

ESTUDIO MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN DE CAPRINO Y DE FERMENTADORES DE FLUJO SIMPLE CONTINUO.

Cantalapiedra-Hijar, G¹., Yáñez-Ruiz, D.R.¹, Newbold, C.J.², Molina-Alcaide, E¹.

¹Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España. gonzalo.cantalapiedra@eez.csic.es.

²Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences (IBERS), Aberystwyth University, Llanbadarn Campus, SY23 3 AL, Aberystwyth, Reino Unido.

INTRODUCCIÓN

El uso de fermentadores de flujo continuo (FFC) para el estudio in vitro de la fermentación ruminal se ha extendido en las últimas décadas. Para considerarse una herramienta de simulación adecuada, los FFC deberían, entre otros aspectos, mantener las poblaciones microbianas similares a las del rumen en cuanto a cantidad y diversidad (Warner, 1956). Sin embargo, a pesar del gran interés que despiertan estas técnicas, muy pocos estudios (Slyter and Putnam, 1967; Ziemmer et al., 2000) se han centrado en la capacidad de los FFC para mantener una población microbiana representativa del rumen como parte de la validación. Este trabajo pretende evaluar, mediante técnicas moleculares, la capacidad de los FFC para mantener la biomasa y estructura bacteriana de las comunidades presentes en el rumen de caprino. Además, con objeto de conocer la representatividad de las fracciones bacterianas utilizadas comúnmente como referencia en la estimación del flujo de N al duodeno, la evaluación de la estructura microbiana se extiende también a bacterias asociadas a sólido (BAS) y líquido (BAL) aisladas de los sistemas in vivo e in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro cabras de raza granadina ($46,3 \pm 2,96$ kg PV) canuladas en rumen y cuatro fermentadores de flujo simple continuo (FFSC, Miettinen y Setälä, 1989) reciben cuatro dietas constituidas por un forraje (heno de gramíneas o de alfalfa) y un concentrado en alta (70%) o baja (30%) proporción. Los animales se adaptan a las dietas durante 17 días, tras los cuales se toma una muestra de 50 mL del contenido del rumen. El día 22 se obtiene aproximadamente 1L de contenido ruminal de cada animal para aislar fracciones bacterianas (Martín-Orué et al., 1998) asociadas a líquido (BAL) y sólido (BAS). El sistema in vitro, fue inoculado con líquido ruminal de las cabras que recibieron las mismas dietas experimentales durante 21 días. Tras un período de adaptación de 8 días a las condiciones in vitro, se toman alícuotas de 1,5 ml del contenido del fermentador. El día 12 se recoge el contenido total del fermentador (1000 mL) para aislar BAL y BAS de igual manera que in vivo. Tras la congelación (-20° C) y liofilización de las muestras, se extrae su ADN mediante una combinación de métodos mecánicos (Minibeatbeater™) y químicos (QUIAGEN QIAmp DNA stool mini kits). Para la caracterización bacteriana mediante la técnica 'terminal restriction fragment length polymorphysm' (T-RFLP), se amplifica el ADN extraído con primers universales de bacterias que utilizan como diana la fracción 16S del ADNr, uno de ellos marcado con cianina (Hongoh et al., 2005) utilizándose un termociclador programado a 25 ciclos. El producto de la PCR purificado se digiere por separado con 4 enzimas de restricción (*HaellI*, *HhaI*, *MspI* y *RsaI*). Los extremos terminales marcados de los fragmentos resultantes de la digestión se detectan en columna capilar mediante fluorescencia y se calcula el tamaño de estos por comparación con el tiempo de retención electroforético de un estándar de ADN incluido en la muestra. El patrón de picos resultante se analiza mediante el programa CAP 4 (Community Analysis Package V.4.1.3 ©Pisces Conservation) utilizando como algoritmo el método estadístico de ordenación MDS. Además, a partir de la abundancia relativa de cada fragmento en el patrón de picos se obtiene el índice de diversidad de Shannon (Shannon y Weaver, 1963). Para la cuantificación de bacterias totales mediante q-PCR se utilizan primers universales de bacterias (McSweeney and Denman, 2007) y un termociclador con detector de fluorescencia (DNA Engine Opticon® System) que efectúa una amplificación de 40 ciclos. Los estándares se obtienen mediante la

extracción de ADN de una mezcla de cultivos puros (incubación 24 h) de 17 cepas de bacterias ruminales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diversidad y abundancia de bacterias (Tabla 1) observados en el contenido del rumen de cabras y de fermentadores de flujo simple continuo (FFSC) es similar ($P \geq 0.14$) en el presente estudio, lo cual es suficiente según algunos autores (Strobel et al., 2008) para concluir que los FFSC son un modelo adecuado para mantener las comunidades microbianas del rumen. Sin embargo, ya que similar diversidad bacteriana no implica necesariamente similitud en la estructura, la validación de los FFSC debería profundizar en la composición bacteriana. En este sentido, el análisis multidimensional escalar (MDS) llevado a cabo sobre los resultados obtenidos mediante t-RFLP de muestras in vivo e in vitro (Figura 1) muestra una clara separación espacial de las mismas en función de su origen, lo que sugiere una estructura diferente de las comunidades bacterianas en ambos sistemas. Esta observación está en desacuerdo con los resultados de comparaciones previas FFC vs. rumen utilizando técnicas clásicas de cultivo (Slyter and Putnam, 1967), aunque el número de especies identificadas en dicho estudio (17 especies) limita la comparación con los resultados del presente trabajo (alrededor de 180 alelos diferentes por enzima de restricción en toda la población). En otra comparación FFC vs. rumen (Ziemmer et al., 2000) utilizando sondas de ADN ribosómico, se observaron grandes diferencias entre ambos sistemas dentro del grupo de bacterias gram positivas (las cuales constituyen aproximadamente la mitad del total en ese estudio). Numerosos factores pueden estar implicados en las diferencias encontradas entre rumen de caprino y FFSC: diferentes tasas de dilución de los FFSC con respecto a la que ocurre en animales, una falta de representatividad de la estructura bacteriana en el inóculo de partida (filtrado de contenido ruminal) y una ausencia de protozoos en los FFSC (Ozutsumi et al., 2005). En cuanto a las posibles diferencias entre BAS y BAL del rumen y de FFSC, el MDS muestra una estructura de la comunidad bacteriana distinta entre dichas fracciones y el contenido tanto en rumen como en FFSC. In vitro, además se observa que las BAL y BAS se agrupan en función del nivel de concentrado de las dietas, lo que podría estar influido por el menor pH ($P < 0.05$) alcanzado en los FFSC alimentados con dietas altas en concentrado. Además este pH más bajo podría explicar igualmente la menor ($P < 0.05$) diversidad (índice Shannon) encontrada en los FFSC con dietas altas en concentrado. Las posibles causas que expliquen las diferencias en ambos tipos de muestras (contenido vs. BAL-BAS) con mismo origen (animal-fermentador) pueden deberse a una pérdida de algunos grupos bacterianos durante el aislamiento y a la representatividad de las muestras recogidas del contenido del rumen y de FFSC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulhaleamsai, S., Ohkuma, M., Vongkaluang, C., Noparatnaraporn, N., Kudo, T. 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6590-6599.
- Martín-Orúe, SM., Balcells, J., Zakraoui, F., Castrillo, C. 1998. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 269-282.
- McSweeney, C.S., Denman, S.E. 2007. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1757-1765.
- Miettinen, H., Setälä, J. 1989. *J. Agric. Sci. Finland.* 61: 463-473.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H. 2005. *Current Microbiol.* 52: 158-162.
- Shannon, C.E., Weaver, W. 1963. University of Illinois Press, Urbana, USA.
- Slyter, L.L., Putnam, P.A. 1967. *J. Anim. Sci.* 26: 1421-1427.
- Strobel, E., Seeling, K., Tebbe, C.C. 2008. *Environ. Microbiol.* 10: 483-496.
- Warner, A.C.I. 1956. *J. Gen. Microbiol.* 14: 733-748.
- Ziemer, C.J., Sharp, R., Stern, M.D., Cotta, A., Whitehead, T.R., Stahl, D.A. 2000. *Environ. Microbiol.* 2: 632-643.

Tabla 1. Efecto del origen (rumen-fermentador) y del nivel del concentrado (bajo-alto) en la dieta sobre los valores medios de pH, índice de Shannon y bacterias totales (Bt).

Parámetros ¹	Rumen		Fermentador		EEM ⁴	O ⁵	Valor P	
	CB ²	CA ³	CB	CA			C ⁶	Ox C
pH	6.33 ^c	6.22 ^c	5.97 ^b	5.79 ^a	0.034	<0.001	0.15	0.94
Índice Shannon	3,38 ^b	3,40 ^b	3,44 ^b	3,13 ^a	0.030	0.14	0.02	0.02
Bt, ng ADN/ μ L extracto	78,8	93,8	76,0	76,5	9.6	0.61	0.69	0.71

^{a-c} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

¹ Observaciones, $n = 4$; ² CB = nivel de concentrado bajo; ³ CA = nivel de concentrado alto; ⁴ EEM = error estándar de la media; ⁵ O = efecto del origen; ⁶ C = efecto del nivel de concentrado.

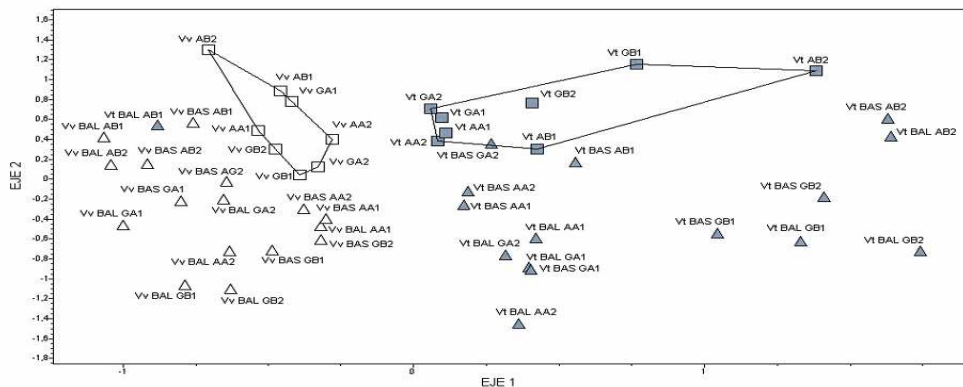


Figura 1. Análisis multidimensional escalar (MDS) del patrón de picos obtenidos mediante T-RFLP de muestras procedentes de bacterias asociadas a la fase líquida (BAL) y a la fase sólida (BAS) in vivo (Vv) e in vitro (Vt) y de contenido del rumen y fermentadores de flujo simple continuo alimentados con las mismas dietas experimentales (GA = 70% heno de gramíneas + 30% concentrado; GB = 30% heno de gramíneas + 70% concentrado; AA = 70% heno de alfalfa + 30% concentrado; AB = 30% heno de alfalfa + 70% concentrado). □ = contenido del rumen; △ = bacterias aisladas in vivo; ■ = contenido de los fermentadores; ▲ = bacterias aisladas in vitro.

MOLECULAR STUDY OF BACTERIAL COMMUNITIES IN THE RUMEN OF GOATS AND IN SINGLE-FLOW CONTINUOUS-CULTURE FERMENTERS.

ABSTRACT: Four rumen cannulated goats and 4 single-flow continuous culture fermenters (SFCCF) fed the same diets were used to characterize and quantify by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and real time PCR (qPCR), respectively, bacterial communities present in the contents as well as in the liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria pellets. Shannon index and total bacteria concentration were similar ($P \geq 0.14$) in rumen and SFCCF samples. However the bacterial community structure elicited by multidimensional scaling (MDS) analysis showed differences between both types of samples, probably caused by different conditions in the in vitro system compared to in vivo: dilution rate and the lack of protozoa population. Differences between samples from the same system (contents vs. LAB-SAB) were also evidenced by MDS, which might be a result of losses through the isolation process or different representation achieved by the sampling procedures. In vitro, differences in LAB or SAB between fermenters fed high or low concentrate diets were also observed, and this may be caused by lower ($P < 0.05$) pH reached in SFCCF fed high in comparison to low concentrate diets.

Keywords: rumen, single-flow continuous-culture fermenters, q-PCR, T-RFLP