

# TRABAJOS DE COLABORACION

ESCUELA DE NUTRICION. GRANADA. ESPAÑA  
IADIZA, CONICET. ARGENTINA

## INFLUENCIA DE LA KANAMICINA, COLISTINA Y PENICILINA SOBRE LA FERMENTACION RUMINAL "IN VITRO" DE LA UREA

J. Llopis<sup>1</sup>; J. Silva<sup>2</sup> y S. Zamora<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se ha estudiado, empleando el método de fermentación ruminal "in vitro" de Tilley y Terry, el efecto sobre la fermentación de la urea de la Kanamicina, Colistina y Penicilina a dosis de 0,125 a 6,250 mg/ml, 500 a 15.000 U.I./ml y 50 a 2.500 U.I./ml. respectivamente. Los tres antibióticos a dosis altas reducen la cantidad final de nitrógeno precipitado, lo que supone inhibición del crecimiento de la población microbiana, y aumentan la concentración de amoníaco. La eficacia de los antibióticos, a las dosis empleadas, es máxima para la Penicilina y mínima para la Kanamicina.

### SUMMARY

The effect of Kanamycin, Colistin and Penicillin —using dosages from 0.125 up to 6.250 mg/ml; 500 up to 15.000 U.I./ml and 50 up to 2.500 U.I./ml respectively— over the fermentation of urea has been studied using the Tilley and Terry rumen fermentation "in vitro" method. All of the three antibiotics at high dosages increase the ammonia concentration and reduce the final amount of precipitated nitrogen because of the inhibition of the microbial population growth. The efficiency of antibiotics at the used doses is maximal for Penicillin and minimal for Kanamycin.

---

<sup>1</sup> Escuela de Nutrición. Universidad de Granada

<sup>2</sup> Investigador Iadiza-Conicet. Argentina

## INTRODUCCION

Es evidente que la presencia de antibióticos en el rumen, al incidir sobre el crecimiento de la población bacteriana, puede repercutir sobre los procesos de fermentación ruminales; esta repercusión puede tener importancia práctica en zootecnia, dada la cada vez más frecuente adición de antibióticos a los piensos compuestos, y la profusa utilización de dichos agentes en medicina veterinaria; por otra parte el problema presenta también interés teórico, ya que la investigación sobre el efecto de antibióticos con diferentes espectros puede aportar datos valiosos sobre el tipo de microorganismos presentes en el rumen en cada momento o situación experimental (2). El estudio de este tema, mediante los métodos de fermentación ruminal "in vitro", a pesar de sus limitaciones, derivadas del alejamiento de las condiciones estrictamente fisiológicas, constituye un modelo experimental de indudable utilidad. En el presente trabajo se ha pretendido establecer el efecto de tres antibióticos de diferente espectro, Kanamicina, Colistina y Penicilina, y empleando dosis distintas que van desde las terapéuticas habituales hasta dosis 30, 50 y 60 veces mayores para la Colistina, Penicilina y Kanamicina, respectivamente. Se ha estudiado concretamente la fermentación de la fracción nitrogenada utilizando como sustrato nitrogenado la urea, y como sustrato energético una mezcla de almidón y celulosa (3 partes de urea, 10 de celulosa y 40 de almidón).

## MATERIAL Y METODOS

El líquido ruminal procedía de dos corderos de raza Segureña, machos, de un año de edad y unos 35 kg. de peso, provistos de una cánula en el saco dorsal del rumen, alimentados con un pienso standard dos veces al día, y adaptados a las condiciones experimentales durante tres meses, previamente al comienzo de los ensayos.

Las muestras de líquido ruminal fueron tomadas cuatro horas después de la primera comida, retirando el agua cuatro horas antes de la toma de la muestra; las muestras fueron obtenidas mediante succión.

Los experimentos se realizaron siguiendo el método descrito por Tilley y Terry (7), fijando el tiempo de incubación en dos horas cincuenta minutos, tiempo que se eligió por coincidir con el punto máximo en la curva de concentración de amoníaco, y que está de acuerdo con lo recomendado por otros autores (5, 6). La determinación de nitrógeno se realizó por el método de Kjeldahl, y se analizaron por separado, nitrógeno soluble y nitrógeno precipitado por ácido tricloracético (1) determinando además el nitrógeno total con fines de comprobación. Según Naga et al. (4) y Phillipson et al. (6), los cambios en el nitrógeno precipitado con un buen índice de las variaciones en el crecimiento microbiano. El amoníaco se determinó por destilación en corriente de vapor. En todos los ensayos se ha realizado simultáneamente una prueba en blanco (líquido ruminal más salvia artificial),

una prueba control (con adición de sustrato) y el problema (en el que además se añade el antibiótico). Las concentraciones empleadas para cada antibiótico fueron las siguientes: Kanamicina (0,125; 1.250 y 6.250 mg/ml de líquido ruminal); Penicilina (50, 250, 500, 1.000 y 2.500 U.I./ml de líquido ruminal); Colistina (500, 2.500, 5.000, 7.500 y 15.000 U.I./ml de líquido ruminal); como disolvente de los antibióticos se empleó agua destilada y desionizada.

Los resultados se han tratado estadísticamente según la distribución de la "t" de Student.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En todos los experimentos realizados, al comparar los valores de los ensayos en blanco y los ensayos control, (Tablas, I, II y II) se observa un aumento del nitrógeno soluble, lo cual es evidente, ya que se ha adicionado urea. Ahora bien, la urea, después de solubilizarse, es atacada por los microorganismos ruminales, formando rápidamente amoníaco, que posteriormente es utilizado en parte para la síntesis de proteína bacteriana (7); en nuestros ensayos se observa un incremento significativo ( $P < 0,001$ ) en la concentración de amoníaco, pero el nitrógeno precipitado no presenta diferencias significativas, probablemente debido a que el periodo experimental no es suficiente para que se manifieste en toda su magnitud el aumento de la biomasa microbiana.

Las diferencias entre los valores obtenidos en los ensayos control y en las pruebas en blanco depende no sólo de la adición de sustrato, sino de la actividad de la fermentación ruminal sobre el sustrato añadido. Encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre el nitrógeno total y el nitrógeno precipitado (Fig. 1), lo cual, puesto que la influencia de la cantidad de bacterias presentes en el líquido ruminal ha sido eliminada restando el valor blan-

**TABLA I**

Influencia de la Kanamicina sobre la fermentación ruminal de la urea "in vitro" (\*)

Experimento	Dosis	Nitrógeno Soluble			Nitrógeno Precipitado			Amoníaco		
		Blanco	Control	Problema	Blanco	Control	Problema	Blanco	Control	Problema
1	0,125 mg/ml	12,60	28,80	25,40	16,20	16,60	16,40	4,40	25,8(*)	26,50
		$\pm 0,48$	$\pm 2,08$	$\pm 1,52$	$\pm 0,81$	$\pm 0,93$	$\pm 0,44$	$\pm 0,13$	$\pm 1,83$	$\pm 2,05$
2	1,250 mg/ml	12,60	28,80	23,50	16,20	16,40	16,70	4,40	25,8(*)	25,40
		$\pm 0,48$	$\pm 2,08$	$\pm 1,46$	$\pm 0,81$	$\pm 0,93$	$\pm 0,72$	$\pm 0,13$	$\pm 1,83$	$\pm 1,85$
3	6,250 mg/ml	20,20	36,40	39,90	28,20	25,50	19,5(-)	8,10	34,4(*)	36,80
		$\pm 1,03$	$\pm 1,38$	$\pm 1,33$	$\pm 1,20$	$\pm 1,00$	$\pm 0,20$	$\pm 0,37$	$\pm 1,97$	$\pm 1,57$

Los resultados se expresan en mg/100 ml.

(\*) Cada uno de los valores expresados en esta tabla son la media de diez resultados individuales.

Nivel de significación entre Control y Problema (-)  $p < 0,01$

Nivel de significación entre Blanco y Control (\*)  $p < 0,001$

TABLA II

Influencia de la Colistina sobre la fermentación ruminal de la urea "in vitro"(\*)

Experimento	Dosis	Nitrógeno Soluble			Nitrógeno Precipitado			Amoníaco		
		Blanco	Control	Problema	Blanco	Control	Problema	Blanco	Control	Problema
1	500 U.I./ml	23,70	27,30	28,70	25,30	24,30	22,37	8,10	20,00(#)	19,00
		<u>+2,90</u>	<u>+2,67</u>	<u>+3,37</u>	<u>+1,34</u>	<u>+2,67</u>	<u>+1,69</u>	<u>+0,44</u>	<u>+0,79</u>	<u>+0,76</u>
2	2500 U.I./ml	22,00	26,60	27,60	25,60	24,80	23,80	8,10	22,80(#)	21,00
		<u>+2,34</u>	<u>+2,08</u>	<u>+1,89</u>	<u>+1,32</u>	<u>+2,57</u>	<u>+1,69</u>	<u>+0,27</u>	<u>+1,23</u>	<u>+0,92</u>
3	5000 U.I./ml	19,70	27,40	33,50	25,60	26,40	24,00	8,00	24,60(#)	26,50
		<u>+1,85</u>	<u>+2,82</u>	<u>+3,19</u>	<u>+1,54</u>	<u>+2,57</u>	<u>+2,25</u>	<u>+0,29</u>	<u>+0,88</u>	<u>+0,93</u>
4	7500 U.I./ml	19,70	25,30	34,50	24,90	24,20	23,30	7,90	24,20(#)	26,70(+)
		<u>+2,59</u>	<u>+1,94</u>	<u>+5,38</u>	<u>+1,64</u>	<u>+3,08</u>	<u>+2,66</u>	<u>+1,49</u>	<u>+0,69</u>	<u>+0,74</u>
5	15000 U.I./ml	20,40	26,30	36,30	25,30	23,50	15,30(+)	8,00	23,70(#)	29,30(·)
		<u>+2,35</u>	<u>+3,21</u>	<u>+5,58</u>	<u>+1,74</u>	<u>+3,21</u>	<u>+1,20</u>	<u>+0,50</u>	<u>+1,02</u>	<u>+0,94</u>

Los resultados se expresan en mg/100 ml.

(\*) Cada uno de los valores expresados en esta tabla son la media de diez resultados individuales.

Nivel de significación entre Control y Problema (+)  $p < 0,05$ ; (·)  $p < 0,01$

Nivel de significación entre Blanco y Control (#)  $p < 0,001$

TABLA III

Influencia de la Penicilina sobre la fermentación ruminal de la urea "in vitro"(\*)

Experimento	Dosis	Nitrógeno Soluble			Nitrógeno precipitado			Amoníaco		
		Blanco	Control	Problema	Blanco	Control	Problema	Blanco	Control	Problema
1	50 U.I./ml	10,90 +1,10	21,20 +2,27	22,70 +3,62	20,90 +0,60	18,10 +1,22	16,90 +1,47	5,00 +0,32	24,50(#) +0,73	27,40(-) +0,58
2	250 U.I./ml	10,90 +1,10	21,20 +2,27	16,20 +1,28	20,90 +0,60	18,10 +1,22	14,70 +2,05	5,00 +0,32	24,50(#) +0,73	27,30(-) +0,53
3	500 U.I./ml	10,90 +1,10	21,20 +2,27	15,90 +0,97	20,90 +0,60	18,10 +1,22	14,70 +1,45	5,00 +0,32	24,50(#) +0,73	27,40(·) +0,27
4	1000 U.I./ml	19,90 +1,64	30,20 +1,51	22,50 +3,66	21,70 +1,24	16,20 +0,45	11,70(+) +1,37	5,90 +0,43	24,10(#) +0,72	29,30(:) +1,05
5	2500 U.I./ml	19,90 +0,46	41,70 +1,38	44,70 +2,00	25,90 +1,60	30,40 +0,66	24,80(:) +0,98	5,60 +0,46	27,60(#) +1,41	34,50(·) +0,46

Los resultados se expresan en mg/100 ml.

(\*) Cada uno de los valores expresados en esta tabla son la media de diez resultados individuales.

Nivel de significación entre Control y Problema (+)  $p < 0,05$ ; (-)  $p < 0,02$ ; (·)  $p < 0,01$ ; (: )  $p < 0,001$

Nivel de significación entre Blanco y Control (#)  $P < 0,001$

co, indica que parte del nitrógeno presente en el sustrato ha sido incorporado a proteína microbiana.

La influencia de los tres antibióticos se ha analizado comparando los resultados de los ensayos, problemas con sus controles correspondientes (Tablas I, II y III). A las dosis mínimas para Kanamicina y Colistina (0,125 mg y 500 U.I./ml

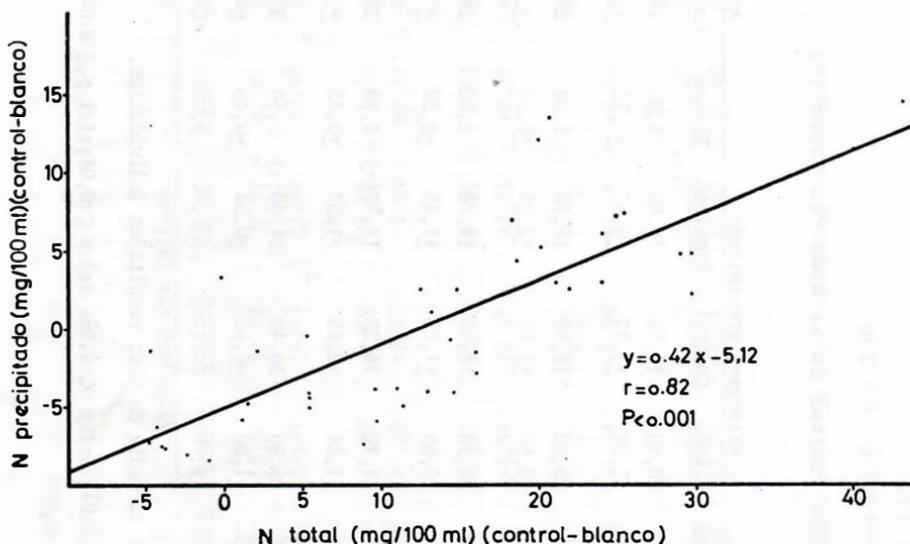


Figura 1.- Relación entre N total y N precipitado.

de líquido ruminal respectivamente) no se modificaron significativamente ninguno de los parámetros estudiados: nitrógeno soluble, nitrógeno precipitado y concentración de amoníaco; lo mismo ocurre a dosis 10 veces mayores, así como a varias dosis intermedias que se probaron. Para obtener un efecto notable de estos antibióticos se precisan dosis elevadas, lo que, en términos generales, ya había sido sugerido por Hoshino (3), en nuestros ensayos a las dosis de 15.000 U.I./ml para la Colistina (Tabla II) y de 6.250 mg/ml para la Kanamicina (Tabla I), se observa una disminución significativa ( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ ) en el nitrógeno precipitado, lo que pone de manifiesto que a estas dosis ambos antibióticos son eficaces para inhibir el crecimiento de la población microbiana. El nitrógeno soluble está aumentado para dosis altas de los antibióticos, pero las diferencias carecen de significación estadística. La concentración de amoníaco está igualmente elevada por el efecto de ambos antibióticos, si bien este incremento es mucho más marcado, y además estadísticamente significativo en el caso de la Colistina (Tabla II) ( $P < 0,05$  para las dosis de 7.500 U.I./ml y  $P < 0,01$  para 15.000 U.I./ml), lo cual indica una menor

utilización del amoníaco por la población bacteriana. En conjunto, según nuestros resultados, la Colistina ejerce, sobre la flora microbiana ruminal, una acción más enérgica que la Kanamicina.

En el caso de la Penicilina (Tabla III) se obtienen resultados semejantes a los anteriormente descritos para el nitrógeno soluble, en el que no aparece ninguna modificación significativa, y para el nitrógeno precipitado, en el que se observa una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) para dosis 20 veces mayores que la considerada terapéutica. Con respecto al amoníaco, la Penicilina provoca un aumento de su concentración, ya desde la dosis mínima, que de nuevo atribuimos a una disminución de la biomasa bacteriana.

Todo parece indicar un efecto de la Penicilina superior al de los otros antibióticos estudiados; no obstante, dada la enorme complejidad de la población microbiana ruminal, y teniendo presente la necesidad de dosis muy elevadas para obtener efectos claros, resulta muy difícil extraer conclusiones de un estudio de este tipo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. CROYLE, R.C.; LONG, T.A. y HERSHBERGER, T.V., 1975. *J. Animal Sci.*, 40 (6): 1144.
2. GONZALEZ, J.; SALMERON, V.; ACOSTA, J. y SILVA, J.; 1979. *Vet. Microbiol.* 4 (1979): 247-253.
3. HOSHINO, S., 1965. *Jap. J. Zootech. Sci.* 30 (70): 266.
4. NAGA, M.A. y HARMEYER, J.H., 1975. *J. Animal Sci.* 40 (2): 374.
5. PEARSON, R.M. y SMITH, J.A.B., 1943. *Biochem. J.* 37: 153.
6. PHILLIPSON, A.T.; MARJORIE, J. DOBSON; BLACKBURN, F.H. y MILDRED BROWN, 1962. *Brit. J. Nutr.* 16: 151.
7. TILLEY, J.M.A. y TERRY, R.A., 1963. *J. Brit. Grassland Soc.* 18: 104.