo relación 1:1; y (d) medio de cultivo con la bacteria –hongo relación 1:3. Se utilizaron dos relaciones de microorganismos bacteria –hongo para establecer la incidencia de la concentración del hongo en la producción de los ácidos por parte de la bacteria.

Las concentraciones de los ácidos en el medio de cultivo sin microorganismos, (A), preparado a partir de contenido ruminal clarificado al 40% (v/v) y pasto Angleton (0,5 % p/v) fueron de 30,03, 1,0 y 1,5 mM de acético, propiónico y butírico, respectivamente; estos ácidos están presentes de manera natural en el contenido ruminal. La adición de *Butyrivibrio fibrisolvens* (B) produjo un incremento en la concentración de los ácidos acético (9,8 mM) estadísticamente significativo con respecto al tratamiento (A); no hubo variaciones significativas para la concentración de los ácidos propiónico y butírico ni para el valor del pH. Es de anotar que la concentración de ácido propiónico se mantuvo constante, como era de esperarse, debido a que *Butyrivibrio fibrisolvens* no lo produce.

*Butyrivibrio fibrisolvens* es una bacteria anaerobia habitante normal del rumen que posee un alto número de celulasas; tiene la habilidad para degradar una amplia variedad de sustratos presentes en los forrajes como celulosa, hemicelulosa, xilanos y otros, produciendo butirato y acetato [18,19,20]; por su parte *Aspergillus oryzae* es un hongo no ruminal aerobio que se ha caracterizado por tener una fuente enzimática que produce un amplio efecto benéfico sobre la microbiota ruminal permitiendo la existencias de productos comerciales a partir de esta clase de microorganismo [21].

El co-cultivo entre la bacteria y el hongo, (C) y (D) produjo una disminución en la concentración del ácido acético para ambas relaciones microbianas (1:1 y 1:3), estadísticamente significativa con respecto al tratamiento (B).

**Tabla 1.** Concentración de los ácidos acético, butírico y propiónico en el medio sin microorganismos, con *Butyrivibrio fibrisolvens* y, en el co-cultivo *Butyrivibrio fibrisolvens* - *Aspergillus oryzae* a dos relaciones (1:1) y (1:3). ( $0,7 \times 10^8$  cells). Valores promedios. (Concentration of the acetic, butyric and propionic acids in the medium without microorganisms, with *Butyrivibrio fibrisolvens* and the co-culture *Butyrivibrio fibrisolvens* - *Aspergillus oryzae* (1:1) and (1:3) relations.  $0,7 \times 10^8$  cells. (mean values).

Muestra	Concentración de ácido Acético [mM]	Concentración de ácido Propiónico [mM]	Concentración de ácido Butírico [mM]	pH
Medio de cultivo solo [sin microorganismo] (A)	30,03 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	6,40 <sup>a</sup>
Medio de cultivo con la bacteria celulolítica <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (B)	39,9 <sup>b</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>	6,48 <sup>a</sup>
Medio de cultivo con bacteria-hongo (relación 1:1) (C)	23,9 <sup>c</sup>	1,5 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	6,80 <sup>b</sup>
Medio de cultivo con bacteria-hongo (relación 1:3) (D)	25,3 <sup>c</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	6,77 <sup>b</sup>

El hongo *Aspergillus oryzae* es un microorganismo que produce gran variedad de enzimas (celulasas y hemicelulasas). Este hongo ha originado una serie de modificaciones en el rumen que han permitido mejorar la productividad animal, y por tal razón ha sido utilizado en la dieta de rumiantes [1]. Los ensayos en co-cultivo del hongo con bacterias, especialmente las celulolíticas, han demostrado incrementos en el número de éstas; sin embargo, en la presente investigación *Aspergillus oryzae* no mostró efectos positivos en el co-cultivo con *Butyrivibrio fibrisolvens*.

La disminución observada en la concentración del ácido acético en el co-cultivo bacteria-hongo posiblemente se debe a que esta cepa autóctona de *Aspergillus oryzae* inhiba el crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens*, ya sea porque compite por el sustrato o por que produce

sustancias que limitan la actividad de la bacteria. Es conocido que algunas cepas del hongo no ruminal producen sustancias con un amplio rango de actividad antibacteriana como se observó en una investigación, [6], en la que se midió el efecto del extracto del hongo *Aspergillus oryzae* sobre el crecimiento de bacterias ruminales entre ellas, *Butyrivibrio fibrisolvens*, encontrándose que el crecimiento de esta bacteria al igual que el de otras 9 disminuyó de las 19 estudiadas. La disminución del crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* en presencia de *Aspergillus oryzae* sugiere que la producción de los ácidos producidos por la bacteria se ve afectada negativamente por la presencia del hongo tal como se demostró en la presente investigación utilizando microorganismos nativos. Este hecho puede explicar la disparidad encontrada en los resultados de investigación con este hongo. A este respecto, y aunque

es reconocido como probiótico y utilizado actualmente, existen estudios en los cuales no se observa efecto alguno de la adición de *Aspergillus oryzae* a la alimentación de rumiantes [4].

El estudio sobre efectos de interacción en co-cultivo ha permitido el conocimiento de poblaciones microbianas con potencial benéfico en el aprovechamiento de la dieta; esto ha propiciado el uso de microorganismos (Probióticos) como suplemento para mejorar la nutrición animal.

Aunque en el presente trabajo no se observó un efecto positivo de la adición del hongo *Aspergillus oryzae* sobre la producción de ácidos grasos volátiles por parte de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens*, ello no quiere decir que en condiciones diferentes a las del presente experimento hubieran podido obtenerse resultados diferentes, por lo que parece necesario realizar más investigaciones al respecto, utilizando otras cepas de bacterias celulolíticas autóctonas. El conocimiento de los posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre especies microbianas constituye una base para el desarrollo de productos eficaces que puedan incorporarse en la alimentación animal como probióticos, y adaptados a las condiciones y razas de animales propios de la zona de estudio.

## CONCLUSIÓN

La interacción en co-cultivo entre el hongo no ruminal *Aspergillus oryzae* y la bacteria ruminal celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* no favoreció la producción de los ácidos acético, butírico o propiónico, a las condiciones de experimentación.

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para los ácidos : acético, propiónico, butírico y pH

Medidas con la misma letra no son significativamente diferentes. Tukey (a, b, c P<.0001)

## REFERENCIAS

- [1] CASTRO, M.; VINATEA J. 2001. Probióticos en la alimentación del ganado vacuno lechero. Bovis 98, 27-32.
- [2] FONDEVILA, M.G.; NEWBOLD, J ; HOTTEN, P.H.; ORSKOV, E.R. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw. Anim. Prod. 51: 422-425.
- [3] FRUMHOLTZ, P.P.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique [Rusitec]. J. Agric. Sci. [Camb.] 113:169-172.
- [4] BERTRAND, J. A.; GRIMES, L. W. 1997. Influence of tallow and *Aspergillus oryzae* fermentation extract in dairy cattle rations". J. Dairy Sci. 80:1179-1184.
- [5] VAREL, V.H.; KREIKEMEIR, K; JACHIM H; JUMP, G; HATFIELD R.D. 1993 In vitro stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. Appl, Environ. Microbiol. 59:3171-3176.
- [6] BEHARKA A A. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria", J Dairy Sci, 81:1591-1595.
- [7] BEHARKA A.A. 1991. Performance and Ruminant Function Development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract, J Dairy Sci, 74: 4326- 4331.
- [8] GÓMEZ A. R.; DUDAS, A.; HUBER, J.T. 1991. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. J. Dairy Sci, 73:703-710.
- [9] HARPER, E; WELCH, R; CONTRERAS, D; Chang, J; Calza, R. 1996. The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis* EB 188, *Piromyces communis* DC 193 and *Orpinomyces* ssp. RW 206: generalized effects and component analysis. App. Microbiol and Biotechnol. 45:817-821.
- [10] SCHMIDT, A; CALZA, R; ALBRIGHT, S; CHANG G; 2004. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. Part 1. Zoospore development and physiology. App. Microbiol and Biotechnol. 63: 422-430.
- [11] YOON, I. K., and M. D. Stern. 1996. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: A review. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 8:533-538.
- [12] SÁNCHEZ, L 2004 (a). Nuevas estrategias para conservación de forrajes en el trópico. Primera Reunión de la Red Temática de Recursos Forraje-

- ros. Conrpoica, Tibaitatá. Memorias. Mosquera, Junio 15 pp.
- [13] SÁNCHEZ, L. 2005 (b). Estrategias modernas para la conservación de forrajes en sistemas de producción bovina. Revista Corpoica, 6:69-80.
- [14] Merck Laboratorio, 1994. Manual de cultivos.
- [15] BERGEY'S. 1994. Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. Edited by John G. Holt Copyright Williams & Wilkins, Baltimore ISBN 0-683-00603-7. **New York; EE UU.**
- [16] BARNETT H.L.; HUNTER B.B. 1998. Illustred Genera of Imperfect Fungi. Ed 4a. Edited by APS PRESS. Minnesota .p 94
- [17] SALANITRO J. P. 1975 .Quantitative Method for the Gas-Chromatography Analysis of Short-Chain Monocarboxylic and Dicarboxylic Acids in Fermentation Media”, Applied Microbiology 29: 374-378.
- [18] HESPELL R. B, 1987 .Fermentation of Xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other Ruminal Bacteria. Appl. Envirom .Microbiol, 53: 2849-2853.
- [19] MAROUNER M. 1994. Utilization of Glucose and Xylose by Ruminal Strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*. Appl. Envirom. Microbiol. 60: 738-744.
- [20] COTTA, M. A. 1995. Degradation and utilization of Xylan by the Ruminal Bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium* “, Appl. Environ .Microbiol, 61: 4396-4401.
- [21] MUIRHEAD, S. 1996. Direct feed microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium 3rd edn. The Miller Publishing Company, Minnetonka, Minnesota, 391 pp