



Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. Revisión



Ezequias Castillo-Lopez^{a*}

María G. Domínguez-Ordóñez^b

^aFacultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Estado de México.

^bDepartamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia: ezequias@huskers.unl.edu

Resumen:

La proteína microbiana sintetizada en el rumen es la fuente principal de proteína metabolizable, por lo que la correcta estimación de su flujo al intestino es esencial en la nutrición de los rumiantes. El objetivo de esta revisión es describir la composición microbiana, los principales factores que afectan su rendimiento y los métodos para medir la proteína microbiana y su contribución al aporte intestinal. Se incluye el uso de técnicas moleculares novedosas para dilucidar el microbioma y mejorar los métodos para medir la proteína microbiana. El microbioma ruminal está conformado por bacterias, protozoarios, hongos y arqueas. Los principales factores que afectan la síntesis de proteína microbiana son la disponibilidad de los carbohidratos, la proteína degradable, la grasa, y el pH ruminal. Los marcadores microbianos principales son las purinas, el ácido diaminopimélico y el isótopo de nitrógeno; además, se está probando el uso del ADN, mediante una PCR en tiempo real, para medir la proteína proveniente de bacterias, protozoarios y levaduras. La mayor dificultad en la estimación del flujo intestinal de proteína microbiana ha sido obtener pellets microbianos representativos del contenido ruminal, que son usados como referencia para establecer la relación marcador/nitrógeno. El análisis filogenético con secuenciación masiva de ADN ha revelado diferencias taxonómicas entre bacterias del fluido ruminal y la digesta

intestinal. El fluido ruminal contiene menos *Fibrobacteres* y *Proteobacterias*, y contiene más *Firmicutes* que la digesta intestinal. Esto demuestra la necesidad de desarrollar métodos eficaces de colección de bacterias para obtener pellets microbianos representativos, y evitar sesgos en la estimación de la proteína microbiana y su contribución al aporte intestinal de proteína metabolizable.

Palabras clave: Proteína microbiana, Proteína metabolizable, Marcador, Rumen, ADN.

Recibido: 04/07/2017

Aceptado: 06/03/2018

Introducción

La proteína metabolizable es la proteína verdadera que el intestino absorbe y que es proporcionada por la proteína microbiana, la proteína no degradable en el rumen y, en menor medida, la proteína (endógena) eliminada⁽¹⁾; la proteína microbiana normalmente representa la principal fuente de suministro de proteína metabolizable^(2,3). Cuando esta proteína se absorbe, puede ser utilizada para el mantenimiento, el crecimiento, la reproducción o la lactación. Por lo tanto, es importante que los nutriólogos comprendan la naturaleza del flujo de proteína microbiana al intestino delgado, así como los factores que lo afectan y los métodos adecuados para calcularlo. Se han utilizado diversos métodos para estimar la síntesis de proteína microbiana, incluyendo el análisis de las purinas⁽⁴⁾, el método del ácido diaminopimélico y la incorporación isotópica a las células microbianas⁽⁶⁾. Los recientes avances en las técnicas moleculares han permitido estimar la proteína microbiana utilizando ADN microbiano a través de la PCR en tiempo real^(3,7,8), que es particularmente importante cuando las raciones incluyen ingredientes que contienen ADN de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, como los de la industria del etanol⁽⁹⁾ o cuando los investigadores necesitan calcular el aporte de los protozoarios a la proteína microbiana total⁽⁷⁾.

La cuantificación de la proteína microbiana requiere de que se aíslen del rumen los pellets microbianos, que se utilizan como referencia para establecer la relación marcador microbiano:nitrógeno. Sin embargo, si los pellets de referencia aislados no son representativos de todo el contenido ruminal, su estimación estará sesgada⁽¹⁰⁾. Las diferencias

entre las bacterias asociadas a los sólidos y las bacterias asociadas al líquido se han dado por sentado desde hace mucho tiempo⁽¹¹⁾; sin embargo, en buena medida las diferencias filogenéticas detalladas entre estas fracciones han permanecido desconocidas. El uso de tecnología de punta como la secuenciación masiva del ADN microbiano de alto rendimiento, en combinación con la bioinformática^(12,13), ha proporcionado nuevos conocimientos de la microbioma ruminal y han revelado diferencias drásticas entre las bacterias asociadas al líquido y las asociadas a los sólidos⁽¹⁴⁾.

Los estudios han comparado el uso de marcadores microbianos convencionales^(4,11,15) o factores que afectan el crecimiento microbiano. Además, informes recientes han evaluado las ecuaciones para predecir el flujo post-ruminal de proteína microbiana^(16,17,18). Sin embargo, hasta donde saben los autores, no existen estudios que integren los avances recientes y los hallazgos derivados del uso de técnicas moleculares en la microbiología ruminal, ni que mejoren la comprensión de los factores que afectan la síntesis de proteína microbiana y su aportación a la proteína metabolizable, o de los procedimientos adecuados para cuantificarla.

Por ello, el objetivo de esta reseña es describir la composición de la proteína microbiana que fluye al intestino, los principales factores que afectan su rendimiento y los métodos para estimarla. Además, se analiza el uso de la secuenciación de ADN de alto rendimiento para mejorar nuestra comprensión del microbioma, así como los factores que afectan la cuantificación de la proteína microbiana ruminal y su flujo al intestino delgado.

Los microorganismos ruminales y su importancia

El ambiente anaeróbico reducido que existe en el rumen permite el desarrollo de distintos tipos de microbios compuestos principalmente de bacterias, protozoarios, hongos y arqueas^(19,20).

Bacterias

En 1944⁽²⁰⁾ se habían cultivado unas 200 especies de bacterias. Informes recientes que utilizan la secuenciación de ADN de alto rendimiento han revelado la presencia de 13 principales filos en el rumen, que incluyen 40 órdenes bacterianos, alrededor de 80 clases de bacterias, y por lo menos 180 familias bacterianas, unos 320 géneros de bacterias y más de 2,000 unidades taxonómicas bacterianas operativas^(21,14). La densidad bacteriana en el rumen

se encuentra en el rango de 10^7 a 10^{10} células/ml de líquido ruminal. Los filos bacterianos más abundantes son *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, que incluyen por lo menos el 75 % de la población bacteriana total. El género de bacterias ruminales más abundante es *Prevotella*, que representa aproximadamente el 20 % de la comunidad bacteriana^(14,22,23).

Protozoarios

Se han identificado más de 20 especies de protozoarios⁽²⁰⁾, cuya concentración en el rumen es de aproximadamente 10^6 células/ml. Si bien el número de géneros de protozoarios es menor que el de los de las bacterias, los protozoarios son físicamente más grandes que las bacterias y pueden constituir aproximadamente la mitad de la biomasa microbiana ruminal total⁽¹⁹⁾. El nitrógeno protozoario oscila entre 4.8 y 12.7 % en el rumen, y entre 5.9 y 11.9 % en el duodeno^(3,7). Nuevos reportes que utilizan la secuenciación del ADN de alto rendimiento han demostrado que los géneros protozoarios predominantes son *Entodinium*, *Epidinium*, *Metadinium*, *Diploplastron*, *Polyplastron* y *Diplodinium*⁽²⁴⁾. Más del 90 % de la población de protozoarios en el rumen pertenece a la clase *Litostomatea*, que incluye dos grupos: *Haptoria* y *Trichostomatia*. La subclase *Trichostomatia* comprende al género *Entodinium*, uno de los más estudiados, que constituye entre el 89 y el 91 % de la población protozoaria⁽²⁴⁾.

Hongos

Se han encontrado asociaciones de los hongos con las fracciones más lentamente digeridas de las plantas, y los hongos actúan como colonizadores iniciales de la lignocelulosa e incrementan la velocidad a la cual las bacterias digieren la fibra dietaria al alterar las paredes lignificadas de las células de las plantas⁽¹⁹⁾. Son pequeños organismos flagelados. En un principio se los clasificó erróneamente como protozoarios flagelados; no obstante, después se observó que esos flagelados eran zoosporas fúngicas que llegaron a colonizar las superficies de las plantas para producir un micelio. El micelio da origen a esporangias que liberan más zoosporas, y el ciclo continúa. Los hongos incrementan su tiempo de residencia adheriéndose a partículas de alimento. Por este motivo ha sido difícil calcular su biomasa en el contenido ruminal⁽²⁰⁾. Recientemente, la secuenciación del ADN ha revelado la presencia de 5 principales filos fúngicos, que incluyen 55 géneros de hongos. Los géneros predominantes son *Ascomycota* (27 %), *Basidiomycota* (3 %) y *Neocallimastigomycota* (1 %)⁽²⁵⁾.

Arqueas

La población de arquea incluye microorganismos que se creía eran bacterias. Sin embargo el análisis molecular de su ADN ha revelado que pertenecen a un dominio diferente⁽²⁶⁾. La densidad de las arqueas en el rumen no ha sido determinada con precisión. Estos microorganismos desempeñan un papel especial en la eficiencia alimenticia porque participan en la formación de metano, la cual utiliza dióxido de carbono e hidrógeno⁽²⁷⁾. Debido a que el metano emitido al medio ambiente contribuye al calentamiento global, uno de los principales objetivos de las prácticas para reducir los gases de efecto invernadero en el ámbito de la ganadería es disminuir la producción de este gas por los rumiantes⁽²⁸⁾. Los recientes hallazgos respecto a la secuenciación de ADN de alto rendimiento han revelado que el filo arqueal más abundante en el rumen es *Euryarchaeota*, que constituye el 99 % de la población de arqueas ruminales. Se han detectado diez géneros de arqueas en el rumen, y el género más abundante es *Methanobrevibacter*, que representa aproximadamente el 91 %⁽²⁶⁾.

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido la importancia de la proteína microbiana sobre el estado nutricional de los rumiantes por ser una de las principales fuentes de proteína metabolizable⁽¹⁹⁾. Las bacterias ruminales y los protozoarios aportan la mayoría de la proteína metabolizable que llega al duodeno. La proteína microbiana sintetizada en el rumen satisface por lo menos el 50 % de los requerimientos de proteína metabolizable de los rumiantes en diversos estados de producción^(1,29,30). Bajo la mayoría de las condiciones alimentarias, la proteína microbiana equivale a entre el 50 y el 85 % del nitrógeno total de aminoácidos que entra en el intestino delgado⁽⁵⁾. Otros estudios sugieren que la proteína microbiana sintetizada en el rumen aporta entre el 40 y el 90 % de la proteína que llega al intestino delgado, a pesar de que hasta un 50 % de la proteína microbiana sintetizada podría degradarse a nitrógeno de amoníaco en el rumen⁽³⁰⁾. Además, la aportación relativa de proteínas microbianas que llegan al intestino delgado depende principalmente de la calidad y solubilidad del nitrógeno ingerido. Esta aportación puede oscilar entre 1,262 y 2,137 g/d en la vaca lechera adulta, y entre 473 y 1,300 g/d en el ganado de carne; adicionalmente, se ha encontrado que la concentración de proteínas microbianas en la digesta duodenal del ganado ovino varía de 130 a 162 mg/g MS (Cuadro 1).

Cuadro 1: Datos comparativos de la proteína microbiana que llega al intestino delgado medida con diversos métodos

Fuente	Marcador utilizado¹	Tipo de animal	Proteína microbiana que llega al duodeno
Glenn <i>et al.</i> ⁽⁸⁶⁾	BP	Novillos Holstein	1,093 g/d
Ipharraguerre <i>et al.</i> ⁽⁸⁹⁾	BP	Ganado lechero	1,825 g/d
Cooper <i>et al.</i> ⁽⁸⁵⁾	BP	Ganado de carne	1,300 g/d
Sylvester <i>et al.</i> ⁽⁸³⁾	rADN	Ganado lechero	1,693 g/d
Schwab <i>et al.</i> ⁽⁹⁰⁾	NM	Ganado lechero	2,137 g/d
Moorby <i>et al.</i> ⁽⁸⁸⁾	Citosina	Ganado lechero	944 g/d
Hristov <i>et al.</i> ⁽⁸⁴⁾	NM	Ganado lechero	1,906 g/d
Leupp <i>et al.</i> ⁽⁸⁷⁾	BP	Ganado de carne	545 g/d
Belanche <i>et al.</i> ⁽⁸⁾	BP	Ovejas	162 mg/g MS
Belanche <i>et al.</i> ⁽⁸⁾	rADN	Ovejas	130 mg/g MS
Castillo-Lopez <i>et al.</i> ⁽⁵⁾	DAP	Ganado de carne	473 g/d
Castillo-Lopez <i>et al.</i> ⁽⁵⁾	rADN	Ganado de carne	561 g/d
Castillo-Lopez <i>et al.</i> ⁽³⁾	BP	Ganado lechero	1,881 g/d
Castillo-Lopez <i>et al.</i> ⁽³⁾	rADN	Ganado lechero	1,262 g/d

BP= Bases de purina; DAP= Ácido diaminopimélico; NM= Nitrógeno marcado (¹⁵N).

Además, los microbios ruminales son una importante fuente de otros nutrientes para los rumiantes⁽³¹⁾. Los principales componentes químicos de los microorganismos ruminales son el nitrógeno, los carbohidratos, los lípidos y la ceniza⁽³²⁾ (Cuadro 2). El contenido de materia orgánica, nitrógeno y aminoácidos de las diversas bacterias mezcladas en el rumen se incrementa reduciendo la proporción de forraje en la dieta⁽¹⁹⁾. Estas variaciones podrían deberse a la diferencia en la especie de bacterias resultantes de diferentes dietas⁽³³⁾. Recientemente la secuenciación del ADN de alto rendimiento ha confirmado esta hipótesis⁽²¹⁾. Se ha observado un incremento de la materia orgánica y de las concentraciones de nitrógeno de la población protozoaria en respuesta a un aumento de la cantidad de almidones en la dieta⁽¹⁹⁾, el cual puede obedecer a cambios en la comunidad protozoaria, recientemente confirmada utilizando métodos moleculares⁽³⁴⁾.

Table 2: Composición de nutrientes de los microorganismos ruminales⁽³⁰⁾ aislados mediante la centrifugación

Contenido de nutrientes (g/kg MS)	Fracción centrífuga		
	A ¹	B ²	EEM ³
Humedad	62	50	2.3
Nitrógeno	100	103	1.6
Carbohidrato	91	93	7.1
Lípido	92	94	6.7
Ceniza	116	98	4.0

¹Sobrenadante centrifugado a 19,000 ×g durante 8 min que se considera contiene la mayor parte de microorganismos.

²Sobrenadante re-centrifugado a 19,500 ×g durante 15 min que se considera recoge prácticamente todo el resto de los microorganismos.

³Error estándar de la media.

Factores que influyen en la síntesis de la proteína microbiana ruminal

El crecimiento microbiano ruminal depende de su capacidad de degradar y fermentar los ingredientes del alimento. Las células bacterianas tienen diversos sistemas de transporte para absorber los nutrientes de bajo peso molecular y solubles como los azúcares⁽³⁵⁾. Debido a que los ingredientes del pienso están compuestos principalmente de polímeros complejos tales como almidón, proteína y celulosa, estos polímeros son primero degradados por enzimas extracelulares a sustancias de bajo peso molecular que son utilizadas luego por las bacterias. La cantidad de rendimiento bacteriano *in vivo* oscila entre 1.9 y 3.0 mg por cada 100 mg de materia orgánica verdaderamente digerida⁽³⁶⁾. Algunos de los principales factores que influyen en la síntesis de proteína microbiana ruminal incluyen la disponibilidad de carbohidrato alimentario, de proteína degradable en el rumen, de grasa alimentaria, del pH ruminal y de la ingesta de pienso⁽³⁷⁾. El modelo utilizado para predecir el flujo de proteína microbiana (g/d) al intestino delgado se relaciona con los nutrientes digeribles totales, $MN = 0.0166TNDkg^{(38)}$, o con la ingesta de MCP = $0.087TDN + 42.73^{(18)}$.

Efectos de los carbohidratos del alimento

La utilización eficiente de los nutrientes alimenticios degradados requiere que la materia orgánica alimentaria se fermente a un ritmo que corresponda con las capacidades de síntesis de los microbios ruminales. Los carbohidratos fácilmente disponibles, como el almidón, son eficaces para incrementar la utilización de los nutrientes degradados y el crecimiento microbiano⁽³⁹⁾. Además, existe un incremento del crecimiento microbiano en los cultivos continuos (15.0 a 19.5 g de proteína microbiana/100 g MS digeridos) en respuesta a los crecientes niveles de carbohidratos no estructurales (32 a 49 % de MS)⁽³⁹⁾. Así, el tipo de carbohidratos alimenticios puede influir en el metabolismo bacteriano. El ganado de engorda alimentado con una dieta alta en carbohidratos está prácticamente libre de protozoarios. Sin embargo, otras investigaciones en las que se han utilizado dietas a base de trigo⁽⁴⁰⁾ y de maíz y sorgo⁽⁴¹⁾ han mostrado altas concentraciones de protozoarios en el rumen con dietas altas en granos. Se considera que los cambios en la población bacteriana y de protozoarios debidos al drástico aumento de los almidones alimentarios⁽²¹⁾ pueden deberse a la disminución del pH ruminal⁽³⁸⁾.

Efecto de la proteína degradable en el rumen

En general, los microorganismos del rumen no pueden satisfacer por sí solos los requerimientos de aminoácidos de los rumiantes de alta producción. Por ende, la inclusión de proteínas no degradables en el rumen puede incrementar el suministro total de aminoácidos al intestino delgado y modificar el perfil de aminoácidos del duodeno. No obstante, el hecho de alimentar al ganado con fuentes de proteína de baja degradación también puede limitar la fermentación microbiana, lo que da como resultado una disminución del suministro de energía y de aminoácido microbiano al animal huésped. La degradación ruminal de la proteína alimentaria es un proceso que depende del tiempo, y la tasa de la degradación en relación con la tasa de paso es una propiedad dinámica crucial que afecta a la cantidad de proteína que escapa del rumen sin haber sido degradada por éste⁽⁴³⁾. Una dieta con 5.3 % de proteína degradable en el rumen incrementa el flujo de nitrógeno bacteriano (415 g/d en contraste con 365 g/d cuando se proporciona una alimentación con 4.8 % de proteína degradable en el rumen)⁽⁴²⁾. Es probable que una mayor cantidad de nitrógeno disponible en el rumen mejore la eficiencia con la que se utiliza la energía, estimulando el

crecimiento de la población bacteriana⁽⁴³⁾. Esto indica que si la energía obtenida de los carbohidratos para el crecimiento microbiano no es limitante, los péptidos y aminoácidos resultantes son utilizados de manera más eficiente para la síntesis de proteínas microbianas. Sin embargo, si los carbohidratos son limitantes, una fracción considerable de la proteína se descompone en amoníaco, que puede eliminarse parcialmente a través de la orina. Así, tendría que haber una coordinación entre la disponibilidad de energía y el nitrógeno en el rumen⁽¹⁵⁾. Recientemente, se han utilizado ecuaciones para predecir la producción de proteína microbiana como una función lineal de la ingesta de proteína degradable ruminalmente en el ganado de leche⁽¹⁷⁾. Además, el ganado de engorda requiere un mínimo de 100 g de nitrógeno soluble/kg de materia orgánica digerida en todo el tracto para maximizar el flujo del nitrógeno microbiano^(44,45).

Efecto de la grasa de la dieta

Si bien desde hace varias décadas se han reconocido los efectos negativos de la grasa de la dieta, los nuevos avances en los métodos moleculares han revelado que los microorganismos ruminales que pertenecen a los géneros *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* y *Prevotella* pueden ser muy sensibles a la grasa^(46,47). Es importante señalar que se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados son tóxicos para las bacterias ruminales, especialmente para aquellas que digieren la fibra. Esta toxicidad podría deberse a un impedimento de la digestión de los nutrientes debido a que los ácidos grasos se adhieren a la pared celular⁽⁴⁶⁾. Así, no es de extrañar que una de las principales acciones de algunos géneros bacterianos ruminales sea la biohidrogenación de los ácidos grasos para minimizar los impactos negativos de los ácidos grasos insaturados en el crecimiento microbiano. También se han reportado efectos detrimentales de la grasa alimentaria en los protozoarios ruminales, hongos y arqueas cuando el alimento contiene aceite de linaza o de soya⁽⁴⁶⁾.

Efecto del pH ruminal

Se han reconocido los efectos del pH sobre el crecimiento de algunas bacterias ruminales⁽⁴⁸⁾. Ciertas especies, como *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* son muy sensibles al pH ruminal ácido⁽⁴⁹⁾. Esta sensibilidad puede explicarse por los efectos negativos del pH en la absorción de glucosa. Otras especies bacterianas como *Prevotella ruminicola* y *Selenomonas ruminantium* son bastante resistentes a la reducción del pH extracelular⁽⁵⁰⁾. El tipo de mecanismos de transporte utilizados por las bacterias influye en su sensibilidad al pH.

Por ejemplo, el transporte de arabinosa y xilosa por *Prevotella ruminicola* es más sensible a las reducciones del pH extracelular que el transporte de glucosa⁽⁵¹⁾. Un bajo pH extracelular también reduce el transporte de la arginina, el glutamato y la leucina en *Streptococcus* sp.⁽⁴⁹⁾. Gracias al desarrollo de la secuenciación de ADN de alto rendimiento se ha descrito el efecto del pH ruminal en todos los taxones de la población bacteriana. Por ejemplo, se ha demostrado que las bacterias que digieren la fibra son más sensibles al pH ruminal bajo que las bacterias que digieren el almidón^(37,21). Además, los investigadores han encontrado que la acidosis ruminal leve o severa puede inducir cambios drásticos en la población bacteriana del rumen. Se ha reportado en el ganado la proliferación rápida de algunas bacterias tales como *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus* sp. en situaciones en las que el rumen contiene altas proporciones de carbohidratos de fermentación rápida y un pH ruminal bajo^(52,53). Además, la reducción del pH ruminal debida a las dietas altas en granos afecta negativamente el crecimiento protozoario⁽⁵⁴⁾; por lo tanto, el modelo para predecir la proteína microbiana incluye la fibra detergente neutra como un factor de ajuste⁽²⁹⁾.

Efecto de la ingesta de alimento

La reducción de la ingesta de alimentos puede afectar la actividad bacteriana y disminuir la eficiencia microbiana debido a la insuficiencia en el nitrógeno soluble y la materia orgánica fermentable⁽⁴⁵⁾. No obstante, si la restricción en la ingesta de alimento no es severa, la eficiencia microbiana aumentará (gramos de nitrógeno microbiano/kilogramos de materia orgánica fermentada); pero el rendimiento microbiano (gramos de nitrógeno microbiano que llegan al duodeno) disminuirá como consecuencia de la reducción de la cantidad de materia orgánica fermentada en el rumen. Otros estudios han reportado una relación positiva entre el incremento de la ingesta de alimento y el rendimiento microbiano; esto se debe a que una mayor ingesta de alimento aumenta la tasa de paso que previene la depredación de protozoarios^(44,53). Además incrementa la cantidad de nitrógeno bacteriano que llega al duodeno, debido a que la producción de nitrógeno bacteriano se correlaciona positivamente con la ingesta de materia orgánica digerible⁽⁵³⁾.

Medición de la proteína microbiana y su aportación a la proteína metabolizable

La medición del flujo intestinal de la proteína microbiana requiere de que se aislen los pellets microbianos ruminales, que se utilizan luego como referencia para establecer la relación entre el marcador microbiano y el nitrógeno. Posteriormente, se cuantifica el marcador en la digesta intestinal. Durante las últimas décadas se han utilizado diversos métodos para calcular la síntesis de proteína microbiana y la proporción que sale del rumen⁽⁴⁾ (Cuadro 1). Uno de los retos fundamentales en este proceso es obtener un pellet microbiano de referencia que sea representativo tanto del fluido como de la fase sólida⁽¹⁰⁾. El contenido de nitrógeno de las bacterias asociadas al líquido es del 8.5 % y el de las bacterias asociadas a partículas es de 7.0 %⁽¹⁹⁾. En consecuencia, si sólo se utilizan las bacterias asociadas al líquido como referencia para establecer la razón entre el indicador y la proteína, se obtendrán como resultado valores por debajo de los reales.

También es necesario medir el flujo de la digesta intestinal para calcular el flujo de proteína microbiana^(53,54). Uno de los marcadores externos de la digesta más comúnmente utilizados es el óxido crómico (Cr_2O_3). Para este procedimiento se coloca el Cr_2O_3 en cápsulas de gelatina y se dosifica en el rumen^(55,56) dos veces al día durante 10 días para alcanzar un flujo estable del marcador a través del tracto gastrointestinal^(5,57,58). También se ha vuelto una práctica común incorporar Cr_2O_3 en la dieta en concentraciones de entre 0.25 y 0.40 % de la materia seca. Además, rutinariamente se utiliza la fibra detergente ácida no digerible como marcador interno de la digesta^(59,60). Con este enfoque, se determina la concentración de fibra detergente ácida no digerible en las muestras después de una incubación *in situ* de 288 horas en el rumen. Luego se calcula el flujo de la digesta intestinal con base en la cantidad del marcador suministrado como alimento (fibra detergente ácida no digerible) o dosificado (Cr_2O_3) y la concentración del marcador respectivo en las muestras duodenales⁽⁶¹⁾. A partir de estos valores, se estima el flujo de proteína microbiana y, por ende, su aportación a la proteína metabolizable total. Otras técnicas para medir el flujo de la digesta incluyen etiquetar las fases particulada y líquida de la digesta con YbCl_3 y Cr-EDTA, respectivamente⁽⁶⁾.

Esta reseña se enfocará en los marcadores microbianos convencionales ampliamente utilizados para calcular la proteína microbiana, como las purinas totales⁽⁴⁾, el ácido diaminopimélico⁽⁵⁾ y el nitrógeno marcado. Además, se analizará el uso del ADN por medio de una PCR en tiempo real para medir la proteína que tiene su origen en las bacterias, los protozoarios y las levaduras. El marcador microbiano ideal no debe estar presente en el alimento ni ser absorbido; debe ser biológicamente estable, estar presente en un porcentaje similar entre los diversos tipos de microbios y ser un porcentaje constante de la célula

microbiana en todas las etapas de su crecimiento, y todas sus formas deben fluir a un ritmo similar⁽⁶²⁾.

El uso de las purinas totales como marcador microbiano

Las bases de purina (adenina y guanina) son parte de los ácidos nucleicos de las células microbianas⁽⁶³⁾. En pocas palabras, este procedimiento combina los métodos estándar para hidrolizar los nucleótidos con ácido perclórico. El primer paso va seguido de la precipitación de las purinas libres con el nitrato de plata para separar las purinas de los compuestos que interfieren. En este método, las purinas ácidas resolubilizadas se cuantifican con un espectrómetro a 260 nm. Después se estima la proteína microbiana con base en la relación entre las purinas y el nitrógeno de los pellets bacterianos de referencia⁽⁶⁴⁾ y la concentración de las purinas en las muestras.

Se considera que el uso de las purinas tiene algunos retos inherentes. Por ejemplo, las purinas del alimento, que escapan a la destrucción en el rumen debido a que pueden causar una sobreestimación de la proteína microbiana⁽⁶³⁾. Las células epiteliales intestinales desprendidas también pueden aportar purinas a la digesta, y por lo tanto provocar una sobreestimación. Además, se ha reportado una mayor concentración de purinas en el duodeno de las ovejas que en el abomaso, atribuyéndola a las células desprendidas y a la secreción de bilis⁽⁸⁾. El factor de corrección $0.195 \times BW^{0.75}$ se ha utilizado para mitigar esta sobreestimación⁽⁶⁵⁾. Al parecer, otros retos importantes que se enfrentan cuando se utilizan las purinas totales como marcador microbiano tienen que ver con si las purinas están presentes en un porcentaje similar en las distintas especies y en todas las etapas de crecimiento microbiano. Se ha reportado que los valores para las purinas en las bacterias mezcladas en el rumen varían mucho. Por ejemplo, en un estudio se encontró una concentración media de purinas del 7.28 %, con valores que oscilan entre 2.40 y 13.02 %⁽⁵³⁾. Se han reportado variaciones en las concentraciones de purinas de las bacterias ruminales mixtas en cultivo continuo utilizando diversas fuentes de proteína⁽⁶⁶⁾. Esta variación también se ha reportado entre los cultivos puros. Las concentraciones, expresadas como un porcentaje de la MS, oscilan entre 0.69 y 5.57 %, con un valor medio de 2.98 %. Esta situación indica que, si se utilizara la relación entre las purinas y el nitrógeno para calcular la proteína microbiana a nivel duodenal, se obtendrían valores por encima de los reales. Entre los factores biológicos que pueden ser responsables de estas variaciones se encuentran la diferencia en la composición química entre las bacterias asociadas al líquido y la de las bacterias asociadas a las partículas, así como la etapa de crecimiento bacteriano⁽¹⁹⁾. Por lo tanto, el procedimiento de aislamiento bacteriano tendría que recolectar un pellet bacteriano

que sea representativo no sólo de diferentes sitios del rumen, sino también de las bacterias asociadas al líquido y a partículas⁽⁶⁷⁾.

El uso del ácido diaminopimélico como marcador microbiano

Este método se basa en la estimación de la relación entre el ácido diaminopimélico y el nitrógeno en las bacterias ruminales y la cantidad de un marcador microbiano en la digesta⁽⁵⁾. La cantidad de nitrógeno bacteriano en la ingesta intestinal se calcula con base en estos valores⁽⁶⁸⁾. En pocas palabras, las muestras liofilizadas se hidrolizan con ácido metasulfónico y después se centrifugan. Entonces, la muestra derivatizada se inyecta en la columna y se somete una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Durante el proceso de oxidación, la metionina se convierte en metionina sulfona. En el último paso del proceso se lleva a cabo la separación cromatográfica de las columnas de intercambio iónico. El ácido diaminopimélico se encuentra en la membrana celular de las bacterias ruminales y está ausente de los alimentos que comúnmente se proporcionan como alimento a los rumiantes⁽⁶⁸⁾. La precisión de la técnica depende de que se mantenga una relación constante entre el ácido diaminopimélico y el nitrógeno de las diversas especies de microbios, o entre especies microbianas en el rumen. Sin embargo, este último supuesto no es consistente con la naturaleza secuencial de la fermentación del rumen. Además, la relación entre el ácido diaminopimélico y el nitrógeno puede variar entre las especies bacterianas ruminales⁽³⁹⁾. Las diversas bacterias tienen distintas concentraciones de peptidoglicano en la pared celular y, por lo tanto, diferentes concentraciones de ácido diaminopimélico. Por ejemplo, las bacterias gram-positivas contienen entre 30 y 70 % de peptidoglicano en la pared celular; las bacterias gram-negativas contienen sólo un 10 %. Además, si se alimenta al ganado exclusivamente con dietas a base de forraje, las bacterias gram-negativas serán predominantes en el rumen, y si el ganado consume más concentrado, la proporción de bacterias gram-positivas aumentará^(69,70). Por ello, las variaciones en la abundancia relativa de bacterias gram-positivas y gram-negativas puede afectar la estimación de la síntesis del nitrógeno bacteriano. Por ejemplo, si las bacterias gram-positivas predominan en el rumen, esta relación será mayor, y esto dará lugar a una subestimación de la síntesis de proteína bacteriana si los pellets de referencia no son representativos de la digesta entera.

El uso del nitrógeno marcado como marcador microbiano

La síntesis de la proteína microbiana también ha sido calculada cuantificando la incorporación del ^{15}N de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a los microbios^(15,6). El ^{15}N se introduce de manera constante en el rumen a través de una cánula ruminal, a razón de aproximadamente 1 L por día. Este método se basa en la incorporación de nitrógeno amoniacal marcado y no toma en cuenta la proteína microbiana sintetizada directamente a partir de los aminoácidos o péptidos. La técnica de utilizar el nitrógeno como marcador es no sólo costosa sino también bastante compleja, y por ende no ha sido ampliamente utilizada. Una de las ventajas de este enfoque, comparado con el análisis de las purinas, es el hecho de que la proteína marcada con ^{15}N que sale del rumen sólo será de origen microbiano, mientras que una porción de las purinas que salen del rumen puede ser de origen alimentario⁽⁷¹⁾. Sin embargo, se ha demostrado que la relación marcador/nitrógeno difiere entre las bacterias asociadas con la fase líquida y las asociadas con la fase particulada⁽³⁰⁾. Así, resulta todo un reto establecer esta razón a partir de un pellet bacteriano representativo.

El uso del ADN como marcador microbiano

La PCR en tiempo real es una herramienta potente que se utiliza para el análisis cuantitativo del ácido nucleico. Recientemente se ha probado el ADN como marcador microbiano empleando este método. La PCR en tiempo real es un refinamiento de la PCR desarrollado a mediados de los 1980^(72,73), que permite la detección rápida del ADN microbiano, indicando así la presencia de un microorganismo o grupo de microorganismos. En comparación con un método convencional de PCR que emplea dos cebadores —uno directo y uno inverso—, en los ensayos de PCR en tiempo real se requiere de una sonda fluorescente adicional. Por ello, este método es altamente sensible y específico, dado que se utilizan tres oligonucleótidos complementarios al marcador de ADN⁽⁷⁴⁾. Una ventaja de este enfoque es que permite cuantificar la proteína microbiana que se origina en las bacterias, protozoarios y levaduras, lo cual no se podría lograr utilizando los marcadores microbianos convencionales. Por lo tanto, el método se basa en la cuantificación de un segmento de ADN específico de estos dominios microbianos⁽⁷⁴⁾.

Uno de los primeros estudios que utilizaron ADN mediante una PCR en tiempo real para estimar la proteína microbiana se realizó en el año 2005⁽⁷⁵⁾, empleando el gen protozoario 18S como marcador microbiano. Este ensayo se utilizó para cuantificar la cantidad de biomasa protozoaria en el líquido ruminal y la digesta del intestino delgado. Estos autores también reportaron que el someter la digesta duodenal a dos ciclos de congelación y

descongelación reducía la recuperación casi a la mitad, pero el uso de una sola congelación (una práctica estándar) parecía incrementar la recuperación del ADN microbiano. El ensayo incluye procedimientos para aislar las células protozoarias del rumen a fin de utilizarlas como una norma para convertir las copias del gen 18S a una base de biomasa. Se ha determinado que el nitrógeno protozoario constituye el 12.7 % de la reserva de nitrógeno microbiano ruminal total, y 11.9 % del initrógeno microbiano duodenal en las dietas altas en forraje⁽⁷⁵⁾.

Los investigadores también han reportado el uso de ADN microbiano como un marcador para estimar la proteína bacteriana midiendo el gen 16S^(5,8), o la proteína de levaduras midiendo parte del segundo cromosoma de *Saccharomyces cerevisiae*⁽⁹⁾. Una de las ventajas de utilizar ADN como marcador microbiano consiste en que es altamente específico para un amplicón que forma parte de las bacterias, los protozoarios o las levaduras y excluye cualquier material externo originado de alimento no degradado, lo cual evita la contaminación^(8,64). La cuantificación de la proteína de las levaduras de la proteína microbiana es particularmente importante cuando las raciones de alimento de los rumiantes incluyen ingredientes que contienen células de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, como las de la industria del etanol⁽⁷⁶⁾. Si la contribución de la proteína alimentaria de levaduras no se cuantifica por separado, entonces se sobreestimarán la proteína microbiana que se origina de las bacterias y los protozoarios.

Entre los principales componentes del ensayo de PCR en tiempo real se incluyen 1) un cebador directo, que es un oligonucleótido de entre 20 y 24 pares base y cuyo extremo 5' se tiempla hasta el extremo 3' del marcador de ADN⁽⁷³⁾; 2) También se requiere un cebador inverso, oligonucleótido cuya longitud debería ser de entre 20 y 24 pares y cuyo extremo 5' debería ser compatible con el extremo 3' del marcador de ADN microbiano⁽⁷³⁾; 3) Asimismo se requiere una *Sonda* dual marcada. La reacción de la PCR en tiempo real se lleva a cabo mediante ciclos de temperatura. Se aplica una alta temperatura (95 °C) para separar las cadenas del ADN de doble hélice; después, la temperatura se baja a 60 °C para permitir que los cebadores se tiemplen hasta el marcador de DNA, y por último, la temperatura se sube a 72 °C, que es la óptima para la polimerasa que extiende los cebadores⁽⁷⁴⁾.

No obstante, reportes recientes indican que algunas especies de bacterias y protozoarios pueden presentar diversos números de copias de los marcadores de ADN utilizados. Por ejemplo, los filos *Firmicutes* y *Gammaproteobacteria* pueden contener cinco veces más copias del gen 16S que el resto de los filos bacterianos⁽⁷⁷⁾, lo cual podría introducir un sesgo en el método si los pellets bacterianos utilizados como referencia no son representativos de las muestras que se están analizando. Además, se ha sugerido que los valores más bajos estimados de proteína microbiana podrían deberse a la recuperación incompleta de copias de ADN de las muestras⁽⁸⁾ o a que los cebadores universales utilizados no se ligan al 100 % de los genes microbianos 16S y 18S, cuando se cuantifica la proteína bacteriana o protozoaria, respectivamente.

La secuenciación del ADN mejora el conocimiento sobre los factores que afectan la medición del flujo de la proteína microbiana

El uso de la secuenciación del ADN de alto rendimiento

Los avances recientes en las técnicas moleculares aplicadas a la secuenciación de ADN de alto rendimiento del ADN microbiano en combinación con el análisis bioinformático de la población microbiana que habita en el rumen han hecho aportaciones importantes a nuestro conocimiento del microbioma ruminal⁽¹²⁾. Esta técnica ha sido aplicada a una variedad de temas de investigación relacionados con la nutrición de los rumiantes. Por ejemplo, se han logrado nuevos conocimientos de los cambios en la población bacteriana de los rumiantes debido a un cambio en la composición de la dieta⁽²¹⁾, a un cambio en el pH ruminal⁽³⁷⁾, a las bacterias biohidrogenizadoras^(14,78), al papel de las bacterias en la composición de la grasa de la leche⁽⁷⁹⁾ y a las arqueas que intervienen en la formación del metano^(22,80). Además, la secuenciación del ADN puede mejorar nuestra comprensión de los factores que afectan el cálculo de la proteína microbiana y su flujo al intestino delgado. Específicamente, se han revelado diferencias filogenéticas detalladas entre los pellets bacterianos que se utilizan como referencia y la población bacteriana de la digesta intestinal.

Diferencias taxonómicas entre las bacterias del líquido ruminal y de la digesta intestinal

Uno de los principales retos para la estimación de la síntesis de proteína microbiana y de su flujo al intestino delgado consiste en obtener un pellet bacteriano de referencia que sea representativo de la población microbiana de los contenidos ruminales. Si bien por mucho tiempo se han supuesto diferencias entre las bacterias del líquido ruminal y las de la digesta total que fluye⁽¹⁰⁾, apenas en los últimos años el uso de la secuenciación de ADN de alto rendimiento ha permitido a los investigadores examinar el perfil taxonómico completo de los pellets de referencia y de la digesta intestinal⁽¹⁴⁾. Estos hallazgos han revelado que el perfil taxonómico de los pellets bacterianos aislados del líquido ruminal difiere drásticamente del de las bacterias de la digesta intestinal cuando se analiza los niveles taxonómicos de filo, orden, familia y género (Cuadros 3 y 4). Por ejemplo, se han encontrado mayores proporciones de los filos bacterianos predominantes *Firmicutes*, *TM7* y *Tenericutes* en los pellets bacterianos de referencia que en la digesta intestinal. Además, en los pellets de referencia se encontraron grandes proporciones de los órdenes bacterianos *Bacteroidales* y

Clostridiales, así como niveles superiores de la familia bacteriana *Lachnospiraceae*. Por otra parte, los pellets bacterianos de referencia contenían proporciones más bajas de los filos *Fibrobacteres*, *Spyrochaetes*, *Proteobacteria* y *Lentisphaera*, así como de la familia *Ruminococcaceae* y del género *Butyrivibrio*. Estos hallazgos apoyan la idea de que el uso exclusivo de bacterias asociadas al como pellets de referencia daría lugar a un sesgo en la estimación de la síntesis de proteína microbiana, y de que es necesario desarrollar procedimientos de desprendimiento eficaces para obtener pellets bacterianos más representativos de los contenidos ruminales enteros a fin de calcular con exactitud la aportación de proteína microbiana a la proteína metabolizable total. Según estos hallazgos, el desprendimiento de las bacterias fibrolíticas de la fracción sólida de los contenidos ruminales es particularmente importante para obtener pellets microbianos de referencia que sean representativos.

Cuadro 3: Filos y órdenes bacterianos predominantes encontrados en pellets bacterianos de referencia aislados del líquido ruminal y en la digesta intestinal de novillos de carne (%)

Taxones bacterianos	Origen de las bacterias		EEM ²	Valor de P
	Pellets de referencia del líquido ruminal ¹	Digesta intestinal		
Filo, % del total				
<i>Firmicutes</i>	45.95	31.32	2.675	< 0.001
<i>Bacteroidetes</i>	44.22	42.02	2.497	0.53
<i>Fibrobacteres</i>	0.1	10.1	0.06	< 0.01
<i>Chloroflexi</i>	1.69	2.00	0.303	0.41
TM7	1.60	0.29	0.227	< 0.001
<i>Tenericutes</i>	1.45	1.00	0.199	0.027
<i>Spyrochaetes</i>	0.92	1.78	0.138	< 0.001
<i>Proteobacteria</i>	0.63	3.81	0.241	< 0.001
SR1	0.33	0.22	0.150	0.58
<i>Planctomyces</i>	0.26	0.11	0.042	0.014
<i>Lentisphaera</i>	0.13	2.02	0.128	< 0.001
<i>Synergistetes</i>	0.11	0.14	0.031	0.552
<i>Verrucomicrobia</i>	0.12	0.52	0.056	< 0.001
WPS2	0.10	0.30	0.051	< 0.001
Otros	2.49	14.46	0.122	0.001
Orden, % del total				
<i>Bacteroidales</i>	44.22	41.90	2.498	0.51
<i>Clostridiales</i>	34.99	28.31	1.748	0.004
<i>Coriobacteriales</i>	5.32	1.41	0.881	< 0.001
<i>Anaerolineales</i>	1.69	2.00	0.303	0.41
TM7	1.60	0.30	0.227	< 0.001
<i>Campylobacteriales</i>	0.32	0.42	0.039	0.067
<i>Pirellulales</i>	0.26	0.11	0.042	0.014

<i>Erysipelotrichaeles</i>	0.17	0.07	0.020	< 0.001
<i>Victivallales</i>	0.12	1.78	0.125	< 0.001
<i>Sipochaetales</i>	0.12	0.16	0.021	0.17
<i>Sphaerochaetales</i>	0.09	1.79	0.235	< 0.001
<i>Rhizobiales</i>	0.04	0.01	0.010	0.084
<i>Desulfovibrionales</i>	0.04	0.04	0.018	0.97
YS2	0.03	0.57	0.051	< 0.001
<i>Rickettsiales</i>	0.02	0.29	0.046	< 0.001
Otros	10.97	20.84	---	---

¹ Bacterias aisladas mediante centrifugación diferencial. Adaptado de Castillo-Lopez *et al.*⁽¹⁴⁾.

² El mayor error estándar de las medias

Cuadro 4: Familias y géneros bacterianos predominantes encontrados en los pellets bacteriales de referencia aislados del líquido ruminal y en la digesta intestinal de novillos de carne (%)

Taxones bacterianos	Origen de las bacterias		EEM ²	Valor de P
	Pellets de referencia del líquido ruminal ¹	Digesta intestinal		
Familia, % del total				
Sin clasificar				
<i>bacteroidales</i>	27.93	17.80	2.442	0.006
<i>Lachnospiraceae</i>	17.38	9.27	0.979	< 0.001
<i>Ruminococcaceae</i>	11.48	13.66	0.895	0.061
<i>Prevotellaceae</i>	10.99	12.12	1.225	0.52
Sin clasificar				
<i>clostridiales</i>	7.70	2.47	0.857	< 0.001
<i>Paraprevotellaceae</i>	3.78	4.27	0.857	0.671
F16	2.80	0.47	0.884	0.055
<i>Clostridiaceae</i>	2.11	1.39	0.202	< 0.001
<i>Anaerolinaceae</i>	1.68	2.00	0.303	0.418
<i>Coriobacteriaceae</i>	1.30	0.05	0.261	< 0.001
<i>Anaeroplasmataceae</i>	0.98	0.80	0.185	0.351
<i>Veillonellaceae</i>	0.88	1.44	0.191	0.047
<i>Spirochaetaceae</i>	0.78	1.48	0.130	< 0.01
<i>Catabacteriaceae</i>	0.72	1.24	0.147	0.011
BS11	0.68	0.18	0.293	0.01
Género, % del total				
<i>Bacteroidales</i>				
sin clasificar	27.94	17.81	2.442	0.006
<i>Lachnospiraceae</i>	11.73	6.39	0.582	< 0.001
sin clasificar				
<i>Prevotella</i>	10.94	12.02	1.127	0.53
sin clasificar				
<i>Ruminococcaceae</i>	8.51	9.71	0.770	0.15
sin clasificar				
<i>Clostridia</i>	7.71	2.47	0.857	< 0.001

sin clasificar				
<i>Coriobacteriales</i>	4.02	1.36	0.659	< 0.001
sin clasificar				
<i>Paraprevotellaceae</i>	3.79	4.27	0.857	0.67
sin clasificar				
<i>Ruminococcus</i>	2.84	3.51	0.326	0.162
<i>Butyrivibrio</i>	2.59	0.88	0.203	< 0.001
<i>SHD231</i>	1.69	2.00	0.303	0.41
<i>Clostridium</i>	1.48	0.66	0.120	< 0.001
<i>Coriobacteriaceae</i>				
sin clasificar	1.10	0.05	0.213	< 0.001
<i>Coprococcus</i>	0.97	0.23	0.225	0.011
<i>Succiniclasicum</i>	0.81	1.41	0.189	0.032
<i>Shuttleworthia</i>	0.76	0.10	0.150	< 0.001
<i>Catabacteriaceae</i>				
sin clasificar	0.73	1.25	0.147	0.011
<i>BS11</i>	0.68	1.83	0.293	0.01
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.64	0.73	0.103	0.553

Bacterias aisladas mediante centrifugación diferencial. Adaptado de Castillo-Lopez *et al.*⁽¹⁴⁾.

²La mayor norma de la media.

Implicaciones de las diferencias taxonómicas entre las bacterias del líquido ruminal y las de la digesta intestinal sobre los marcadores microbianos

Los resultados obtenidos del uso de la secuenciación de ADN de alto rendimiento dilucidan los factores potenciales que pudieran sesgar la estimación del flujo de proteína microbiana al aislar el pellet representativo exclusivamente de la fase líquida de los contenidos ruminales. Por ejemplo, algunos estudios han sugerido que las bacterias asociadas a partículas contienen proporciones menores de purinas que las bacterias asociadas al líquido⁽⁸¹⁾. Los datos sobre el contenido de purina entre los diversos taxones bacterianos son limitados, y dado que existe una gran proporción de bacterias asociadas a partículas que quedan excluidas del pellet de referencia aislado durante la centrifugación diferencial, es probable que la divergencia entre el perfil taxonómico del aislado y el de la digesta intestinal represente una fuente de subestimación del suministro intestinal de proteína microbiana. Esto puede explicar en parte los valores estimados inferiores que se observaron en comparación con los valores predichos⁽³⁾.

La concentración de peptidoglicano varía, además, entre las bacterias, de modo que tienen concentraciones distintas de ácido diaminopimélico. Las bacterias gram-positivas contienen más peptidoglicano en la pared celular que las bacterias gram-negativas. Debido a que, cuando se utiliza el ácido diaminopimélico como marcador microbiano, los pellets de

referencia aislados del líquido ruminal contienen una proporción mayor de *Firmicutes* (filo), *Clostridiales* y *Coriobacteriales* (órdenes) y *Lachnospiraceae* (familia) —representados en gran medida por bacterias gram-positivas— que las bacterias de la digesta intestinal, los investigadores tendrían que tener en cuenta la posibilidad de subestimar el flujo intestinal de proteína microbiana.

La información limitada sobre la manera en que la concentración de nitrógeno marcado varía entre las bacterias ruminales es escasa. Sin embargo, los reportes indican que la razón marcador/nitrógeno difiere entre las bacterias asociadas al líquido y las asociadas a partículas, y que el enriquecimiento de ^{15}N es mayor en las bacterias asociadas al líquido que en las bacterias asociadas a partículas⁽⁸²⁾. Por lo tanto, los resultados relativos a las diferencias entre el perfil taxonómico de las bacterias del líquido ruminal y el de las bacterias de la digesta intestinal sugieren que, cuando los pellets microbianos de referencia se obtienen únicamente del líquido ruminal, el flujo intestinal de proteína microbiana puede ser subestimado.

Por último, dadas las variaciones en el número de copias del gen 16S entre las bacterias ruminales, y en particular en los números mayores de copias en las *Firmicutes*, y debido a que las proporciones de *Firmicutes* son mayores en las bacterias aisladas del líquido ruminal, cuando se utiliza el ADN como marcador microbiano se pueden obtener valores de proteína bacteriana inferiores a los reales si los pellets bacterianos de referencia no son representativos de la digesta que fluye al intestino delgado.

Conclusiones

El microbioma ruminal desempeña un papel esencial en la nutrición de los rumiantes; los organismos que aportan la mayor cantidad de proteína microbiana son las bacterias y los protozoarios. Los principales factores relacionados con los animales y su alimentación que influyen en la síntesis de proteína microbiana en el rumen son la disponibilidad de carbohidratos, la proteína degradable en el rumen, la grasa alimentaria, la ingesta de alimento y el pH ruminal. Todos los marcadores microbianos presentan ventajas y desventajas; los marcadores microbianos convencionales que suelen utilizarse para estimar la síntesis de proteína microbiana incluyen las purinas totales, el ácido diaminopimélico y el nitrógeno marcado. Recientemente, el uso de ADN como marcador microbiano en PCR en tiempo real representa un método alternativo. Sin embargo, los investigadores deben estar conscientes de la posibilidad de sesgo cuando utilicen cualquiera de estos métodos.

Una de las principales dificultades para la estimación del flujo de proteína microbiana consiste en obtener del rumen un pellet microbiano representativo a fin de establecer la razón marcador microbiano/nitrógeno. Se han visto diferencias entre las bacterias asociadas a

partículas y las bacterias asociadas al líquido. Sin embargo, hasta donde tienen conocimiento los autores, no se han realizado estudios que comparen la composición taxonómica de la comunidad de bacterias asociadas al líquido con la de las bacterias que se encuentran en los contenidos intestinales y analicen sus implicaciones para los marcadores microbianos, así como sus efectos potenciales en la estimación del flujo de proteína microbiana al intestino delgado.

Los avances recientes en la secuenciación de ADN de alto rendimiento en combinación con la bionformática han revelado una considerable divergencia filogenética respecto a muchos taxones bacterianos a nivel de filo, familia y género entre los pellets microbianos de referencia aislados exclusivamente del líquido ruminal y las bacterias halladas en los contenidos intestinales enteros. Estos hallazgos indican que se requiere mayor investigación a fin de desarrollar métodos para desprender las bacterias de las partículas de alimento de modo que se obtengan pellets microbianos de referencia que sean representativos de los contenidos ruminales enteros; ello hará posible prevenir sesgos al cuantificar la aportación de la proteína microbiana al suministro de proteína metabolizable en los rumiantes.

Literatura citada:

1. National Research Council (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. 2000. 7th Rev Ed. Natl Acad Sci (Washington DC).
2. Lapiere H, Pacheco D, Berthiaume R, Ouellet D, Schwab C, Dubreuil P, *et al.* What is the true supply of amino acids for a dairy cow? *J Dairy Sci* 2006;(89)(E Suppl):E1–E14.
3. Castillo-Lopez E, Ramirez Ramirez HA, Klopfenstein TJ, Hostetler D, Fernando SC, Kononoff PJ. Ration formulations containing reduced-fat dried distillers grains with solubles and their effect on lactation performance, rumen fermentation, and intestinal flow of microbial nitrogen in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2014;97:1578–1593.
4. Ipharraguerre IR, Reynal SM, Lineiro M, Broderick GA, Clark JH. A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers, and microbial references for assessing the postruminal supply of nutrient in dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;90:1904-1919.
5. Castillo-Lopez E, Klopfenstein TJ, Fernando SC, Kononoff PJ. *In vivo* determination of rumen undegradable protein of dried distillers grains with solubles and evaluation of duodenal microbial crude protein flow. *J Anim Sci* 2013;91:924-934.
6. Gorka P, Castillo-Lopez E, Joy F, Chibisa GE, McKinnon JJ, Penner GB. Effect of including high-lipid by-product pellets in substitution for barley grain and canola meal

- in finishing diets for beef cattle on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *J Anim Sci* 2015;93(10):4891-4902.
7. Sylvester JT, Karnati SKR, Dehority BA, Morrison M, Smith GL, St-Pierre NR, *et al.* Rumen ciliated protozoa decrease generation time and adjust 18S ribosomal DNA copies to adapt to decreased transfer interval, starvation, and monensin. *J Dairy Sci* 2009;92:256-269.
 8. Belanche A, De la Fuente G, Yáñez-Ruiz DR, Newbold CJ, Calleja L, Balcells J. Technical note: The persistence of microbial-specific DNA sequences through gastric digestion in lambs and their potential use as microbial markers. *J Anim Sci* 2011;89:2812-2816.
 9. Castillo-Lopez E, Kononoff PJ, Miner J. Short communication: Detection of yeast DNA in omasal digesta of dairy cows consuming dried distiller's grains and solubles. *J Dairy Sci* 2010;93(12):5926-5929.
 10. Martinez ME, Ranilla MJ, Ramos S, Tejido ML, Saro C, Carro MD. Evaluation of procedures for detaching particle-associated microbes from forage and concentrate incubated in rusitec fermenters: Efficiency of recovery and representativeness of microbial isolates. *J Anim Sci* 2009;87:2064-1634.
 11. Broderick G, Merchen N. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J Dairy Sci* 1992;75:2618-2632.
 12. Krause DO, Nagaraja TG, Wright ADG, Callaway TR. Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J Anim Sci* 2013;91:331-341.
 13. Castillo-Lopez E, Moats J, Aluthge ND, Ramirez-Ramirez HA, McAllister TA, Anderson CL, *et al.* Effect of feeding different flaxseed-based products on the rumen microbial community of dairy cows evaluated by high-throughput DNA sequencing. *J Anim Sci* 2016;(Suppl 5):94.
 14. Castillo-Lopez E, Ramirez-Ramirez HA, Klopfenstein, TJ, Anderson C, Alughthe ND, Fernando SC, Kononoff PJ. Effect of feeding dried distillers grains with solubles on ruminal biohydrogenation, intestinal fatty acid profile, and gut microbial diversity evaluated through DNA pyro-sequencing. *J Anim Sci* 2014;92:733-743.
 15. Reynal S, Broderick G, Bearzi C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2005;88:4065-4082.
 16. White RR, Roman-Garcia Y, Firkins Y, Kononoff P, VandeHaar MJ, Tran H, *et al.* Evaluation of the national research council (2016) dairy model and derivation of new prediction equations. 2. Rumen degradable and undegradable protein. *J Dairy Sci*

2016;100:3611-3627.

17. White RR, Roman-Garcia Y, Firkins J. Meta-analysis of postruminal microbial nitrogen flows in dairy cattle. II. Approaches to and implications of more mechanistic production. *J Dairy Sci* 2016;99:7932-7944.
18. NASEM. Nutrient requirements of beef cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. of Science, Engineering and Medicine, Washington, D.C. 2016.
19. Martin S. Nutrient transport by ruminal bacteria: a review. *J Anim Sci* 1994;72:3019-3031.
20. Russell J. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, NY. 2002.
21. Petri RM, Forster RJ, Yang W, McKinnon JJ, McAllister TA. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *J Appl Microbiol* 2012;112(6):1152–62.
22. Callaway TR, Dowd SE, Edrington TS, Anderson RC, Krueger N, Bauer N, *et al.* Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J Anim Sci* 2010;88:3977-3983.
23. Danielsson R, Dicksved J, Sun L, Gonda H, Müller B, Schnürer A, *et al.* Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic. *Front Microbiol* 2017;8:226.
24. Lima FS, Oikonomou G, Lima SF, Bicalho MLS, Ganda EK, de Oliveira FJC, *et al.* Prepartum and postpartum rumen fluid microbiomes: characterization and correlation with production traits in dairy cows. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:1327–1337.
25. Kumar S, Indugu N, Vecchiarelli B, Pitta DW. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Front Microbiol* 2015;6:781.
26. Zhou Z, Fang L, Meng Q, Li S, Chai S, Liu S, Schonewille JT. Assessment of ruminal bacterial and archaeal community structure in yak (*Bos grunniens*). *Front Microbiol* 2017;8:179.
27. Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 2010;4:1024–1036.
28. Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HP, Adesogan AT, *et al.* SPECIAL TOPICS-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci*

- 2013;91:5045-5069.
29. NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7th Rev Ed. Washington, DC: National Academic Press; 2000.
 30. Hristov A, Broderick G. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage. *J Dairy Sci* 1996;79:1627–1637.
 31. Hussein H, Merchen N, Fahey G. Jr. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary forage level and fat supplementation. *J Anim Sci* 1995;73:2469-2473.
 32. Storm E, Ørskov E. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. The apparent digestibility and net utilization of microbial N for growing lambs. *B J Nutr* 1983;50:471-478.
 33. Dehority B, Orpin C. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: Hobson PN editor. *The rumen microbial ecosystem*. New York: Elsevier Applied Science; 1988:151-173.
 34. Schären M, Kiri K, Riede S, Gardener M, Meyer U, Hummel J, Urich T, Breves G Dänicke S. Alterations in the rumen liquid-, particle- and epithelium-associated microbiota of dairy cows during the transition from a silage- and concentrate-based ration to pasture in spring. *Front Microbiol* 2017;8:744.
 35. Saier M Jr. *Mechanisms and regulation of carbohydrate transport in bacteria*. New York, USA: Academic Press; 1985.
 36. Wattiaux M, Reed J. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci* 1995;73:257-266.
 37. Fernando SC, Purvis HT, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Krehbiel CR, Nagaraja TG, Roe BA, Desilva U. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:7482–7490.
 38. Burroughs W, Trenkle AH, Vetter RL. A system of protein evaluation for cattle and sheep involving metabolizable protein (amino acids) and urea fermentation potential of feedstuffs. *Vet Med Small Anim Clin* 1974;69:713–722.
 39. Stern M, Hoover W. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a Review. *J Anim Sci* 1979;49:1590-1603.
 40. Kreikemeier K, Harmon D, Brandt RJr, Nagaraja T, Cochran R. Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: Effects of dietary roughage and feed intake on finishing steer

- performance and ruminal metabolism. *J Anim Sci* 1990;68:2130–2141.
41. Franzolin R, Dehority B. Effect of prolonged highconcentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J Anim Sci* 1996;74:2803–2809.
 42. Volden H. Effects of level of feeding and ruminally undegraded protein on ruminal bacterial protein synthesis, escape of dietary protein, intestinal amino acid profile, and performance of dairy cows. *J Anim Sci* 1999;77:1905-1918.
 43. Herrera-Saldana R, Gómez-Alarcon R, Torabi M, Huber J. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J Dairy Sci* 1990;73:142-148.
 44. Zinn RA, Shen Y. An evaluation of ruminally degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves. *J Anim Sci* 1998;76(5):1280-1289.
 45. May D, Calderón JF, González VM, Montano M, Plascencia A, Salinas-Chavira J, Torrentera N, Zinn RA. Influence of ruminal degradable intake protein restriction on characteristics of digestion and growth performance of feedlot cattle during the late finishing phase. *J Anim Sci Technol* 2014;56:14.
 46. Huws SA, Kim EJ, Cameron SJS, Girdwood SE, Davies L, Tweed J, *et al.* Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microbial Biotechnol* 2014;8:331-341.
 47. Enjalbert F, Combes S, Zened A, Meynadier A. Rumen microbiota and dietary fat: a mutual shaping. *J Appl Microbiol* 2017 [Accepted]. doi: 10.1111/jam.13501
 48. Chen G, Russell J. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin-sensitive ruminal bacterium. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:2186.
 49. Thurston B, Dawson K, Strobel H. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:2631.
 50. Strobel H. Pentose utilization and transport by the ruminal bacterium *Prevotella rurninicola*. *Arch Microbiol* 1993;159:465.
 51. Strobel H, Russell J. Succinate transport by a ruminal selenomonad and its regulation by carbohydrate availability and osmotic strength. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:248.
 52. McCann JC, Luan S, Cardoso FC, Derakhshani H, Khafipour E, Loor JJ. Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. *Front*

- Microbiol 2016;7:701.
53. Clark J, Klusmeyer T, Cameron M. Microbial protein synthesis and flows of nitrogenous fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci* 1992;75:2304-2323.
 54. Hristov A, Ivan M, Rode L, McAllister T. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J Anim Sci* 2001;79:515-524.
 55. Huhtanen P, Brotz G, Satter L. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. *J Anim Sci* 1997;75:1380-1392.
 56. Taylor CC, Allen MS. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. *J Dairy Sci* 2005;88:1413-1424.
 57. Owens FN, Hanson CF. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J Dairy Sci* 1992;75:2605-2617.
 58. Titgemeyer EC. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *J Anim Sci* 1997;75:2235-2247.
 59. Kelzer JM, Kononoff PJ, Gehman MA, Tedeschi LO, Karges K, Gibson ML. Effects of feeding three types of corn-milling coproducts on milk production and ruminal fermentation of lactating Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2009;92:5120-5132.
 60. Ramirez RHA, Nestor K, Tedeschi LO, Callaway TR, Dowd SE, Fernando SC, Kononoff PJ. The effect of brown midrib corn silage and dried distillers' grains with solubles on milk production, nitrogen utilization and microbial community structure in dairy cows. *Can J Anim Sci* 2012;92:365-380.
 61. May ML, DeClerck JC, Quinn MJ, DiLorenzo N, Leibovich J, Smith DR, Hales KE, Galyean ML. Corn or sorghum wet distillers grains with solubles in combination with steam-flaked corn: Feedlot cattle performance, carcass characteristics, and apparent total tract digestibility. *J Anim Sci* 2010;88:2433-2443.
 62. Dehority B. Methodology for measuring microbial growth in the rumen. *Proc Int Symp Nutr Requirem Ruminants. Universidad Federal de Vicosa, Vicosa-MG-Brazil.* 1995;121-137.
 63. Zinn R, Owens F. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can J Anim Sci* 1986;66:157-166.
 64. Obispo N, Dehority B. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria.

- J Anim Sci 1999;77:3084-3095.
65. Orskov ER. Starch digestion and utilization in ruminants. J Anim Sci 1986;63:624-1633.
 66. Calsamiglia S, Stern M, Firkins J. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. J Anim Sci 1996;74:1375–1381.
 67. Hristov AN, McAllister TA, Ouellet DR, Broderick GA. Comparison of purines and nitrogen-15 as microbial flow markers in beef heifers fed barley- or corn-based diets. Can J Anim Sci 2005;85:211-222.
 68. Csapo J, Albert C, Pohn G, Csapo Z. Rapid method for the determination of diaminopimelic acid using ion exchange chromatography. Acta Univ Sapientiae Alimentaria 2008;1:99-108.
 69. Arambel M, Bartley E, Dufva G, Nagaraja T, Dayton A. Effect of diet on amino and nucleic acids of rumen bacteria and protozoa. J Dairy Sci 1982;65:2095-2101.
 70. Van B, Sargeant M, Gnad D, DeBey B, Lechtenberg K, Nagaraja T. Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. Appl Environ Microbiol 2004;70(9):5336–5342.
 71. Vicente F, Guada A, Surra J, Balcells J, Castrillo, C. Microbial contribution to duodenal purine flow in fattening cattle given concentrate diets, estimated by purine N labelling (¹⁵N) of different microbial fractions. J Anim Sci 2004;78:159–167.
 72. Kubista M, Andrade J, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, *et al.* The real-time polymerase chain reaction. Molec Asp Med 2006;27:95–125.
 73. Yu Y, Lee C, Kim K, Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol Bioengin 2005;89:670-679.
 74. Castillo-Lopez E, Klopfenstein TJ, Fernando SC, Kononoff PJ. Effect of dried distillers' grains and solubles when replacing corn or soybean meal on rumen microbial growth *in vitro* as measured using DNA as a microbial marker. Can J Anim Sci 2014;94(2):349-356.
 75. Sylvester JT, Karnati SKR, Yu Z, Newbold CJ, Firkins JL. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. J Dairy Sci 2005;88:2083–2095.
 76. Klopfenstein TJ, Erickson GE, Bremer VR. Board-invited review: Use of distillers by-

- products in the beef cattle feeding industry. *J Anim Sci* 2008;86:1223-1231.
77. Vetrovsky T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS ONE* 2013;8(2):e57923.
 78. Castillo-Lopez E, Moats J, Aluthge ND, Ramirez RHA, Christensen D, Mutsvangwa T, *et al.* Effect of partially replacing a barley-based concentrate with flaxseed-based products on the rumen bacterial population of lactating Holstein dairy cows. *J Appl Microbiol* 2017;124:42-57.
 79. Jami E, White BA, Mizrahi I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PloS ONE* 2014;9(1), e85423.
 80. Castillo-Lopez E, Jenkins CJR, Aluthge ND, Westom T, Fernando SC, Kononoff PJ. The effects of regular or low-fat distillers grains and solubles on rumen methanogenesis and the rumen bacterial community. *J Appl Microbiol* 2017;123:1381-1395.
 81. Rodríguez CA, González, J, Alvir MR, Repetto JL, Centeno C, Lamrani F. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *Br J Nutr* 2000;84(3):369-376.
 82. González J, Arroyo JM, Ouarti M, Guevara-González J, Rodríguez CA, Alvir MR, *et al.* Composition of free and adherent ruminal bacteria: inaccuracy of the microbial nutrient supply estimates obtained using free bacteria as reference samples and (15)^N as the marker. *Animal* 2012;6(3):468-75.
 83. Sylvester JT, Karnati SKR, Yu Z, Newbold CJ, Firkins JL. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *J Dairy Sci* 2005;88:2083-2095.
 84. Hristov AN. Comparative characterization of reticular and duodenal digesta and possibilities of estimating microbial outflow from the rumen based on reticular sampling in dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;85:2606-2613.
 85. Cooper RJ, Milton CT, Klopfenstein TJ, Scott TL, Wilson CB, Mass RA. Effect of corn processing on starch digestion and bacterial crude protein flow in finishing cattle. *J Anim Sci* 2002;80:797-804.
 86. Glenn BP, Varga GA, Huntington GB, Waldo DR. Duodenal nutrient flow and digestibility in Holstein steers fed formaldehyde- and formic acid-treated alfalfa or orchardgrass silage at two intakes. *J Anim Sci* 1989;67:513-528.
 87. Leupp JL, Lardy GP, Karges KK, Gibson ML, Caton JS. Effects of increasing level of corn distillers dried grains with solubles on intake, digestion, and ruminal fermentation

- in steers fed seventy percent concentrate diets. *J Anim Sci* 2009;87:2906-2912.
88. Moorby JM, Dewhurst RJ, Evans RT, Danelon JL. Effects of dairy cow diet forage proportion on duodenal nutrient supply and urinary purine derivative excretion. *J Dairy Sci* 2006;89:3552–3562.
89. Ipharraguerre IR, Shabi Z, Clark JH, Freeman DE. Ruminant fermentation and nutrient digestion by dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J Dairy Sci* 2002;85:2890–2904.
90. Schwab EC, Schwab CG, Shaver RD, Girard CL, Putnam DE, Whitehouse NL. Dietary forage and nonfiber carbohydrate contents influence B-vitamin intake, duodenal flow, and apparent ruminal synthesis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2006;89:174–187.