

EFFECTO DEL pH SOBRE LA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE rt-PCR DE BACTERIAS INVOLUCRADAS EN LOS PROCESOS DE LIPÓLISIS Y BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL

Fuentes, M. C. y Calsamiglia, S.

¹Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España
maricarmen.fuentes@uab.es

INTRODUCCIÓN

La lipólisis es el proceso por el que se liberan los ácidos grasos (AG) de los triglicéridos y quedan disponibles para ser biohidrogenados por las bacterias ruminales. La principal bacteria identificada como responsable de este proceso es *Anaerovibrio lipolytica* (Harfoot y Hazlewood, 1988). La biohidrogenación ruminal de los AG insaturados se atribuye principalmente a cepas del grupo *Butyrivibrio*. Paillard et al. (2007) construyeron un árbol filogenético de 47 cepas ruminales productoras de ácido butírico y mediante análisis metabólicos observaron que 33 de estas cepas metabolizaban el ácido linoleico a ácido vaccénico (*Butyrivibrio* subgrupo AV), mientras que sólo un pequeño grupo de cepas convertían el ácido linoleico a ácido esteárico (*Butyrivibrio* subgrupo AS). Resultaría interesante cuantificar de manera independiente los microorganismos responsables de estos procesos de biohidrogenación ruminal para poder estudiar cómo cambios en la dieta o en las condiciones de fermentación pueden afectar a dichas poblaciones microbianas y de esta manera poder seleccionar una población microbiana ruminal más adecuada para conseguir unos determinados objetivos de enriquecimiento. En este trabajo se presentan resultados de dos estudios realizados in vitro donde se evaluó el efecto del pH sobre la cuantificación de DNA de bacterias involucradas en los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal, y se analiza la relación entre la cuantificación de DNA mediante rt-PCR de estas bacterias y la concentración de AG en el efluente para comprobar la especificidad de la técnica.

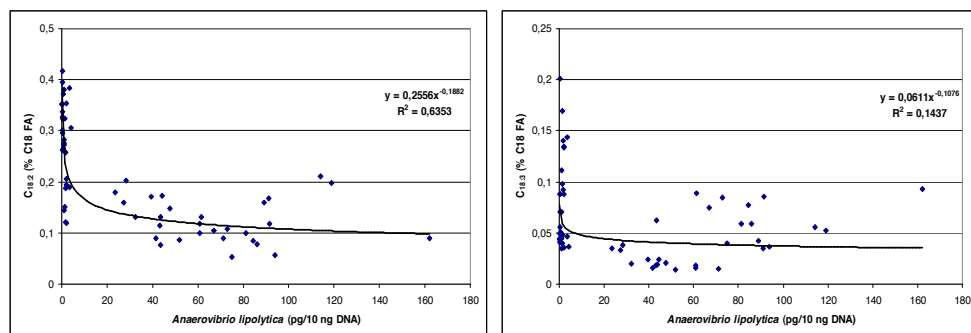
MATERIAL Y MÉTODOS

En los dos estudios in vitro se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo (Stern y Hoover, 1990) en dos periodos consecutivos de 8 días (5 d de adaptación y 3 d de muestreo). La temperatura (39°C) y la tasa de dilución sólida (5%/h) y líquida (10%/h) se mantuvieron constantes. El pH utilizado en ambos experimentos fue un pH alto de 6,4 y un pH bajo de 5,6. Durante los 3 días de muestreo a 1 hora post alimentación de la mañana se tomaron muestras del líquido ruminal del fermentador para determinar las concentraciones de DNA de *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio* subgrupo AV y *Butyrivibrio* subgrupo AS usando la técnica de rt-PCR para estudiar cambios en las bacterias involucradas en los procesos de lipólisis y biohidrogenación ruminal. A la misma hora de muestreo se tomaron 60 mL del efluente para estudiar el perfil de AG. Las muestras de DNA del líquido ruminal se extrajeron por rotura física usando el método de bead-beating (Mini-Beater; Biospec Products, Bartlesville, OK) según la metodología descrita por Whitford et al. (1998) con modificaciones de M. Blanch (comunicación personal). Se diseñaron primers específicos para los tres grupos de bacterias. Las condiciones de PCR fueron: 50°C durante 2 min; 95°C durante 10 min; 35 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Cada mezcla de PCR (20 µL) contenía (concentraciones finales): 1 × Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 0,5 µM primer, y 10 ng de DNA genómico (100 ng de DNA genómico para *A. lipolytica*). Las PCR se realizaron en un ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). La curva estándar de *A. lipolytica* tenía una pendiente de -3,417 y un coeficiente de regresión de 0,997, la de *Butyrivibrio* subgrupo AS tenía una pendiente de -3,219 y un coeficiente de 0,997 y la de *Butyrivibrio* subgrupo AV tenía una pendiente de -3,499 y un coeficiente de regresión de 0,991. Las eficiencias de la PCR, calculadas según Ginzinger (2002), fueron 96,2%, 104,5% y 93,1% para *A. lipolytica*, *Butyrivibrio* subgrupo AS y *Butyrivibrio* subgrupo AV, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

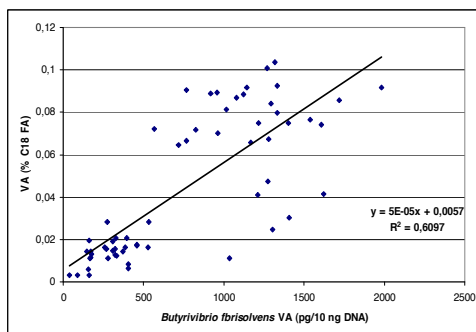
En ambos experimentos, la concentración de DNA de *A. lipolytica* se redujo a pH de 5,6. *A. lipolytica* es la principal bacteria responsable de realizar la lipólisis ruminal. Si hay menos lipólisis a pH 5,6, esto explicaría junto con una menor biohidrogenación a pH 5,6 (que también fue observada en ambos experimentos) el incremento observado en las proporciones de $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$ en el efluente en ambos experimentos a pH 5,6 (Figura 1).

Figura 1. Relación entre la concentración de DNA de *Anaerovibrio lipolytica* (pg/10 ng DNA) y las proporciones en el efluente de $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$ en ambos experimentos a pH de 5,6.



Las concentraciones de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AV también se redujeron a pH 5,6 en ambos experimentos. Este grupo de bacterias sintetiza ácido vaccénico cuando se incuban con ácido linoleico (Paillard et al., 2007). Esta menor concentración de DNA a pH 5,6 concuerda con la menor proporción de ácido vaccénico observado en el efluente de ambos experimentos (Figura 2).

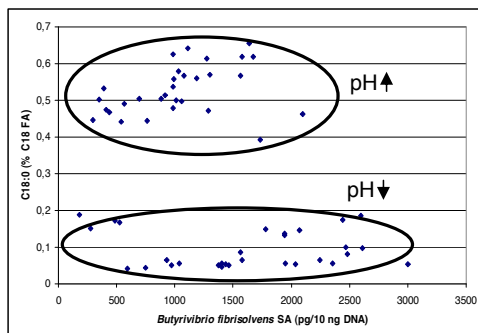
Figura 2. Relación entre la concentración de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AV (pg/10 ng DNA) y la proporción en el efluente de *trans-11* $C_{18:1}$ (AV) en ambos experimentos a pH 5,6.



El subgrupo *Butyrivibrio* AS está formado por un conjunto de bacterias que pueden sintetizar ácido esteárico cuando se incuban con ácido linoleico (Paillard et al., 2007). Si pueden sintetizar ácido esteárico a partir de ácido linoleico, es posible que también puedan usar otros intermediarios para sintetizar ácido esteárico. Aunque *Butyrivibrio* subgrupo AS parece ser resistente a condiciones de pH bajo (como se observó en ambos experimentos), también se observó una reducción en la proporción de ácido esteárico en el efluente de ambos experimentos a pH 5,6 (Figura 3). Esto podría explicarse, por un lado, porque *Butyrivibrio* subgrupo AS necesita ácido linoleico en forma libre para producir ácido esteárico, y el pH

5,6 inhibe *A. lipolytica* y la lipólisis, por tanto la disponibilidad del precursor en forma libre está también limitada; y por otro lado, porque otros intermediarios del proceso de biohidrogenación, como el ácido vaccénico, también se encuentra reducida su proporción a pH 5,6 y entonces *Butyrivibrio* subgrupo AS no puede usarlos para sintetizar ácido esteárico, a pesar de ser resistente a condiciones de pH bajo.

Figura 3. Relación entre la concentración de DNA de *Butyrivibrio* subgrupo AS (pg/10 ng DNA) y la proporción en el efluente de ácido esteárico ($C_{18:0}$) en ambos experimentos.



CONCLUSIONES

La combinación de la evaluación del perfil de AG del efluente junto con los análisis de rt-PCR de bacterias involucradas en la lipólisis y la biohidrogenación ruminal constituyen una nueva herramientas para estudiar dichas poblaciones bacterianas en relación a cambios dietarios y ruminales. Sin embargo, más estudios en animales para probar la especificidad de los primers usados en estos experimentos son necesarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ginzinger, D. G. 2002. Exp. Hematol. 30:503-512.
- Harfoot, C.G. y G.P. Hazlewood. 1988. Pages 285-322. In: The Rumen Microbial Ecosystem. 2nd ed. P. N. Hobson, ed. Elsevier, London, UK.
- Paillard, D., N. Mckain, L. C. Chaudhary, N. D. Walker, F. Pizette, I. Koppova, N. R. McEwan, J. Kopečný, P. E. Vercoe, P. Louis, y R. J. Wallace. 2007. Antonie van Leeuwenhoek. 91:417-422.
- Stern, M. D., y W. H. Hoover. 1990. Pages 17-32 in Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or Fermentation. Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.
- Whitford, M. F., R. J. Forster, C. E. Beard, J. Gong, y R. M. Teather. 1998. Anaerobe. 4:153-163.

EFFECT OF pH ON THE QUANTIFICATION USING rt-PCR OF BACTERIA INVOLVED IN LIPOLYSIS AND BIOHYDROGENATION RUMINAL PROCESSES

ABSTRACT: The results of two experiments were the effect of pH on quantification of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation were analysed and the relation between DNA concentration and effluent FA profile were studied. Results indicate that the combination of FA profile with PCR analyses of bacteria involved in lipolysis and biohydrogenation provides a new tool to study changes in these bacteria related to ruminal and dietary changes. However, further studies in animals testing the specificity of the primers used in these experiments are strongly encouraged.

Key words: biohydrogenation, concentrate, PCR, pH