

EFFECTO DE LA RELACIÓN FORRAJE:CONCENTRADO Y DEL TIPO DE FORRAJE DE LA DIETA SOBRE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN DE OVEJAS

Ramos, S., Ranilla, M.J., Martínez, M.E., Saro, C., Tejido, M.L. y Carro, M.D.
Dpto. Producción Animal. Universidad de León. 24071 León
mjrang@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Es conocido desde hace tiempo que el tipo de dieta que reciben los animales rumiantes afecta al número y tipo de bacterias que se desarrollan en el rumen (Bryant y Burkey, 1953; Latham et al., 1971). La relación forraje:concentrado de la dieta es uno de los factores que más influye sobre las condiciones del ecosistema ruminal y, por tanto, sobre la composición de las comunidades bacterianas presentes en el rumen. Los estudios tradicionales se basaban en el recuento de determinados grupos de bacterias, pero apenas aportan información sobre la estructura de las comunidades bacterianas en términos de diversidad, ni sobre cómo afecta la composición de la dieta a dicha estructura. En este trabajo se estudió el efecto de la relación forraje:concentrado y del tipo de forraje de la dieta sobre el perfil de las comunidades bacterianas de la digesta ruminal sólida de ovejas adultas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó utilizando 6 ovejas Merinas canuladas en el rumen ($59,0 \pm 4,46$ kg). Se formularon 4 dietas experimentales que consistieron en heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado en proporción 70:30 (AL70 y GR70) y 30:70 (AL30 y GR30). Las dietas fueron administradas a los animales a nivel restringido (56 g MS/kg PV^{0,75}) en dos tomas iguales diarias (8:00 y 20:00 h). El diseño experimental fue un cuadrado Latino 4 x 4 parcialmente replicado, con 4 dietas, 4 períodos y 6 animales. Tras 15 días de adaptación a la dieta, se tomaron muestras representativas del contenido ruminal (600 g de digesta total), a través de la cánula, 4 horas después de la administración de alimento. El contenido líquido se eliminó filtrando la digesta a través de 4 capas de gasa, y el residuo sólido se lavó con 300 mL de solución salina a 38°C para eliminar las bacterias asociadas a la fase líquida de la digesta. Una vez filtrada de nuevo, la digesta sólida se congeló inmediatamente y después se liofilizó para su posterior análisis.

Los perfiles de las comunidades bacterianas de las digestas se estudiaron mediante ARISA (Análisis Automatizado de la Región Espaciadora Intergénica Ribosomal). La extracción de ADN de las muestras se realizó siguiendo la metodología propuesta por Yu y Morrison (2004). El ADN extraído se amplificó utilizando los cebadores 16S-1392F y 23S-125R, que amplifican la región ITS1 en el operón rRNA (Danovaro et al., 2006). El cebador 16S-1392F está marcado con 6-FAN. El amplicón se purificó y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Para el ARISA se utilizaron 5 ng de ADN y 0,5 μ L de un estándar interno de tamaño (LIZ1200; Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) en formamida desionizada y desnaturalizados a 94 °C durante 2 minutos, antes de enfriarlos en hielo. La separación de los fragmentos ARISA se realizó en un ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos), utilizando capilares de 40 cm por 50 μ m y polímero POP-4 (Perkin Elmer). Los fragmentos obtenidos se analizaron con el software GeneMarker versión 1.80 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, Estados Unidos). El dendrograma se construyó utilizando el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) a partir del coeficiente de correlación de Pearson. La similitud entre los perfiles ARISA se estimó mediante análisis de componentes principales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron un total de 195 filotipos, de los que 11 estuvieron presentes únicamente en las digestas de los animales que recibieron heno de alfalfa y 10 en las de los que recibieron heno de gramíneas. Se trata, por tanto, de comunidades bacterianas relativamente complejas. El número de filotipos detectado (Tabla 1) no fue diferente ($P>0,05$) entre dietas, ni tampoco lo fue ($P>0,50$) la diversidad de las comunidades bacterianas, tal y como lo refleja el índice de Shannon.

Tabla 1. Índice de Shannon y número de picos del ARISA en la digesta ruminal sólida de ovejas que recibían dietas con heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado en proporciones de 70:30 (70) o 30:70 (30).

	Dieta				ESM ²	Efecto ¹ (P =)		
	AL70	AL30	GR70	GR30		F:C	FOR	F:C x FOR
Índice de de Shannon	4,21	4,21	3,93	3,98	0,192	0,92	0,31	0,77
Número de filotipos	69,0	70,2	58,2	56,3	8,90	0,94	0,26	0,99

¹ F:C: relación forraje:concentrado; FOR: tipo de forraje.

² error estándar de la media.

La figura 1 representa los dendrogramas de los análisis cluster de las comunidades bacterianas de las digestas AL y GR. La mitad de los animales que recibieron la dieta AL70 se agruparon en un cluster, mientras que para la dieta AL30 no se observó ninguna tendencia al agrupamiento clara. El animal 5, por su parte, formó un grupo aparte del resto de digestas. Para la dieta GR, las digestas se agruparon en función de la cantidad de forraje (GR30 y GR70), aunque se observa un animal de cada dieta que se sitúa en un cluster aparte. Aunque en general, el porcentaje de forraje en la ración parece un factor importante que afecta a la composición de las comunidades microbianas presente en el rumen, es más manifiesto para las dietas a base de heno de gramíneas que en las de heno de alfalfa, y además, en algunos casos, el individuo parece ser el factor que más influye en dicha composición.

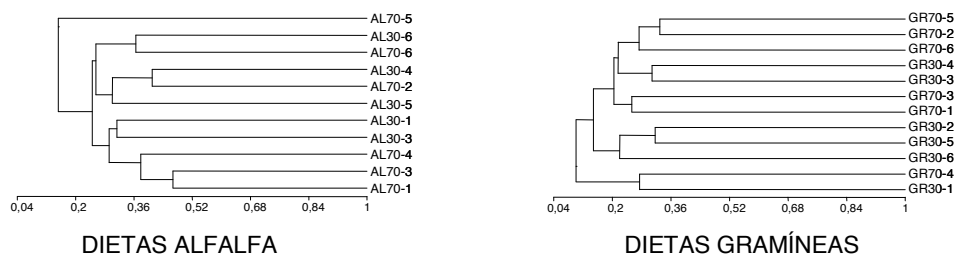


Figura 1. Dendrogramas de los ARISA de las digestas del rumen de ovejas que recibieron dietas con heno de alfalfa o heno de gramíneas y concentrado (ver texto para la descripción de las dietas). Los números del 1 al 6 indican diferentes ovejas.

El análisis de componentes principales muestra las mismas diferencias en composición de las comunidades bacterianas entre dietas apuntada anteriormente (Figura 2). El eje 1 explicó el 9,15% de la varianza, y el eje 2 el 7,73%, lo que da una idea de la complejidad de factores implicados en la estructura de las comunidades bacterianas. Con la excepción del animal 5, las comunidades bacterianas del rumen de los animales que recibieron alfalfa en la dieta se sitúan en la parte izquierda del eje 2, mientras que las de los que recibieron heno de gramíneas se sitúan en la zona central. Dentro cada dieta, las digestas tienden a agruparse en relación a la proporción forraje:concentrado.

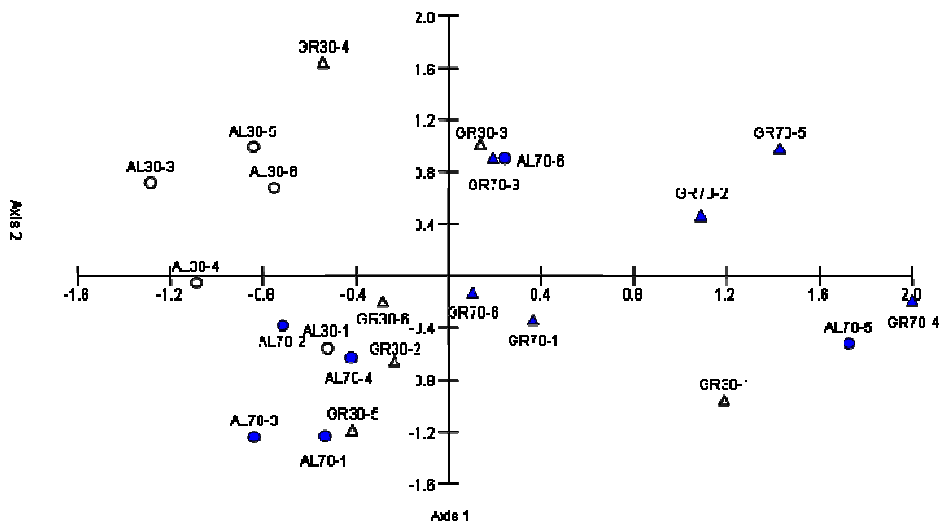


Figura 2. Análisis de componentes principales generado a partir de los perfiles ARISA de las comunidades bacterianas del rumen de ovejas que recibieron dietas con heno de alfalfa o heno de gramíneas y concentrado (ver texto para la descripción de las dietas).

Estos resultados indican que el factor que más influyó en la estructura de las comunidades bacterianas de la digesta sólida del rumen de ovejas alimentadas con cuatro dietas diferentes fue el tipo de forraje (heno de alfalfa y heno de gramíneas), y dentro de cada tipo de forraje, la proporción del mismo. No se encontraron diferencias significativas entre dietas en el número de especies bacterianas presentes ni en la diversidad de las comunidades. Cabe señalar que existieron grandes variaciones individuales en el perfil de dichas comunidades bacterianas, y que el factor “animal” predominó sobre el resto en algunos casos concretos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bryant, M. P. & Burkey, L. A. 1953. *J. Dairy Sci.* 36:218-224.
- Danovaro, R., Luna, G.M., Dell'Anno A. & Pietrangeli, B. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.
- Latham M. J., Sharpe, E. M. & Sutton, J. D. 1971. *J. Appl. Bacteriol.* 34:425-434.
- Yu, Z., & Morrison, M. 2004. *Bio. Techniques* 36: 808-812.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL-2004-04755-CO2-01/GAN financiado por el M.E.C. S. Ramos disfruta de una beca F.P.I. del M.E.C. (BES-2005-6842).

EFFECTS OF FORAGE: CONCENTRATE RATIO AND FORAGE TYPE ON THE BACTERIAL COMMUNITIES IN RUSITEC FERMENTERS.

ABSTRACT: The aim of this work was to analyse the effects of forage:concentrate ratio (30:70 and 70:30) and forage type (alfalfa and grass hay) on the bacterial communities in sheep ruminal digesta. In order to study microbial diversity, DNA was isolated from samples of solid digesta and the ITS1 region of rDNA operon was amplified by PCR and analyzed by ARISA. Both the type of forage and forage:concentrate ratio affected the community profiles established in the rumen of the animals, and a high animal variability was detected in terms of rumen microbial structure.

Keywords: rumen bacterial communities, ARISA, sheep