

## Role of rumen ciliated protozoa in the synthesis of conjugated linoleic acid. A review<sup>□</sup>

*Papel de los protozoos ciliados ruminales en la síntesis de ácido linoleico conjugado. Revisión*

*Papel dos protozoários ciliados no rúmem para a síntese de ácido linoléico conjugado. Uma Revisão.*

Richard Zapata Salas<sup>1\*</sup>, Microb, MSc; Lina A Gutiérrez Builes<sup>1</sup>, Bact, PhD;  
Diana Polanco Echeverry<sup>1</sup>, Bact, MSc.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido: 24 octubre, 2010; aceptado: 9 agosto, 2011)

### Summary

*Traditionally, ruminal ciliate protozoa have been studied with respect to the metabolism of dietary nutrients. Their role has focused on their predatory behavior, the paradigm of its retention in the rumen, and its apparent limited flow to the duodenum. On the other hand, Conjugated Linoleic Acid (CLA) and Vaccenic Acid (VA) are important because of their nutritional value. This review aims to characterize the biological alternatives used by rumen ciliate protozoa for the production of CLA, highlighting three aspects: 1) rumen protozoa are involved only in the initial stage of biohydrogenation to produce CLA isomers, 2) desaturation by protozoa has not been reported, while endogen synthesis by desaturation of VA in mammary glands and fatty tissues has been demonstrated as the main route of CLA in ruminants, 3) even though incorporation of VA and cis9, trans11-CLA in protozoa structure is related with CLA production, this is only important when protozoa flow from rumen to duodenum, producing 30 to 43% of CLA and a 40% of VA, respectively. It is concluded that rumen protozoa are fundamental in the lipid metabolism of ruminants.*

**Key Words:** *biohydrogenation, conjugated linoleic acid, desaturation, duodenal flow, lipids of incorporation, rumen protozoa.*

□ Para citar este artículo: Zapata R, Gutiérrez LA, Polanco D. Papel de los protozoos ciliados ruminales en la síntesis de ácido linoleico conjugado. Revisión. Rev Colomb Cienc Pecu 2012; 25:135-149.

\* Autor para correspondencia: Richard Zapata Salas. Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Calle 67 Número 53-108 Bl 5 Of 134. AA 1226. Medellín, Colombia. E-mail: microbiolorich@gmail.com

### Resumen

Tradicionalmente, los protozoos ciliados ruminales han sido estudiados en relación con el metabolismo de nutrientes de la dieta suministrada al rumiante. Particularmente, su papel ha sido cuestionado debido a sus características predadoras, aunado al paradigma de la retención de los protozoos en el rumen y el aparente limitado flujo al duodeno por reciclaje de la proteína microbiana. De otro lado, los ácidos linoleico conjugado (CLA) y vacenico (VA) son dos productos de gran interés nutricional. Estas dos situaciones han generado interés en la investigación de esta representativa población de la microbiota ruminal. El objetivo de este trabajo fue caracterizar, a partir de la literatura científica, las alternativas biológicas utilizadas por los protozoos ciliados del rumen para la producción de CLA. Nosotros encontramos que: 1) los protozoos ruminales sólo participan en la parte inicial de la biohidrogenación, la “isomerización de ácidos grasos insaturados”, generando isómeros de CLA, 2) la desaturación en protozoos, no se demostró en estudios, y queda claro que la síntesis endógena por desaturación de VA, en glándula mamaria y tejidos grasos se establece como el mayor recurso de CLA en el rumiante, 3) aun cuando la incorporación de VA y cis9, trans11-CLA en la estructura de los protozoos está relacionada con la producción de CLA, esta sólo es importante hasta cuando se da el flujo de protozoos del rumen a duodeno donde son responsables del 30 al 43% del CLA y 40% del VA. Se concluye, que los protozoos ruminales son trascendentales en el metabolismo lipídico de rumiantes.

**Palabras clave:** ácido linoleico conjugado, biohidrogenación, desaturación, flujo duodenal, incorporación de lípidos, protozoos ruminales.

### Resumo

Tradicionalmente, os protozoários ciliados no rúmen têm sido estudados em relação ao metabolismo dos nutrientes na dieta fornecida ao ruminante. Em particular, o seu papel tem sido questionado devido às suas características predatórias, combinado com o paradigma da retenção de protozoários no rúmem e ao aparente fluxo limitado para o duodeno através da reciclagem da proteína microbiana. Por outro lado, o ácido linoléico conjugado (CLA) e o vacenico (VA) são dois produtos de grande interesse nutricional. Estas duas situações têm gerado interesse na investigação dessa representativa população da microbiota ruminal. O objetivo deste estudo foi caracterizar as alternativas biológicas utilizadas pelos protozoários ciliados do rúmem para a produção de CLA a partir da literatura científica. Nós encontramos que: 1) os protozoários ruminais só participam na parte inicial da biohidrogenação: a isomerização “de ácidos graxos insaturados”, gerando isômeros do CLA. 2) até hoje, não tem sido demonstrado a desaturação em protozoários e fica claro que a síntese endógena por desaturação do VA na glândula mamária e tecido adiposo se estabelece como a maior fonte de CLA no ruminante. 3) embora a incorporação de VA e cis9, trans11-CLA na estrutura do protozoário está relacionada com a produção de CLA, ésta só é importante ate quando há fluxo de protozoários do rúmem para o duodeno onde são responsáveis do 30 ate 43% do CLA e 40% do VA. A conclusão é que os protozoários ruminais são transcendentais no metabolismo lipídico dos ruminantes.

**Palavras chave:** ácido linoleico conjugado, biohidrogenação, desaturação, fluxo duodenal, incorporação de lipídeos, protozoários ruminais.

### Introducción

El rumen es un ecosistema complejo, compuesto por poblaciones de microorganismos anaeróbios (dominio *Bacteria*  $10^{10}$ - $10^{11}$  bacterias/ml, dominio *Archaea*  $10^8$ - $10^9$  metanogenos/ml y dominio *Eukarya*  $10^6$  hongos/ml y  $10^6$  protozoos ciliados/ml de contenido ruminal) (Kumar *et al.*, 2009). En el rumen los lípidos de la dieta son sometidos a hidrólisis por lipasas microbianas, para que en

un segundo paso los ácidos grasos insaturados libres, sean aprovechados por bacterias, hongos y protozoos para ser biohidrogenados (Or-Rashid *et al.*, 2008; Or-Rashid *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2006).

Por actividad biológica, el mayor producto de la biohidrogenación es el isómero (C18: 2 n9) cis9, trans11-CLA (ácido linoleico conjugado), que representa entre el 73 y 94% del total de CLA en leche, productos lácteos, carne y productos cárnicos (Rochfort *et al.*, 2008; Dhiman *et al.*, 2005).

Aunque existe una fuerte relación entre la función ruminal y el contenido de CLA en leche y tejidos lipídicos, varias investigaciones sugieren que sólo una pequeña proporción del CLA es proporcionada directamente desde el rumen (Schmid *et al.*, 2006).

Los protozoos ruminales adquieren relevancia para la síntesis endógena de CLA, al proporcionar las mayores cantidades de ácido vacénico (VA), el cual se constituye como el precursor para la síntesis endógena; este aporte se da a través de mecanismos de incorporación de ácidos grasos insaturados (AGI) y poliinsaturados (AGP) en su biomasa microbiana y por su flujo al duodeno (Or-Rashid *et al.*, 2007), ya que los microorganismos, representan la principal fuente de ácidos grasos asimilables por el rumiante (Clauss *et al.*, 2009).

El tipo y concentración de ácidos grasos presentes en la suplementación de dietas para rumiantes puede favorecer o desfavorecer el metabolismo no sólo de lípidos, sino también de otros nutrientes, por efecto sobre la reducción de la actividad fermentativa de bacterias y protozoos ruminales (Dayani *et al.*, 2007), conduciendo a una alteración en la síntesis de grasa en la leche, la reducción en la síntesis de ácidos grasos de cadena corta en la ubre y una disminución en los ácidos grasos de las lipoproteínas que la glándula mamaria recoge desde la sangre (Pulina *et al.*, 2006).

El CLA consumido por el ser humano a través de los productos lácteos y cárnicos de rumiantes ha sido identificado como un nutriente benéfico para la salud, con características antimutagénicas, anticancerígenas, reconocido como regulador de la grasa, regulador del crecimiento, modulador del sistema inmune y presenta propiedades antiinflamatorias, entre otras propiedades (German y Dillard, 2006).

El propósito del presente trabajo fue describir alternativas biológicas aprovechadas por los protozoos ciliados ruminales para contribuir a la síntesis de ácido linoleico conjugado, mediante la revisión de literatura científica.

### Biohidrogenación

El producto de la biohidrogenación es el ácido linoleico conjugado (CLA), este término utilizado en la investigación del metabolismo de la microbiota ruminal hace referencia a una serie de isómeros dienoicos conjugados con geometría posicional (C 18:2), que presentan dobles enlaces conjugados localizados en las posiciones 7-9 (C18: 2 n7), 8-10 (C18: 2 n8), 9-11 (C18: 2 n9), 10-12 (C18: 2 n10) o 11-13 (C18: 2 n11) sobre la cadena de carbono (Rochfort *et al.*, 2008) (Figura 1).

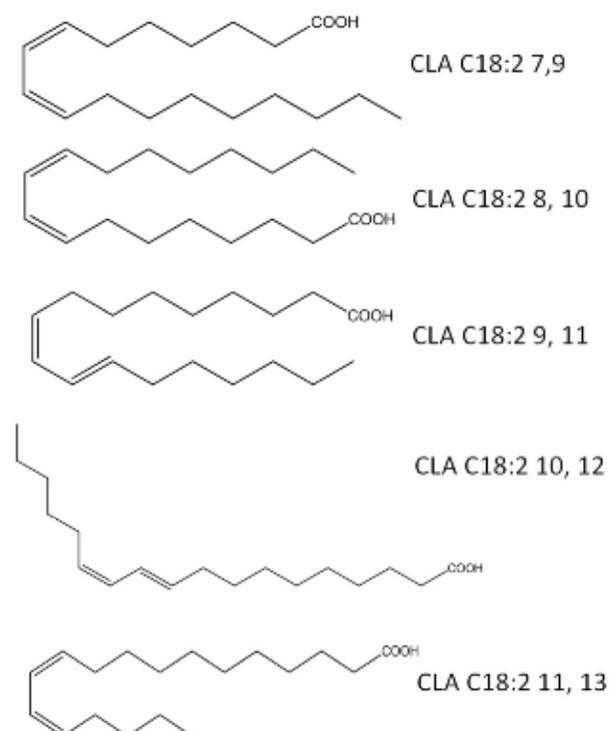


Figura 1. Estructura de diferentes isómeros de ácido linoleico conjugado.

Los ácidos linoleico (LA) (C18: 2 n6) y linolénico (C18: 3 n3) son ácidos grasos poliinsaturados predominantes en forrajes y semillas de aceite, y representan los mejores sustratos para la realización de la biohidrogenación por parte de los microorganismos del rumen (Carriquiry *et al.*, 2008).

En el rumen, el metabolismo de lípidos contenidos en la dieta comienza con la hidrólisis por enzimas microbianas (lipasas, galactosidasas y fosfolipasas) producidas por bacterias como *Ruminococcus albus*,

*Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y algunas cepas de *Butirivibrio fibrisolvens*, entre otras (Or-Rashid *et al.*, 2007), y diferentes especies de protozoos y hongos. Las transformaciones ejercidas sobre triglicéridos, diglicéridos y galactolípidos

conducen a la formación de dos o tres ácidos grasos y glicerol (Figura 2). Así, los AGI liberados son sometidos a biohidrogenación por microorganismos ruminales, produciendo isómeros trans y ácidos grasos saturados (AGS) (Carriquiry *et al.*, 2008).

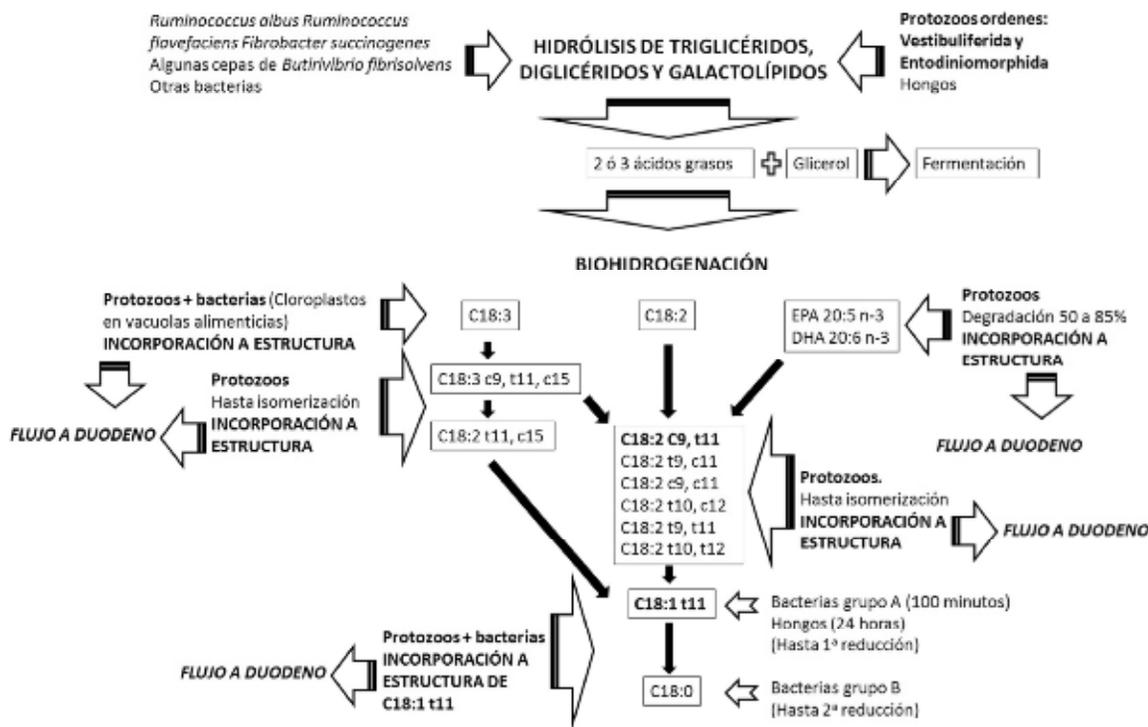


Figura 2. Participación de protozoos ciliados ruminales en la síntesis de ácido linoleico conjugado.

Se considera que la biohidrogenación del LA que ocurre en el rumen es llevada a cabo principalmente por bacterias como *Butyrvibrio fibrisolvens* y especies relacionadas (Polan *et al.*, 1964; Van de Vossenberg y Joblin, 2003). Se ha encontrado una baja actividad metabólica sobre el LA en otras poblaciones de microorganismos diferentes a la fracción bacteriana (Devillard *et al.*, 2006).

La vía de biohidrogenación para el ácido linoleico involucra un paso de isomerización que resulta en la formación del cis9, trans11-CLA. La secuencia siguiente es un paso de reducción que convierte el CLA a trans11 18:1 y ácido esteárico (SA) (18:0). La segunda vía de biohidrogenación. La segunda vía de biohidrogenación del ácido linolenico produce un trieno conjugado (C18: 3 n9) (C18:3 cis9, trans11, cis15), un dieno (C18: 2 n11) (C18:2 trans11, cis15)

y un monoeno de 18 carbonos (C18: 1 n11) o (C18: 1 n15) (C18:1 trans11, trans15 o cis15) (Carriquiry *et al.*, 2008) (Figura 2).

*Clasificación de bacterias y hongos según el metabolismo de ácidos grasos insaturados.* Por su parte, las bacterias se han clasificado en dos grupos, según su participación en la biohidrogenación. Las bacterias del grupo A no se encuentran capacitadas para desarrollar el paso final de la biohidrogenación, que consiste en transformar el VA en ácido esteárico; a diferencia del grupo B, constituido por bacterias con un metabolismo capaz de efectuar los pasos de la biohidrogenación en su totalidad (Nam *et al.*, 2006) (Figura 2). En estudios *in vitro* se obtuvo que la biohidrogenación realizada por la mezcla de hongos ruminales parece seguir los mismos pasos de la biohidrogenación por

bacterias ruminales del grupo A, en donde el LA fue convertido por hongos a CLA y luego a VA como un producto final. No obstante, las bacterias pueden ser más eficientes en el metabolismo de los ácidos grasos insaturados, debido al tiempo de acción sobre éstos, siendo reportado por Nam *et al.* (2006) un tiempo alrededor de los 100 minutos; los hongos ruminales, por su parte, actuaron más lentamente, requiriendo cerca de 24 horas. Estas diferencias significativas pueden estar relacionadas con su ciclo de desarrollo, el cual tarda aproximadamente 24 horas (Nam *et al.*, 2006) (Figura 2).

*Observaciones del metabolismo de protozoos ruminales sobre el ácido linoleico.* Devillard *et al.* (2006), evaluaron el papel de los protozoos ruminales sobre la biohidrogenación de LA. El experimento que comparó el metabolismo de LA en ovejas convencionales y defaunadas, no evidenció diferencias significativas en la actividad, obteniendo como resultado 17.3 y 14.9 µg de LA metabolizado/mg de proteína por hora, respectivamente. Los ácidos grasos producidos fueron los mismos en ovejas convencionales o defaunadas, con CLA y VA como los mayores metabolitos formados. La acumulación de los intermediarios de CLA fue más alta en muestras de ovejas defaunadas que en muestras de ovejas convencionales, teniendo un pico más alto a las 8 horas de incubación, en donde la concentración de CLA fue cinco veces más alta que en el fluido ruminal de ovejas convencionales. Sin embargo la formación de C18:1 fue similar en los dos tipos de muestra. Luego, corroboraron los resultados anteriores con fracciones de bacterias y protozoos, que fueron incubadas con LA, encontrando que el LA fue metabolizado a 17.5 y 2.5 µg de LA/mg de proteína por hora, respectivamente. Los principales productos fueron CLA y VA, donde es importante resaltar la concentración del VA formado al final de la incubación, siendo de 55.1 y 5.0 µg/mg de proteína para bacterias y protozoos, respectivamente (Devillard *et al.*, 2006).

De acuerdo con estos resultados, la participación de los protozoos ruminales en la biohidrogenación está enfocada en la primera parte del proceso, donde se realiza la isomerización. Los protozoos participan solo en la isomerización de 18:2 n-6 a

(C18: 2 n9) cis9, trans11; (C18: 2 n9) trans9, cis11; (C18: 2 n10) trans10, cis12; (C18: 2 n9) trans9, trans11 y (C18: 2 n10) trans10, trans12-CLA, pero los isómeros de CLA no son más metabolizados, mientras las bacterias producen tres isómeros de CLA adicionales (Or-Rashid *et al.*, 2009). Según Nam *et al.* (2006), solo las bacterias del grupo B, continúan con la isomerización y reducción del C18: 1 trans11 a ácido esteárico; así, las bacterias clasificadas en el grupo A, los hongos y los protozoos ruminales parecen participar de forma similar en la biohidrogenación de los AGI (Nam *et al.*, 2006) (Figura 2).

En experimentos *in vitro* se encontró que los protozoos “holotricos” (Vestibuliferida: Isotrichidae) no hidrogenaron LA ni ácido oleico, a diferencia de los protozoos “entodiniomorfos” (Entodiniomorphida: Ophryoscolecidae), los cuales fueron sometidos al mismo tratamiento (Chalupa y Kutches, 1968).

En otros estudios *in vitro* con protozoos ruminales sobre la producción de CLA utilizando como precursores LA y VA, se encontró que los protozoos en los experimentos sin antibiótico catabolizaron la mayor cantidad de LA. El (C18: 2 n9) cis9, trans11 CLA fue encontrado en una cantidad correspondiente al 37% del máximo acumulado en la suspensión de protozoos en presencia de antibióticos (P-AB) en el medio. La acumulación de trans10, cis12 CLA en la suspensión de protozoos (P-AB) fue aproximadamente 10 veces menor, en comparación a la concentración de cis9, trans11 CLA. No hubo producción significativa de VA, trans10 18:1 y 18:0 en P-AB comparado con el control, indicando que los protozoos no tienen la habilidad de biohidrogenar isómeros de CLA (Figura 2). Adicionalmente, las concentraciones de VA, trans10 18:1 y 18:0 en la suspensión de protozoos en ausencia de antibióticos (P-No-AB) fue mayor (significativamente) comparada con P-AB, indicando la función de bacterias simbióticas sobre la biohidrogenación de isómeros de CLA (Or-Rashid *et al.*, 2008) (Figura 2).

El estudio de Or-Rashid *et al.* (2008) sustenta la capacidad de producción del isómero (C18: 2 n9) cis9, trans11 CLA a partir de la isomerización de LA por la mezcla de protozoos ruminales en

presencia de agentes antibacterianos. En este estudio, las concentraciones de los isómeros (C18: 2 n9) trans9, cis11; cis9, cis11 y trans9, trans11 en la suspensión P-AB, se incrementaron continuamente en el tiempo. Isómeros menores de CLA, así como (C18: 2 n11) cis11, trans13; (C18: 2 n12) cis12, trans14; (C18: 2 n11) trans11, cis13; (C18: 2 n7) trans7, trans9; (C18: 2 n8) trans8, trans10; (C18: 2 n11) trans11, trans13 y (C18: 2 n12) trans12, trans14 han sido reportados en el contenido ruminal de vacas. Sin embargo, no hay reportes sobre cómo se sintetizan estos isómeros (Or-Rashid *et al.*, 2008).

*Simbiosis de protozoos y bacterias para la biohidrogenación en rumen.* La biohidrogenación en el rumen disminuye muy poco en animales defaunados y la presencia de protozoos no es necesaria para que ocurra, se cree que la pequeña contribución de los protozoos a la biohidrogenación es debido a que ingieren bacterias o se asocian con ellas (Devillard *et al.*, 2006). Dado que los protozoos ruminales engolfan bacterias y cloroplastos ricos en ácido linolénico (18: 3 n3), es posible que las bacterias viables dispongan de los cloroplastos provistos en las vacuolas alimenticias, para la biohidrogenación del (C18: 3 n3) libre entre la célula protozoaria (Huws *et al.*, 2009) (Figura 2). Un estudio mostró esta cooperación microbiana, donde la mayor concentración de VA (C18: 1 n11) C18: 1 trans11 (19.3 a 43.2 µg/ml), (C18: 1 n10) C18: 1 trans10 (3.5 a 5.9 µg/ml) y C18: 0 (109.7 a 111.2 µg/ml) en la incubación de protozoos sin agentes bactericidas, comparados con la suspensión protozoaria con agentes antibacterianos, VA (C18: 1 n11) C18: 1 trans11 (16.5 a 16.6 µg/ml), (C18: 1 n10) C18: 1 trans10 (2.87 a 3.06 µg/ml) y C18: 0 (105.2 a 105.4 µg/ml) indican que las bacterias simbióticas asociadas con protozoos ruminales biohidrogenan CLA adicional (Or-Rashid *et al.*, 2008).

*Influencia del metabolismo protozoario de ácidos grasos poliinsaturados sobre la estabilidad del sistema.* Pruebas realizadas con ácidos grasos poliinsaturados mostraron que sólo los protozoos ruminales y no las bacterias poseen la capacidad de degradar entre el 50 y 85% del ácido eicosapentaenoico (EPA C20: 5 n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA C20:

6 n3) presente en la dieta (Figura 2). Aunque las bacterias son las principales responsables de la biohidrogenación de AGI en el rumen, estudios muestran la importancia de los protozoos ruminales en la biohidrogenación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (Or-Rashid *et al.*, 2009). Este, se presenta como un ejemplo de la interacción entre microorganismos que permiten el equilibrio del rumen como sistema; los protozoos al metabolizar los ácidos grasos poliinsaturados de cadenas muy largas, tóxicos para la microbiota en altas concentraciones, permiten la viabilidad de poblaciones bacterianas, y a su vez, el aporte de ácidos grasos como isómeros metabolizables por otros grupos de microorganismos.

La dinámica del sistema ruminal en el metabolismo de los ácidos grasos, es también presentada por Schmid *et al.* (2006), con un ejemplo de la participación de poblaciones microbianas en el metabolismo de ácidos grasos. Se ha comprobado que un microorganismo no tiene la capacidad de metabolizar por completo los ácidos grasos poliinsaturados totales hasta el ácido esteárico como producto final. Contribuyendo de forma similar al anterior proceso descrito realizado por protozoos ciliados del rumen, algunas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, de forma excepcional son capaces de isomerizar dobles enlaces cis de ácidos grasos poliinsaturados a formas conjugadas cis, trans de dobles enlaces y de biohidrogenar estos ácidos grasos conjugados, porque expresan las enzimas linoleato isomerasa y la CLA reductasa. El producto final de este proceso es el VA, que es hidrogenado a ácido esteárico C18: 0 por otras bacterias ruminales (Schmid *et al.*, 2006).

#### *Desaturación del VA*

La carne y la leche de rumiantes son las mayores fuentes de (C18: 2 n9) cis9, trans11 CLA para el humano (Or-Rashid *et al.*, 2007). Sólo una pequeña fracción de CLA contenido en los productos obtenidos a partir de rumiantes viene directamente del rumen como intermediario de la biohidrogenación. La mayoría de CLA, es en efecto, producido en tejido animal por desaturación del VA (C18: 1 n11), reacción bioquímica mediada por la enzima delta-9-desaturasa (Devillard *et al.*,

2006; Váradyová *et al.*, 2008). La enzima delta 9 desaturasa ejerce su acción sobre el (C18: 1 n11) C18:1 trans11, introduciendo un doble enlace cis entre los carbonos 9 y 10 de los ácidos grasos (Silva *et al.*, 2009).

*Debate científico sobre la hipótesis de la actividad desaturasa en protozoos ciliados ruminales.* Emmanuel (1974), encontró en una mezcla de protozoos que el ácido octadecanoico está constituido principalmente por isómeros delta-11, proponiendo que fueron sintetizados por desaturación directa de AGS. Or-Rashid *et al.* (2007) en su estudio sobre la composición de ácidos grasos de protozoos y bacterias, al encontrar bajas cantidades de ácido esteárico C18:0 y altas cantidades de ácido vacénico (C18: 1 n11) C18:1 trans11, plantearon la actividad desaturasa delta 11 en protozoos del rumen, explicando la conversión de ácido esteárico C18:0 a ácido vacénico (C18: 1 n11) C18:1 trans11, basados en que los lípidos celulares de microorganismos del rumen pueden ser sintetizados por síntesis de novo, sin embargo, reconocen que sus resultados no validan esta hipótesis y plantean que el engolfamiento de VA en partículas alimenticias y bacterias realizado por protozoos puede ser otra forma de incorporar los lípidos en la estructura protozoaria.

Emmanuel (1974) también describe la incorporación neta de ácidos grasos de cadena corta dentro del ácido octadecanoico con dobles enlaces en la posición delta-11, que comparada con el ácido oleico delta-9 sugiere que más mecanismos pueden ser utilizados. Sin embargo, la desaturación en protozoos no había sido evaluada aún (Emmanuel, 1974).

En el mismo año Devillard *et al.* (2006), propusieron la desaturación del ácido esteárico como una ruta alternativa para la formación de CLA y VA. Mediante experimentos metabólicos y moleculares estudiaron estas posibles alternativas biológicas. A través de experimentos basados en la caracterización de los ácidos nucleicos, se diseñaron marcadores para regiones altamente conservadas de genes desaturasa de ácidos grasos, no habiendo obtenido amplificación del DNA por PCR, para la cual se utilizaron librerías de DNA para *Epidinium*

*ecaudatum caudatum*, *Eudiplodinium maggi*, *Isotricha prostoma* y *Polyplastron multivesiculatum*. El metabolismo de protozoos ruminales sobre el VA, se evaluó incubando las diferentes fracciones (protozoaria y bacteriana) con ácido esteárico para medir actividad desaturasa; no encontrando CLA ni VA, tan solo permaneció el ácido esteárico en su concentración inicial (Devillard *et al.*, 2006).

En el estudio realizado por Or-Rashid *et al.* (2007), los investigadores evidenciaron que la fracción de protozoos ruminales contenía 8.6 veces más de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 CLA y tres veces más de VA comparada con la fracción bacteriana, lo que generó la hipótesis que refiere a los protozoos como organismos con actividad desaturasa, como sugiere Emmanuel (1974). Sin embargo, en estudios del 2008, la incubación de VA en la suspensión protozoaria con agentes antibacteriales no evidenció producción de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11-CLA. El VA (350 µg/ml) en la suspensión protozoaria no disminuyó, ni biohidrogenó a ácido esteárico 18:0 durante 18 horas de incubación, resultados que presentan a los protozoos ruminales como microorganismos incapaces de biohidrogenar, ni desaturar VA (Or-Rashid *et al.*, 2008).

La hipótesis seguida durante años acerca de la acción desaturasa de los protozoos ruminales propuesta por Emmanuel *et al.* (1974) y valorada por Or-Rashid *et al.* (2007) no concuerda con los resultados obtenidos por Devillard *et al.* (2006) donde comprobaron en cultivos de protozoos la permanencia del ácido esteárico como sustrato, sin producción de CLA ni VA, datos que a su vez son corroborados por Or-Rashid *et al.* (2008), demostrando que protozoos con VA en el medio no pueden producir (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 -CLA, ni ácido esteárico. De esta manera, la desaturación del VA se establece como un proceso metabólico endógeno del rumiante. Diferentes estudios sostienen como mayor origen de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11-CLA en leche de bovinos, la síntesis endógena en glándula mamaria a través de la vía que utiliza la enzima delta 9 desaturasa, utilizando el VA como precursor (Dhiman *et al.*, 2005; German y Dillard, 2006; Bauman *et al.*, 2003; Corl *et al.*, 2001; Piperova *et*

al., 2002). La actividad desaturasa a su vez se da en tejido adiposo del rumiante (Bauman *et al.*, 1999).

#### *Incorporación de CLA y precursores en la estructura protozoaria*

Los lípidos celulares de los microorganismos ruminales pueden ser generados por síntesis *de novo* y también a través de la incorporación directa de moléculas precursoras preformadas originarias de la dieta, provenientes de la biohidrogenación incompleta de AGP que quedan en el medio (Or-Rashid *et al.*, 2007).

Datos recientes sugieren que los protozoos no participan de forma activa en la saturación de AGP o la desaturación de (C18: 1 n11) C18: 1 trans11, sin embargo, están involucrados en la síntesis de CLA, gracias a características de su biología en relación a la conformación de su estructura celular. Para explicar las concentraciones de CLA y (C18: 1 n11) C18: 1 trans11 entre estos eucariotas, se ha planteado la hipótesis que sustenta que es debido a la incorporación preferencial de estos ácidos grasos dentro de sus membranas celulares (Devillard *et al.*, 2006) (Figura 2) y como tal las diferencias entre las dietas están relacionadas con su formación en el rumen (Huws *et al.*, 2009).

Estudios en donde se incubó una mezcla de protozoos con LA en presencia de antibióticos sugiere que los protozoos podrían ser importantes en la biohidrogenación, pero los resultados son variables y no concluyentes. Devillard *et al.* (2006) sostiene que es improbable que el CLA y VA sea formado por protozoos vía biohidrogenación de LA. Se desconocen los mecanismos por los cuales el CLA y el VA son acumulados en altas concentraciones en los protozoos; es posible que los protozoos aprovechan aún mejor que las bacterias los productos intermediarios de la biohidrogenación, al incorporarlos en su estructura (Devillard *et al.*, 2006).

*Comparación de la composición de ácidos grasos de bacterias y protozoos del rumen.* El engolfamiento por parte de los protozoos de partículas alimenticias con VA asociado y células bacterianas, puede ser otra forma de incorporar

los lípidos protozoarios. Or-Rashid *et al.* (2007) encontraron en protozoos ruminales un 47% de ácidos grasos de cadenas ramificadas e impares, porcentajes más bajos que los encontrados en la fracción bacteriana. Así, los AGI contenidos en la estructura de protozoos es dos a tres veces mayor con relación a bacterias y pueden compensar la deficiencia de ácidos grasos de cadenas ramificadas e impares para el mantenimiento de la fluidez lipídica y la función de la membrana celular en protozoos (Or-Rashid *et al.*, 2007).

Otros autores ya han reportado que los lípidos protozoarios contienen mayor cantidad de AGI que los lípidos bacterianos (Devillard *et al.*, 2006). Aspecto de importancia para el metabolismo de lípidos en rumiantes, ya que, bajo ciertas condiciones los protozoos pueden representar aproximadamente la mitad de la biomasa microbiana (Or-Rashid *et al.*, 2008). Se ha estimado, que cuando más de la mitad de la biomasa microbiana ruminal son protozoos, cerca del 75% de los ácidos grasos microbianos presentes en el rumen pueden ser de origen protozoario, por tanto, toma relevancia la hipótesis que presenta a los protozoos como una importante fuente de CLA y VA para el rumiante (Devillard *et al.*, 2006).

Diferentes estudios demuestran que los protozoos ingieren cloroplastos, lo que explica que la ingestión de cloroplastos ricos en AGP contribuye al alto contenido de AGP en la estructura protozoaria, en comparación con la composición estructural de bacterias (Huws *et al.*, 2009) (Figura 2).

Los resultados obtenidos por Or-Rashid *et al.* (2007) mostraron que los protozoos ruminales tienen los más altos porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) totales, AGP n6 totales, AGP n3 totales y CLA total (2.3, 3.9, 3.45 y 6.8 veces más alto, respectivamente) comparado con bacterias. Las bacterias a su vez, tienen más bajos niveles de isómeros de trans 18:1 que los protozoos (3.6 y 9.7% del total de ácidos grasos, respectivamente). Entre todos los isómeros de CLA el (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 fue el más abundante tanto en bacterias como en protozoos. Sin embargo, es de resaltar que la proporción de

cis9, trans11 en protozoos fue 8.6 veces mayor que en bacterias. No está claro por qué contienen mayor cantidad de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 con relación a bacterias, sin embargo, una hipótesis adicional a la que propone que los protozoos pueden tener actividad desaturasa para convertir VA a CLA cis9, trans11, hace referencia a la incorporación protozoaria de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 CLA desde bacterias simbiotas, las cuales isomerizan AGI 18:2 (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, cis12 a (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 CLA dentro de la célula protozoaria, no obstante, no hay reportes que demuestren esta actividad en protozoos (Or-Rashid et al., 2007).

En este mismo estudio, después del (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 se obtuvo en mayor proporción los isómeros (C18: 2 n9) C18: 2 trans9, trans11 CLA y (C18: 2 n10) C18: 2 trans10, trans12 CLA, los cuales estuvieron presentes en bacterias y protozoos; en concordancia observaron que los protozoos contenían un mayor porcentaje de los isómeros que el grupo bacteriano. Estos resultados sugieren que la presencia de protozoos en el rumen puede potenciarse, cuando se pretenda un mayor suministro de CLA y otros AGI al intestino delgado de rumiantes (Or-Rashid et al., 2007).

Hay suficientes estudios que sustentan el alto contenido de VA en protozoos ruminales, y dado que los protozoos pueden componer aproximadamente la mitad de la biomasa microbiana, esto sugiere que los protozoos ciliados representan la mayor combinación de AGP y VA en el rumen (Huws et al., 2009). Or-Rashid et al. (2007) encontraron en su estudio sobre la composición de ácidos grasos en bacterias y protozoos ruminales, que el VA contenido en las células protozoarias era más alto que en las células bacterianas (6.6 vs 2.0% respectivamente, del total de ácidos grasos) (Or-Rashid et al., 2007). Resultados similares fueron publicados por Yáñez-Ruiz et al. (2006) y por Devillard et al. (2006).

La capacidad de los protozoos para engolfar cloroplastos liberados por células de plantas les han permitido contener una menor concentración de AGS (entre 22 y 35% de los ácidos grasos presentes en protozoos corresponden a 18:1, 18:2

ó 18:3) comparado con bacterias (entre 7 y 25% de los ácidos grasos presentes son 18:1, 18:2 ó 18:3) (Yáñez-Ruiz et al., 2006). Williams y Coleman (1992) calculan que el 31% del volumen total de *Entodinium caudatum* podría ser ocupado por bacterias engolfadas, este hecho sumado a la capacidad de los protozoos ciliados ruminales para incorporar nutrientes en su estructura, sugiere que parte de los AGS incorporados en la estructura protozoaria está relacionada con la predación bacteriana.

Resultados obtenidos por Devillard et al. (2006), sobre la composición de ácidos grasos estructurales, demostraron que la media del total de ácidos grasos de bacterias y protozoos fue similar (50 y 52.2 µg de ácido graso/mg proteína), respectivamente. No obstante, los protozoos contienen mayor proporción de AGI que la mezcla de bacterias ruminales. La media de la proporción de AGI C:18 fue de 42% en los ácidos grasos de los protozoos con un rango de 40.8 a 43.3%, mientras que en bacterias fue del 11% con un rango entre 9.3 y 12.7%. En concordancia, los protozoos evidenciaron mayor concentración de AGM, principalmente ácido oleico (C18: 1 n9) C18: 1 cis9 y VA, siendo de 3 a 4 veces más alto que en bacterias. Igualmente, se encontró que los protozoos ciliados ruminales son más ricos en LA y CLA que las bacterias del rumen. El CLA alcanzó el 5% del total de ácidos grasos en células protozoarias, los dos mayores isómeros de CLA en protozoos fueron (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 y (C18: 2 n9) C18: 2 trans9, trans11, y en contraste el CLA no fue detectable en bacterias (Devillard et al., 2006).

Los resultados obtenidos por Váradyová et al. (2008), son consistentes con los obtenidos por Huws et al. (2009); Or-Rashid et al. (2007); Devillard et al. (2006); Yáñez-Ruiz et al. (2006), donde los AGI, y principalmente el isómero (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11-CLA y el VA están presentes en cantidades representativamente más altas que las contenidas en bacterias (Váradyová et al., 2008).

*Variación de AGI, CLA y VA en poblaciones de protozoos ciliados ruminales.* Se desconocen los mecanismos por los cuales los protozoos ciliados ruminales pueden almacenar AGI (Yáñez-Ruiz et al., 2006), a pesar de que en términos generales

se refiere que los protozoos ciliados ruminales contienen 2 a 3 veces más AGI (incluidos CLA y VA) que bacterias, en los análisis por especie se ha identificado que los protozoos ruminales contienen diferente composición y cantidad.

Devillard *et al.* (2006), evaluaron la composición de ácidos grasos en *Isotricha prostoma*, *Diplolastron affine*, *Ophryoscolex caudatus*, *Epidinium ecaudatum caudatum*, *Entodinium caudatum*, *Diplodinium denticulatum*, *Entodinium furca monolobum* y *Entodinium nannellum*. Las especies grandes fibrolíticas como *Epidinium ecaudatum caudatum* contienen más de 10 veces CLA y VA que las especies más pequeñas, incluyendo *Entodinium nanellum*. La proporción de AGI en el total de ácidos grasos varió entre el 28.7 y 48.8%, con diferencias entre especies, particularmente evidente por los porcentajes de CLA y VA. Todas las especies contienen VA, pero el CLA fue indetectable en *I. prostoma*, *E. nanellum* y *E. furca monolobum*. El porcentaje de CLA estuvo generalmente acompañado por un alto porcentaje de VA. El contenido de CLA y el VA de los lípidos protozoarios fue menor en las especies pequeñas que en las grandes, excepto en *I. prostoma*. Parece ser, que la concentración de CLA y VA en los lípidos protozoarios está relacionada con el tamaño de las células protozoarias, con excepción de *I. prostoma*. Este protozoario fue el único holotrico investigado en este estudio y a pesar, de su gran tamaño y por lo general alto contenido de AGI, ya reportados por Harfoot (1978), en concentraciones similares a las presentes en entodiniomorfos, este protozoario en el estudio de Devillard presentó baja cantidad de VA y concentraciones indetectables de CLA (Devillard *et al.*, 2006).

En general se observa que la capacidad de los protozoos para almacenar ácidos grasos depende de la combinación de diferentes factores: especie, tamaño, nivel de incorporación de ácidos grasos no esterificados a lípidos celulares, presencia de material particulado, nivel de hidrogenación de AGI y relaciones simbióticas con bacterias ruminales. Es de resaltar como los AGI parecen ser protegidos parcialmente de la biohidrogenación por su incorporación dentro de los fosfolípidos microbianos (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006).

*Asimilación de ácidos grasos de la dieta por protozoos ciliados del rumen.* La adición de lípidos a la dieta, especialmente ácidos grasos libres (50 al 100%) incrementa el contenido de ácidos grasos en protozoos. Esto es debido a la incorporación directa de ácidos grasos dentro de los protozoarios, los cuales pueden ser mucho mayores que los generados por síntesis *de novo* (Doreau y Ferlay, 1995), estos datos coinciden con los obtenidos por Or-Rashid *et al.* (2007). Se conoce poco sobre la manipulación de la composición de los ácidos grasos en protozoos. Se considera que según el tipo de lípidos aportados en la suplementación varía el metabolismo lipídico. Se ha reportado que la suplementación con aceite de grano de soya, el cual incrementa la concentración de ácido linoleico en la fracción de ácidos grasos libres, pero no en la fracción fosfolipídica. Basados en estos datos, se cree que la gran incorporación de ácidos grasos depende de su naturaleza, y que el incremento en la concentración de ácidos grasos modifica la fracción de ácidos grasos libres, que forma los lípidos de almacenamiento (Doreau y Ferlay, 1995).

La habilidad de las bacterias y protozoos ruminales para incorporar dentro de la célula microbiana ácidos grasos provenientes de la dieta, con el fin de evitar la síntesis *de novo* desde precursores de ácidos grasos de cadena corta ha sido referida previamente por Erwin *et al.* (1963); Marwaha *et al.* (1972); Wu y Palmquist (1991). Es claro, que el ritmo de incorporación de ácidos grasos a lípidos celulares, es fundamental para la protección de los AGI de la biohidrogenación (Váradyová *et al.*, 2008); pues, se ha sugerido que sólo una pequeña porción de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11-CLA escapa a la biohidrogenación bacteriana en el rumen (Dhiman *et al.*, 2005).

Váradyová *et al.* (2008), en sus experimentos encontraron que los AGI, especialmente VA y (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11-CLA en el control y en todas las dietas fueron más altos en la fracción protozoaria que en la fracción bacteriana; estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Devillard *et al.* (2006) quienes sugieren dos mecanismos para la incorporación de VA dentro de la célula protozoaria: el primero hace referencia a que los protozoos ruminales tienen actividad delta

11-desaturasa por conversión del ácido esteárico a VA y el engolfamiento de VA asociado con consumo de partículas del alimento y células bacterianas (Or-Rashid *et al.*, 2007; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006), el segundo, sugiere que los protozoos no forman VA y CLA desde los ácidos esteárico y linoleico de la digesta ruminal mezclada, sugiriendo que los protozoos incorporan CLA y VA formado por bacterias. Adicionalmente, Yáñez-Ruiz *et al.* (2006) citados por Váradyová (2008) sugieren que el alto contenido de VA en los protozoos ruminales resulta de la síntesis de novo de ácidos grasos de cadena larga C18 y la subsecuente desaturación a C18:1 (Váradyová *et al.*, 2008).

#### *Flujo de protozoos al duodeno*

El material celular microbiano que fluye al duodeno desde el rumen es una importante fuente de nutrientes para el rumiante. Comúnmente, la contribución del material celular microbiano ha sido principalmente considerada en términos de suministro de nitrógeno; sin embargo, las células microbianas constituyen una proporción significativa de los ácidos grasos que salen del rumen (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006), fluyen y son absorbidos en duodeno (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006; Huws *et al.*, 2009). En este sentido, son necesarios estudios para caracterizar la composición de ácidos grasos de protozoos individuales y el desarrollo de primers específicos para cuantificar las especies en las muestras duodenales (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006).

*Dietas y perfil de ácidos grasos.* La biohidrogenación ruminal y el flujo a duodeno en tres vacas Holstein fueron evaluados utilizando tres dietas; la alimentación con aceite de pescado, resultó en un flujo más bajo de ácidos grasos totales comparado con las dietas suplementadas con aceite de semilla de lino o aceite de girasol. El balance ruminal (ingesta - flujo duodenal) del total de ácidos grasos fue 17 g/d con aceite de pescado, 35 g/d con aceite de semilla de lino y 143 g/d con aceite de girasol. El flujo a duodeno de isómeros de CLA (18:2 conjugado), se comportó de forma similar siendo en los animales alimentados con aceite de girasol, el más alto valor del flujo total de CLA (en gramos por día), con valores de 8.3, 6.9 y 4.01 para los animales alimentados con aceite de girasol, aceite de

la semilla de lino y aceite de pescado, respetivamente y valores del flujo a duodeno de (C18: 2 n9) C18: 2 cis9, trans11 de 0.22, 0.13 y 0.06 para los animales en el mismo orden. Los isómeros de (C18: 1 n11) C18: 1 trans 11 bajo las mismas dietas, presentan un flujo a duodeno con valores más altos en los bovinos alimentados con aceite de pescado, en donde se obtuvo una cantidad de 12.7, 10.8 y 9.03 (gramos por 100 g de ácidos grasos totales) para los bovinos Holstein alimentados con aceite de pescado, aceite de la semilla de lino y aceite de girasol, respetivamente (Loor *et al.*, 2005).

El incremento en el número de protozoos obtenido en el estudio, puede haber reducido las concentraciones de especies de bacterias que llevan a cabo el proceso completo de biohidrogenación. Es posible que la incorporación directa de ácidos grasos insaturados por protozoos ciliados disminuya la exposición de estos ácidos grasos a bacterias ruminales y por tanto a la biohidrogenación (Loor *et al.*, 2005). No obstante, son necesarios más estudios que brinden más evidencia de esta alternativa biológica aprovechada por los protozoos ciliados del rumen.

Aparentemente, la digestibilidad intestinal de la mayoría de isómeros parece ser proporcional a su flujo intestinal. La inhibición de la reducción de trans-18:1 a 18:0 por el aceite de pescado podría estar relacionada con el mayor número de protozoos ruminales o los efectos tóxicos del ácido eicosapentaenoico (EPA C20: 5 n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA C20: 6 n3), que a su vez pueden disminuir las concentraciones de bacterias ruminales asociadas no sólo con el paso final de reducción, sino con el proceso completo de biohidrogenación (Loor *et al.*, 2005). Se ha encontrado que con el incremento en el número de protozoos disminuye la biohidrogenación completa, por lo que disminuye el ácido esteárico (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006).

*El paradigma de la retención selectiva de los protozoos ciliados ruminales.* Devillard *et al.* (2006) encontraron en sus experimentos con fracciones bacterianas y protozoarias que el CLA y VA contenido en las células protozoarias son de 3 a 4 veces más alto que el encontrado en bacterias,

proponiendo que los protozoos pueden también representar una importante proporción de CLA y VA en el rumen (Devillard *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos autores como Dehority *et al.* (2003) y Firkins *et al.* (1998) han manifestado la dificultad para calcular la contribución de los protozoos al flujo de ácidos grasos al duodeno, conservándose la hipótesis, sustentada por estudios de hace varias décadas que aceptaban la retención selectiva ruminal de protozoos regulados por mecanismos de migración secuestro que dependen de quimiotaxis, en donde el flujo a duodeno no refleja siempre las concentraciones ruminales, sin embargo, se ha reconocido que la investigación acerca del flujo protozoario ha sido obstaculizada por la carencia de marcadores apropiados para medir el flujo (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006).

Según los hallazgos de estudios de más de una década, reportados por Devillard, 2006; los protozoos ciliados especialmente los holotricos son retenidos selectivamente dentro del rumen por mecanismos de migración secuestro que dependen de quimiotaxis, lo que en consecuencia representaría que la biomasa protozoaria que alcanza el duodeno es proporcionalmente más baja que la que podría esperarse si ellos tuvieran un flujo como el resto de la digesta ruminal; así, potenciar el flujo de protozoos al duodeno, mientras se mantenga estable el número de estas poblaciones en el rumen, puede ser beneficioso para potenciar los AGP y el contenido de VA en carne y leche (Huws *et al.*, 2009).

Recientes observaciones hechas por Devillard *et al.* (2006) sugieren que los protozoos pueden jugar un papel importante proporcionando altas concentraciones de VA y CLA comparados con bacterias. Estos hallazgos han sido confirmados por Yáñez-Ruiz *et al.* (2006), usando PCR en tiempo real para cuantificar los protozoos ruminales, permitiendo estimar que los protozoos constituyen entre el 30 y 43% del CLA y 40% del VA que alcanza el duodeno (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007) (Figura 2), y tan sólo un 10% de 18:0 y 20% de 16:0 que pasa a duodeno (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006).

### **La biología molecular como herramienta en el estudio de la microbiología ruminal**

La implementación de técnicas de biología molecular ha permitido un avance significativo en el estudio del flujo de protozoos al duodeno. Por análisis del gradiente de desnaturalización en gel de electroforesis compararon la diversidad protozoaria entre las muestras de rumen y duodeno de seis bovinos Hereford x Friesian. El juego de primers utilizado produjo 21 bandas diferentes. Cada patrón de banda obtenida de la muestra de rumen fue encontrado en la muestra duodenal del mismo animal, lo que representa la misma distribución de especies protozoarias en muestras de rumen y duodeno, estos resultados demuestran un flujo continuo sin retención selectiva (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2006).

Varios estudios han demostrado el poco flujo de CLA fuera del rumen. El flujo de VA al duodeno ha sido reportado como 20 veces mayor que el flujo de CLA en bovinos alimentados con dietas típicas (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007). Se puede especular que los AGI de la dieta pueden ser parcialmente protegidos de la biohidrogenación por la incorporación dentro de fosfolípidos estructurales de protozoos. Dado que los protozoos componen aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal, esto sugiere que los protozoos ciliados representan el mayor recurso de AGI en el rumen como resultado de su capacidad de almacenamiento. Esto, se sustenta en los resultados de Yáñez-Ruiz *et al.* (2006), los cuales muestran que los protozoos pueden hacer mayor contribución al flujo de AGI desde el rumen (30-50% de los ácidos grasos que entran al duodeno son de origen protozoario) que al flujo de AGS (10-20%); Aunque se ha logrado un avance en el conocimiento sobre la función de los protozoos ciliados ruminales en la síntesis de CLA, utilizando novedosas alternativas metodológicas que han marcado diferencia con la investigación de hace algunas décadas, un solo estudio no permite teorizar sobre esta alternativa biológica; y consideramos que son necesarias más investigaciones que brinden evidencia para poder confirmar estas hipótesis (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2007).

El conocimiento del flujo de protozoos desde el rumen al duodeno, parece estar condicionado por el desarrollo de metodologías que permitan minimizar el porcentaje de error en la cuantificación de estos microorganismos o componentes de ellos. La mayoría de los estudios sobre el flujo de protozoos al duodeno, se han enfocado en el flujo de proteína microbiana, siendo considerados los protozoos un problema para el aporte de proteína desde el rumen al hospedero rumiante; muchos de estos artículos tienen varias décadas y varios de los datos aportados por estos estudios se han establecido en el tiempo. Estos autores refieren en sus estudios que parte de la aparente ineficiencia en el crecimiento microbiano, y por lo tanto de la disponibilidad de proteína microbiana al animal, puede ser atribuida al reciclaje de células microbianas en el rumen (Nolan y Leng, 1972). Weller y Pilgrim (1974); Minor *et al.* (1977); Harrison *et al.* (1979) afirman que la aparente retención de protozoos ruminales y el incremento del flujo de la proteína microbiana al duodeno en ovejas defaunadas (Linsay y Hogan, 1972), junto con observaciones significativamente cuantitativas de engolfamiento de bacterias por protozoos sugieren que una gran población de protozoos puede conducir a un bajo ritmo de síntesis de proteína microbiana o un bajo ritmo de flujo al intestino delgado o ambos (Leng, 1982).

En los primeros estudios Coleman *et al.* (1980), utilizaron protozoos marcados con colina  $^{14}\text{C}$  para estudiar su flujo fuera del rumen. Leng *et al.* (1981) usaron técnicas similares para estudiar el reciclaje de grandes protozoos en ganado alimentado con dietas basadas en caña de azúcar, obteniendo como resultado un flujo aparentemente muy lento. En los estudios presentados, sobre el reciclaje de pequeños protozoos (gran parte de *Entodinium*) en el rumen de ovejas ha sido estimado el uso de procedimientos con dilución de isótopos. Los protozoos marcados con  $^{14}\text{C}$  colina *in vitro* fueron introducidos dentro del rumen de ovejas y la radioactividad específica de protozoos en el rumen fue determinada a los dos y tres días. La pérdida de radioactividad por metano y el flujo dentro del abomaso en la digestión fueron también estimados. Aunque los aparentes ritmos de síntesis de proteína protozoaria fueron relativamente más altos que en los estudios previos por Leng *et al.* (1981), aproximadamente una

tercera parte de los protozoos marcados fluyeron al abomaso en la digestión. Aproximadamente el 65% de la radioactividad se perdió por el metano, probablemente como resultado de la fermentación de protozoos que murieron. Las conclusiones propuestas por los investigadores indican que la contribución de los protozoos a la proteína microbiana que pasa a abomaso es pequeña y una gran proporción de los protozoos aparentemente muere y son degradados en el rumen (Leng *et al.*, 1981).

Leng, (1982) estudiaron el ritmo de incorporación de  $^{14}\text{C}$  colina dentro de los protozoos; encontrando una incorporación rápida, pero, en contraste, a los resultados obtenidos con los grandes ciliados en bovinos con dietas basadas en caña de azúcar, la colina fue también rápidamente perdida desde el fluido ruminal. El metano del medio de incubación fue encontrado como radioactivo, indicando que este fue el principal producto final de la fermentación de la colina (Leng, 1982).

En otro ensayo del mismo estudio, los protozoos marcados con colina  $^{14}\text{C}$ , murieron, sometiéndolos a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Cuando estos fueron incubados con el fluido ruminal o inyectados dentro del rumen su radioactividad fue rápidamente perdida por metano. La radioactividad retenida en los protozoos vivos, cuando los protozoos muertos fueron incubados *in vitro* fue de aproximadamente el 10% de la radioactividad agregada, sugiriendo que los protozoos vivos rescatan colina desde los protozoos muertos, pero no retiene el  $^{14}\text{C}$  de restos de protozoos muertos. Esto se soporta en estudios *in vivo*, en los cuales una proporción pequeña de radioactividad desde protozoos muertos fue aparentemente reincorporada dentro de las poblaciones residentes (Leng, 1982). Sin embargo, si algunos de los componentes estructurales protozoarios como los ácidos grasos no son rápidamente degradables en el rumen y no son reciclados por otros protozoarios, deben pasar a duodeno. El hecho de que los resultados obtenidos por Yáñez-Ruiz en 2007 basados en técnicas moleculares no sean concordantes con los obtenidos por Leng (1982), permiten generar hipótesis acerca de la participación benéfica de los protozoos ciliados ruminales en el metabolismo

de ácidos grasos de importancia en la producción de rumiantes. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan confirmar esta hipótesis.

### Conclusiones

Aunque los protozoos participan en el proceso de biohidrogenación, lo hacen de forma mucho más eficiente incorporando los ácidos grasos de mayor valor nutritivo a su gran biomasa. El estudio del flujo de protozoos ciliados ruminales, no debe centrarse en que los protozoos ruminales pasen a intestino delgado en completa integridad, sería mejor considerar, el paso de sus componentes estructurales y su contenido microbiano en forma de nutrientes aprovechables por el rumiante. Las nuevas metodologías basadas en el estudio de los ácidos nucleicos han permitido avanzar en el esclarecimiento de la función de los protozoos en el metabolismo y aporte de lípidos al rumiante. Los protozoos ciliados ruminales usando alternativas biológicas como la isomerización, incorporación de CLA y VA en los fosfolípidos estructurales y su flujo a duodeno, se proponen como los microorganismos más benéficos para la síntesis de ácido linoleico conjugado de origen ruminal. Es necesario estudiar la función que cumple cada especie y la interacción entre las diferentes poblaciones en el metabolismo de ácidos grasos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la cofinanciación del proyecto 2008D31067-3724 y a la Alianza Universidad de Antioquia (Escuela de Microbiología) - Fundauniban - Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

### Referencias

Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *J Anim Sci* 1999; 77:1-15.

Bauman DE, Corl BA, Peterson DG. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. En: Sébédio J-L, Christie WW, Adlof R. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. United States of America: Eds AOCS Press; 2003. p.146-173.

Carriquiry M, Weber WJ, Baumgard LH, Crooker BA. *In vitro* biohydrogenation of four dietary fats. *Anim Feed Sci and Technol* 2008; 141:339-355.

Chalupa A, Kutches AJ. Biohydrogenation of linoleic 1-C14 acid by rumen protozoa. *J Anim Sci* 1968; 27:1502-1508.

Clauss M, Grum C, Hatt JM. Polyunsaturated fatty acid content in adipose tissue in foregut and hindgut fermenting mammalian herbivores: A literature survey. *Mamm Biol* 2009; 74:153-158.

Coleman GS, Dawson RM, Grime DW. The rate of passage of ciliate protozoa from the ovine rumen. *Proc Nutr Soc* 1980; 39:6A.

Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE. The role of delta 9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J Nutr Biochem* 2001; 12:622-630.

Dayani O, Ghorbani GR, Alikhani M, Rahmani HR, Mir PS. Effects of dietary whole cottonseed and crude protein level on rumen protozoal population and fermentation parameters. *Small Rumin Res* 2007; 69:36-45.

Dehority BA. *Rumen Microbiology*. Nottingham, (UK): Nottingham University Press; 2003.

Devillard E, McIntosh FM, Newbold CJ, Wallace RJ. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Br J Nutr* 2006; 96:697-704.

Dhiman TR, Nam S, Ure AL. Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid Content in Milk and Meat. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45:463-482.

Doreau M, Ferlay A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the lumen: a review. *Livest Prod Sci* 1995; 43:97-110.

Emmanuel B. On the origin of rumen protozoan fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1974; 337:404-413.

Erwin ES, Sterner W, Marco MJ. Effect of type of oil and site of administration on the fate of fatty acids in sheep. *J Am Oil Chem Soc* 1963; 40:344-347.

Firkins JL, Allen S, Oldick S, Pierre ST. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *J Dairy Sci* 1998; 81:3350-3369.

German JB, Dillard CJ. Composition, Structure and Absorption of Milk Lipids: A Source of Energy, Fat-Soluble Nutrients and Bioactive Molecules. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46:57-92.

Harfoot CG. Lipid metabolism in the rumen. *Progr Lipid Res* 1978; 17:21-54.

Harrison DG, Beever DE, Osbourn DF. The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. *Br J Nutr* 1979; 41:521-527.

Huws SA, Kim EJ, Kingston-Smith AH, Lee MR, Muetzel SM, Cookson AR, Newbold CJ, Wallace RJ, Scollan ND. Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; 69:461-471.

- Kumar S, Puniya AK, Puniya M, Dagar SS, Sirohi SK, Singh K, Griffith GW. Factor affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J. Microbiol Biotechnol* 2009; 25:1557-1566.
- Leng RA, Gill M, Kempton TJ, Rowe JB, Nolan JV, Stachiw SJ, Preston TR. Kinetics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle given sugarcane diets. *Br J Nutr* 1981; 46:371-384.
- Leng RA. Dynamics of protozoa in the rumen of sheep. *Br J Nutr* 1982; 48:399-415.
- Lindsay JR, Hogan JP. Digestion of two legumes and rumen bacterial growth in defaunated sheep *Aust J agric Res* 1972; 23:321-330.
- Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y, Doreau M. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Anim Feed Sci Technol* 2005; 119:203-225.
- Marwaha SR, Kochar AS, Sukhija PS, Bhatia IS. Fatty acid metabolism in rumen microorganisms as influenced by different types of dietary lipids. *Indian J Dairy Sci* 1972; 25:46-51.
- Minor S, MacLeod NA, Preston TR, Leng RA. Studies on digestion in different sections of the intestinal tract of bulls fed sugar cane/urea with different supplements *Trop Anim Prod* 1977; 2:163-174.
- Nam IS, Garnsworthy PC. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J Appl Microbiol* 2006; 103:551-556.
- Nolan JV, Leng RA. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. *Br J Nutr* 1972; 27:177-194.
- Or-Rashid MM, Odongo NE, McBride BW. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *J Anim Sci* 2007; 85:1228-1234.
- Or-Rashid MM, Alzahal O, McBride BW. Studies on the production of conjugated linoleic acid from linoleic and vaccenic acids by mixed rumen protozoa. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 81:533-541.
- Or-Rashid MM, Wright TC, McBride BW. Microbial fatty acid conversion within the rumen and the subsequent utilization of these fatty acids to improve the healthfulness of ruminant food products. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 84:1033-1043.
- Piperova LS, Sampugna J, Teter BB, Kalscheur KF, Yurawecz MP, Ku Y, Morehouse KM, Erdman RA. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J Nutr* 2002; 132:1235-1241.
- Polan CE, McNeill JJ, Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *J Bact* 1964; 88:1056-1064.
- Pulina G, Nudda A, Battacone G, Cannas A. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Anim Feed Sci Technol* 2006; 131:255-291.
- Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 2008; 69:299-322.
- Schmid A, Collomb M, Sieber R, Bee G. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Sci* 2006; 73:29-41.
- Silva S, Leme PR, Putrino SM, Cravo AS, Valinote AC, Machado JC, Duarte DP. Fatty acid composition of intramuscular fat from Nelore steers fed dry or high moisture corn and calcium salts of fatty acids. *Livest Sci* 2009; 122:290-295.
- Van de Vossenberg JL, Joblin KN. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37:424-428.
- Váradyová Z, Kisidayová S, Siroka P, Jalc D. Comparison of fatty acid composition of bacterial and protozoal fractions in rumen fluid of sheep fed diet supplemented with sunflower, rapeseed and linseed oils. *Anim Feed Sci Technol* 2008; 144:44-54.
- Weller RA, Pilgrim AF. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Brit J Nutr* 1974; 32:341-351.
- Williams AG, Coleman GS. *The Rumen Protozoa*. New York: Springer-Verlag; 1992.
- Wu Z, Palmquist DL. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. *J Dairy Sci* 1991; 74:3035-3046.
- Yáñez-Ruiz DR, Scollan ND, Merry RJ, Newbold CJ. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *Br J Nutr* 2006; 96:861-869.
- Yáñez-Ruiz DR, Williams S, Newbold CJ. The effect of absence of protozoa on rumen biohydrogenation and the fatty acid composition of lamb muscle. *Br J Nutr* 2007; 97:938-948.