

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DESARROLLADAS EN UN SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* NO RENOVADO CON DIETAS QUE INCLUYEN SUBPRODUCTOS DE INVERNADERO COMO SUSTITUTIVO DE LA CEBADA

Soto, E. C., Molina-Alcaide, E., Khelil, H., Yáñez-Ruiz, D. R.

Instituto en formación de Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España. e-mail: eva.soto@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas *in vitro*, que simulan la fermentación ruminal, permite llevar a cabo estudios de nutrición, evitando el uso de animales intervenidos quirúrgicamente, y disminuir los costes y variabilidad asociados a los estudios *in vivo*. En concreto, la técnica de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR) permite la evaluación rápida y sencilla del efecto de la inclusión de distintos ingredientes o aditivos en la dieta sobre la fermentación ruminal (Theodorou et al., 1994). Un sistema de simulación ideal ha de permitir el desarrollo de comunidades microbianas similares, en cuanto a número y estructura, a las que existen en el rumen. Este aspecto se desconoce totalmente en relación a los sistemas CNRMR. Este trabajo se enmarca en un proyecto cuyo objetivo es evaluar la inclusión de residuos de invernadero en dietas para rumiantes, como sustitutivos de la cebada, uno de los ingredientes mayoritarios en los concentrados del ganado. Puesto que estos subproductos provienen de una agricultura muy intensiva, sometida a tratamientos químicos, es necesario evaluar *in vitro* el efecto de su inclusión sobre los microorganismos del rumen.

El objetivo de este trabajo fue estudiar, en CNRMR inoculados con líquido ruminal de caprino, la evolución de la concentración de diferentes grupos microbianos en relación al inóculo ruminal de partida empleando como sustrato dietas estándar en las que la cebada fue sustituida por cantidades crecientes de tomate y/o pepino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó una dieta control (CO), a base de paja de cereal (30%), cebada (25%), heno de alfalfa (22%), torta de girasol (15%) y harina de salvado de trigo (5%), y tres tipos de dietas experimentales en las que la cebada se reemplazó progresivamente (en un 20%, 60% y 100% para los niveles 1, 2 y 3 de subproducto, respectivamente) con cantidades crecientes de tomate (TO1, TO2 y TO3), pepino (PE1, PE2 y PE3) o una mezcla (1:1) de tomate y pepino (TP1, TP2 y TP3). Adicionalmente, se empleó heno de alfalfa como dieta estándar (HA) y un blanco (BL). Todas las dietas incluían un 1% de mezcla minero-vitáminica. Las dietas se incubaron (500 mg) en frascos de vidrio de 120 ml sellados, a los que se adicionaron 50 ml de un medio de cultivo compuesto por líquido ruminal filtrado y una disolución tampón (Goering y van Soest, 1970) en una relación 1:4. Los frascos se dividieron en 2 lotes, que se incubaron durante 24 y 72 horas en un baño a 39° C, resultando un total de 12 botes para cada tiempo de incubación y 6 para cada tipo de subproducto. El líquido ruminal se obtuvo de 3 cabras de raza granadina (46,9 ± 2,15 kg de peso vivo medio), canuladas en rumen y alimentadas con heno de alfalfa a nivel de mantenimiento (Prieto et al., 1990). El contenido ruminal de cada animal se extrajo antes de la toma de alimento, se filtró a través de 4 capas de gasa bajo un flujo de CO₂ y se mezcló con la disolución tampón. Los frascos de vidrio se abrieron a las 24 y a las 72 horas de incubación y el residuo resultante de la fermentación se congeló a -20° C y se liofilizó. A partir de las muestras liofilizadas se realizó la extracción de ADN total con el kit QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). El extracto se utilizó para la cuantificación absoluta de varios grupos microbianos, mediante PCR en tiempo real, amplificando zonas génicas conservadas de cada grupo. Se usaron *primers* específicos de bacterias (Maeda et al., 2003), hongos, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* (Denman y McSweeney, 2006), protozoos (Sylvester et al., 2005) y arqueas metanogénicas (Denman et al., 2007). Para estimar el valor real de copias génicas se emplearon patrones consistentes en extractos del plásmido pCR®4-TOPO (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) recombinado con los fragmentos del gen diana para cada grupo microbiano analizado. Para la amplificación de los patrones y de las muestras problema se utilizó la mezcla comercial iQ™ SYBR® Green Supermix 2X y el sistema de amplificación – detección iCycler – iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El número de copias génicas se corrigió teniendo en cuenta la cantidad de muestra fresca de la que procedía el extracto de ADN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó una disminución significativa ($P \leq 0.029$) de la concentración de todas las poblaciones microbianas estudiadas tras 72 horas de incubación, en comparación con el periodo de 24 horas de incubación (Tabla 1), como respuesta lógica al agotamiento del sustrato. No obstante las diferencias eran menos acusadas (Tabla 1 y Figura 1) en el grupo de bacterias totales ($P = 0.029$). La explicación a este hecho puede estar en la importante disminución observada en las poblaciones de protozoos (Figura 1) que son predadores de las bacterias y cuyo crecimiento en sistemas *in vitro* suele estar más limitado que el de otros grupos microbianos. Goel et al. (2008), utilizando un sistema de incubación similar al empleado en este trabajo y con inóculo ruminal de ganado vacuno, observaron un incremento de las poblaciones bacterianas como consecuencia del descenso en el número de protozoos provocado por el empleo de antiprotozoarios en la dieta. Las poblaciones de arqueas metanogénicas mostraron también un descenso ($P = 0.020$) tras 72 horas, aunque éste fue menor al observado en protozoos. Estos datos están en concordancia con los de Zhang et al. (2008) que observaron, en incubaciones *in vitro*, que la eliminación de los protozoos ciliados del medio de cultivo provocaba también la de las arqueas metanogénicas asociadas a ellos, que representan entre el 10 y el 20% del total de microorganismos metanogénicos (Stumm et al., 1982), sin que se afectasen las arqueas libres. Tokura et al. (1997) observaron diferencias fisiológicas, frente a la salinidad y la presencia de amonio, entre arqueas metanogénicas de vida libre y aquellas asociadas a ciliados.

La biomasa de los diferentes grupos estudiados, tras 24 h de incubación con las distintas dietas experimentales, era igual o superior (Figuras 1a y 1b) a la que existía en el inóculo de partida (líquido ruminal + tampón). Las poblaciones de *R. flavefaciens* y hongos no parecen afectarse por la presencia de subproducto (Figura 1 b). En el resto de casos, mientras que la sustitución de cebada por tomate o aumenta (bacterias totales) o disminuye (protozoos, arqueas metanogénicas y *F. succinogenes*) la concentración del microorganismo en cuestión, la presencia de pepino disminuye considerablemente las poblaciones de todos estos grupos microbianos.

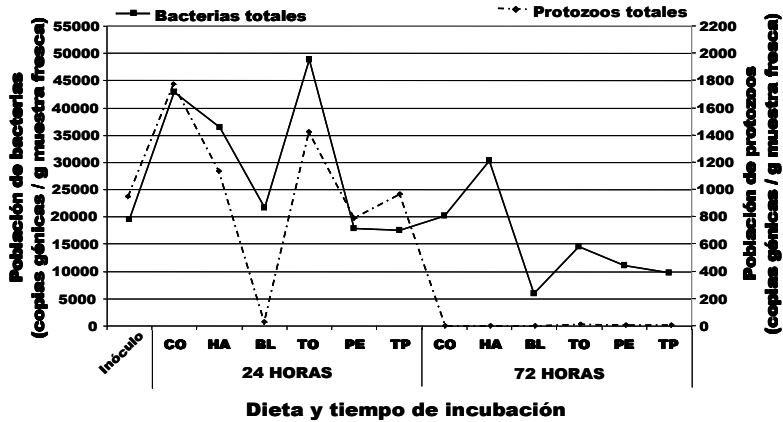
Los resultados muestran que en el sistema de CNRMR se mantiene una biomasa microbiana cuantitativamente similar a la del inóculo ruminal de partida tras 24 de incubación y, que esta biomasa responde a cambios en la composición química de la dieta empleada como sustrato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

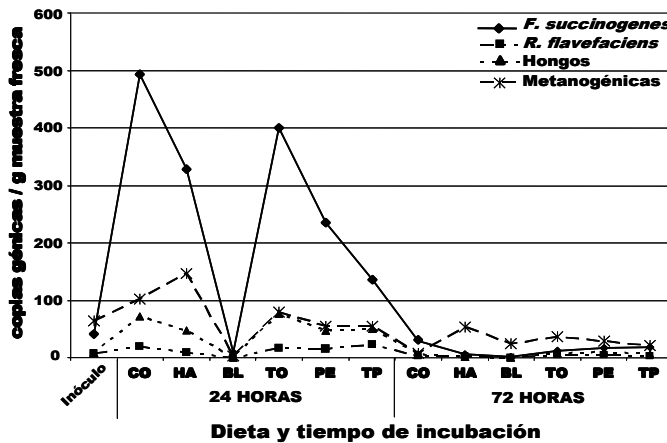
- Denman S.E. & McSweeney C.S. 2006. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 572-82.
- Denman S.E., Tomkins N.W. & McSweeney C.S. 2007. *FEMS Microbiol Ecol.* 62: 313-22.
- Goel, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2008. *J Appl Microbiol.* 770-777.
- Goering, M.K. & van Soest, P.J., 1970. *Agricultural Handbook*, vol. 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington D.C., USA.
- Maeda H., Kokeyuchi S., Arai, H., Tanimoto I., Nishimura, F. & Takashiba S. 2003 *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 39: 81-86.
- Prieto, C., Aguilera, J.F., Lara, L., Fonollá, J. 1990. *Br J Nutr.* 63, 155-163.
- Stumm, C.K., Gijzen H.J. & Vogels, G.D. 1982. *Br J Nutr.* 47, 95-99.
- Sylvester J.T., Karnati S.K., Yu Z., Newbold C.J. & Firkins J.L. 2005. *J Dairy Sci.* 88: 2083-2095.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K. & Kojima, Y. 1997. *FEMS Microbiol Ecol.* 22, 137-143.
- Zhang, C.M., Guo, Y.Q., Yuan, Z.P., Wu, Y.M., Wang, J.K., Liu, J.X. & Zhu, W.Y. 2008. *Anim Feed Sci Technol.* 146, 259-269.

Tabla 1. Efecto del tiempo de incubación sobre las poblaciones, expresadas como número de copias génicas, de bacterias totales, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, hongos totales, protozoos totales y arqueas metanogénicas totales.

	Tiempo de incubación		P-valor	EEM
	24 horas	72 Horas		
Bacterias totales	2,95 * 10 ¹⁰	1,35 * 10 ¹⁰	0,029	0,349 * 10 ¹⁰
<i>F. succinogenes</i>	26,2 * 10 ⁷	1,48 * 10 ⁷	<0,001	2,52 * 10 ⁷
<i>R. flavefaciens</i>	16,5 * 10 ⁶	3,78 * 10 ⁶	<0,001	1,31 * 10 ⁶
Hongos totales	53,4 * 10 ⁶	6,44 * 10 ⁶	<0,001	4,00 * 10 ⁶
Metanogénicas totales	6,82 * 10 ⁷	2,87 * 10 ⁷	0,002	0,577 * 10 ⁷
Protozoos totales	1050 * 10 ⁶	5,64 * 10 ⁶	<0,001	74,3 * 10 ⁶



1. a



1. b.

Figura 1. a) valores medios de copias génicas (en millones) de bacterias totales (escala de la izquierda) y protozoos totales (escala de la derecha); b) valores medios de copias génicas (en millones) de poblaciones de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, hongos totales y arqueobacterias metanogénicas totales.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia PO5-AGR-0048) y el CSIC (Proyecto Intramural-2007401021). E. C. Soto agradece la concesión de una beca predoctoral del programa I3P 2006 del CSIC.

STUDY OF MICROBIAL POPULATIONS IN A *IN VITRO* BATCH CULTURE SYSTEM FED DIETS INCLUDING GREENHOUSES WASTES AS BARLEY SUBSTITUTE

ABSTRACT: There is little information on the evolution of the microbial communities sustained in *in vitro* systems as compared with the rumen. The aim of this work was to study the evolution of some microbial groups in a batch culture system after 24 h and 72 h of incubation of diets including increasing amounts of greenhouse wastes to replace barley grain. Different microbial populations (total bacteria, methanogen archaea, fungi and protozoa, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*) were quantified by using qPCR on DNA extracts from 24 and 72 h incubations. The numbers of the analyzed microbial groups increased after 24 h and decreased after 72 h of incubation compared with the original rumen buffered inocula, although total bacteria and methanogens varied less than the other groups ($P = 0.029$ and $P = 0.002$, respectively). In general, diets including cucumber promoted lower microbial concentrations than diets with only tomato. These results show that the batch culture system seems to be able to quantitatively maintain a similar microbial biomass as compared to the rumen, and that it reproduces changes induced by the diet.

Keywords: batch culture, ruminal microorganisms, greenhouses wastes, qPCR.