

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE tRFLP PARA EVALUAR LAS VARIACIONES EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN ASOCIADAS A LA INCLUSIÓN DE ACEITES DE GIRASOL Y PESCADO EN LA DIETA DE OVEJAS

Belenguer¹, A., Toral¹, P.G., Frutos¹, P., Rabanal², B. y Hervás¹, G.

¹ Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León.
A.Belenguer@eae.csic.es ² Laboratorio de Técnicas Instrumentales, ULE, Campus de Vegazana, 24071 León.

INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (CLA) ha suscitado un enorme interés en la comunidad científica debido a los numerosos efectos beneficiosos que puede presentar para la salud del consumidor (Williams, 2000). Los productos derivados de los rumiantes constituyen la principal fuente de este tipo de ácidos grasos (AG) en la dieta humana, por lo que un incremento de su concentración en la leche o carne mejoraría su calidad nutricional.

Se ha demostrado que la inclusión en la dieta de suplementos lipídicos ricos en ácido linoleico, como el aceite de girasol, y en AG poliinsaturados de cadena larga, como el aceite de pescado, produce un incremento de la concentración de CLA en la leche, tanto en ganado vacuno (Palmquist y Grinarii, 2006) como en ovino (Toral et al., 2009). Sin embargo, los AG insaturados son factores antimicrobianos que pueden inhibir el crecimiento de las comunidades ruminales. Así, algunos microorganismos son capaces de llevar a cabo una biohidrogenación (BH) de los AG insaturados como mecanismo de protección, dando lugar a una acumulación en el rumen de determinados metabolitos intermedios, como el CLA o el ácido vacénico (precursor del CLA). Por tanto, la composición microbiana ruminal es un factor clave para incrementar la concentración de AG beneficiosos en los productos derivados de los rumiantes. Diversos estudios han tratado de identificar los principales microorganismos implicados en la BH (Jenkins et al., 2008). Sin embargo, todavía existe un gran desconocimiento sobre éstos y sobre el efecto que la suplementación de la dieta con diferentes tipos de lípidos puede ejercer sobre ellos.

Actualmente, las nuevas técnicas de biología molecular basadas en el análisis del gen del ARN ribosómico 16S están permitiendo avanzar en el conocimiento del ecosistema microbiano ruminal. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar en ovejas el efecto de la inclusión en la dieta de aceite de girasol y aceite de pescado sobre las comunidades microbianas del rumen mediante la utilización de una técnica molecular cualitativa, el polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (tRFLP).

MATERIAL Y MÉTODOS

En este experimento, se utilizaron 4 ovejas adultas de raza merina, provistas de cánula ruminal y alojadas individualmente, que fueron alimentadas dos veces al día con una dieta completa (relación forraje:concentrado 35:65; 37 g MS/kg PV^{0.75}). Tras un periodo de adaptación de 10 días, los animales recibieron la misma dieta suplementada con un 2% de aceite de girasol y un 1% de aceite de pescado durante un periodo de 12 días.

Se tomaron muestras del contenido ruminal tras 0 (día 1), 3 (día 4) y 11 (día 12) días de la administración de la dieta suplementada con lípidos, a través de la cánula ruminal, que fueron congeladas inmediatamente a -80°C y posteriormente liofilizadas.

El ADN del contenido ruminal liofilizado se extrajo siguiendo el método descrito por Yu y Morrison (2004), con la modificación de una mayor temperatura (95°C) en la lisis celular. Para el análisis de las muestras mediante tRFLP se utilizaron cebadores específicos para amplificar el gen del ARN ribosómico 16S bacteriano (Hongoh et al., 2003), estando uno de ellos marcado con fluorescencia (FAM). El producto de la PCR fue purificado, cuantificado y a continuación digerido (95 ng) utilizando la enzima de restricción HhaI (10 U; 37°C, 12 h). Los productos de dicha digestión fueron purificados y finalmente los fragmentos de restricción se analizaron en un secuenciador capilar automático Megabace 500 (Amersham Biosciences, Reino Unido), utilizando 22 fragmentos de entre 50 y 550 pares de bases (pb) como patrones.

El perfil de picos se analizó mediante el programa *GeneMarker* (Softgenetics, EEUU) y tras estandarizar los datos se procedió a la construcción de un dendograma con el programa informático *Community Analysis Package 4* (Pisces Conservation Ltd, Reino Unido). El análisis estadístico del número de fragmentos detectados y de los porcentajes del área de ciertos fragmentos sobre el área total de los picos obtenidos se realizó mediante análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.1. (SAS Institute Inc., EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La suplementación dietética con aceites de girasol y de pescado provocó cambios en los perfiles microbianos de los animales, observándose un agrupamiento de las muestras en función del tipo de dieta. En el dendograma que se presenta en la Figura 1 se observa que el ADN de las muestras tomadas tras 11 días de administración de la dieta suplementada (día 12) se situó en todos los animales de forma separada a las muestras iniciales (día 1), indicando la existencia de un efecto esperable de la adición de lípidos sobre la microbiota ruminal, lo que coincide con un estudio previo en ganado vacuno en el que se utilizaron porcentajes similares de inclusión lipídica (Kim et al., 2008). Tras el análisis de las muestras del día 4 (para evaluar una posible respuesta rápida), se observó que en la mitad de los animales (2 y 4) éstas se localizaron en el mismo grupo que las tomadas tras 11 días, a diferencia de lo que ocurrió con las otras dos ovejas, en las que estas muestras se agruparon con las iniciales. Estos resultados podrían indicar que el tiempo necesario para que se produzca la adaptación del ecosistema microbiano del rumen a la suplementación con aceites de girasol y pescado posiblemente dependa de la composición microbiana inicial de cada individuo.

El número de fragmentos obtenidos mediante tRFLP se puede considerar como una medida de la diversidad bacteriana, no observándose en nuestro estudio ningún efecto de la suplementación lipídica sobre el número de fragmentos ($P > 0,10$), a diferencia del descenso encontrado en el número de bandas con la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (técnica molecular cualitativa) con dietas suplementadas con un 3% de aceite de pescado en ganado vacuno (Kim et al., 2008).

Mediante herramientas disponibles en la red, como la TAP-tRFLP del programa *Ribosomal Database Project II*, es posible hacer una asignación teórica de especies o grupos bacterianos a los fragmentos detectados en función de su longitud, utilizando las secuencias depositadas en las bases de datos, aunque un mismo fragmento podría corresponder a varias especies distintas, por lo que esta inferencia debe considerarse con cautela. En nuestros resultados se observó que los fragmentos mayoritarios eran aquellos que presentaban una longitud de 65 (7–20% del área total de los picos) y 100 (22–42%) pb, que corresponderían a especies bacterianas pertenecientes a las divisiones *Firmicutes* (65 pb) y *Bacteroidetes* (100 pb), que son normalmente los grupos mayoritarios en el rumen (Edwards et al., 2004). Además, existió un efecto de la suplementación lipídica sobre el porcentaje de determinados fragmentos, como por ejemplo, un incremento de aquellos que podrían ser producidos por especies no cultivadas pertenecientes al cluster IX de los Clostridiales (*Mitsuokella*, *Selenomonas*; 390 pb), algunas de las cuales son capaces de metabolizar los AG insaturados (Maia et al., 2007). También se detectaron variaciones en ambos sentidos, aumentando (204 pb) o disminuyendo (181 pb), en fragmentos que podrían corresponder a bacterias pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae*, donde se incluyen diversos géneros conocidos (*Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*) y especies no cultivadas que también se relacionan con la BH ruminal de los AG insaturados (Boeckeaert et al., 2008; Jenkins et al., 2008).

Estos resultados sugieren que la suplementación dietética con aceites de girasol y pescado provoca alteraciones en la abundancia de determinadas bacterias implicadas en la biohidrogenación, que posiblemente sean las responsables de las variaciones en el perfil de AG (tales como el incremento de CLA o la reducción de ácido esteárico) encontradas en la leche tras la adición a la dieta de estas fuentes lipídicas (Torral et al., 2009).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boeckeaert C., Vlaeminck B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J. & Boon, N. 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6923-6930. ● Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J. & Wallace,

R. J. 2004. *Anton. van Leeuw.* 86: 263-281. • Hongoh, Y. H., Yuzawa, M., Okhuma, M. & Kudo, T. 2003. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 299-304. • Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J. & Mosley, E. E. 2008. *J. Anim. Sci.* 86: 397-412. • Kim, E. J., Huws, S. A., Lee, M. R. F., Wood, J. D., Muetzel, S. M., Wallace, R. J. & Scollan, N. D. 2008. *J. Nutr.* 138: 889-896. • Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L. & Wallace, R. J. 2007. *Anton. van Leeuw.* 91: 303-314. • Palmquist, D. L. & Grinarii, J. M. 2006. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131: 358-369. • Toral, P. G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., de la Fuente, M. A., Juárez, M. & Hervás, G. 2009. *ITEA*, Vol. Extra 30 (en prensa). • Williams, C. M. 2000. *Ann. Zootech.* 49: 165-180. • Yu, Z. & Morrison, M. 2004. *BioTechniques* 36: 808-812.

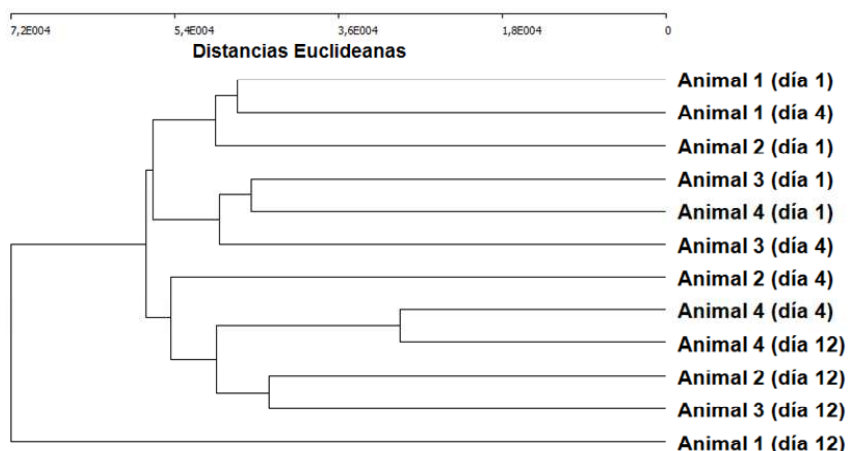


Figura 1. Dendrograma obtenido a partir del análisis mediante tRFLP del ADN extraído de las muestras de contenido ruminal obtenidas tras 0, 3 y 11 días (días 1, 4 y 12) de la ingestión de la dieta suplementada con aceite de girasol y aceite de pescado.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2008-04805-C02-02) y por la Junta de Castilla y León (Proyecto CSI01B08). A. Belenguer y P.G. Toral han disfrutado respectivamente de un contrato postdoctoral y una beca predoctoral del programa I3P del CSIC.

UTILIZATION OF THE tRFLP TECHNIQUE TO STUDY THE CHANGES IN RUMEN BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE DIETARY ADDITION OF SUNFLOWER AND FISH OILS IN SHEEP

ABSTRACT. Four adult cannulated Merino ewes were fed a mixed diet (35:65 forage:concentrate) for 10 days. Afterwards they received the same diet supplemented with sunflower (2%) and fish (1%) oils in order to study the effect of the lipid supplementation on the rumen microbial communities. Rumen samples were taken after 0 (day 1), 3 (day 4) and 11 (day 12) days of the lipid supplementation. DNA was extracted and analysed by tRFLP (qualitative molecular technique). An effect of the experimental treatment was observed, being samples obtained on day 12 clustered separately from initial samples (day 1). On day 4, only two animals showed a similar microbial profile than on day 12, suggesting that the time necessary for the rumen ecosystem to be adapted to the lipid supplementation may depend on the individual microbial composition. Major fragments detected by tRFLP match the abundant bacterial phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, and variations in other fragments which may correspond to bacteria involved in rumen biohydrogenation (such as those belonging to the Clostridial cluster IX or the family *Lachnospiraceae*) were detected. These bacteria might be responsible for variations in the milk fatty acid profile in lactating ewes.

Keywords: lipid supplementation, molecular technique, rumen bacteria, ewe.