

## **EFFECTO DE LA RELACIÓN FORRAJE:CONCENTRADO Y DEL TIPO DE FORRAJE DE LA DIETA SOBRE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN FERMENTADORES RUSITEC**

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

### **INTRODUCCIÓN**

Entre el 50 y el 70% de las bacterias ruminales se encuentran asociadas a las partículas de alimento, mientras que el resto está libre en el líquido ruminal. Es conocido que la composición química de las bacterias asociadas a la fase sólida del rumen (BAS) difiere de la de las bacterias asociadas a la fase líquida (BAL), y que la proporción relativa entre ambas varía con diferentes factores, entre los que destaca la relación forraje:concentrado de la dieta. No existe, sin embargo, información sobre las comunidades microbianas presentes como BAL y BAS en términos de diversidad, ni sobre cómo afecta la dieta al perfil de bacterias asociadas a las fases sólida y líquida de la digesta. En este trabajo se estudió el efecto de la relación forraje:concentrado y del tipo de forraje sobre el perfil de las comunidades bacterianas en la fase sólida de la digesta y en la fase líquida del rumen en fermentadores Rusitec.

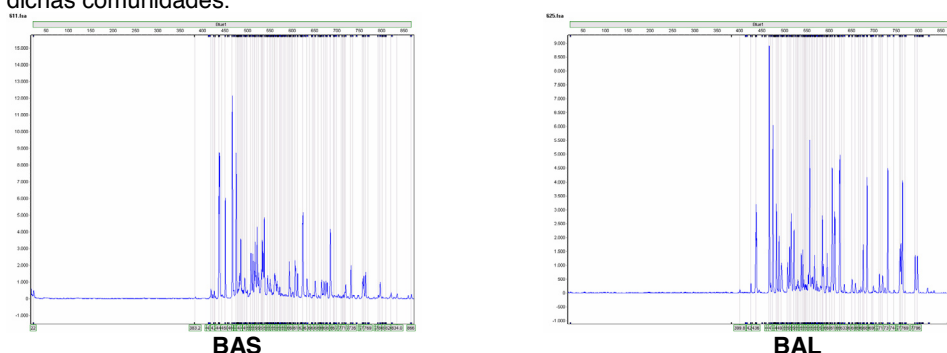
### **MATERIAL Y MÉTODOS**

El estudio se realizó utilizando 16 fermentadores Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977). Se formularon 4 dietas experimentales que consistieron en heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) y concentrado (a base de cebada, salvado de trigo, gluten de maíz, harina de soja, harina de palmiste, trigo y maíz) en proporción 70:30 (AL70 y GR70) y 30:70 (AL30 y GR30). El día 1 del experimento se inocularon los fermentadores con contenido ruminal procedente de 4 ovejas fistuladas en el rumen, alimentadas con la misma dieta administrada a los fermentadores correspondientes. Cada fermentador recibió diariamente 30 g de materia seca de dieta administrados a las 9:00 h. El forraje y concentrado se administraron en dos bolsas de nailon, que permanecieron dentro de los fermentadores durante 48 y 24 h para el forraje y el concentrado, respectivamente. Los días 15 y 16 del experimento, 500 mL del efluente se utilizaron para obtener pellets de BAL por centrifugación diferencial (Ranilla y Carro, 2003). El contenido de las bolsas de nailon se sometió a un tratamiento de desligamiento con una solución salina de metilcelulosa (0,1 %) y a centrifugación diferencial para obtener un pellet bacteriano de BAS (Ranilla y Carro, 2003).

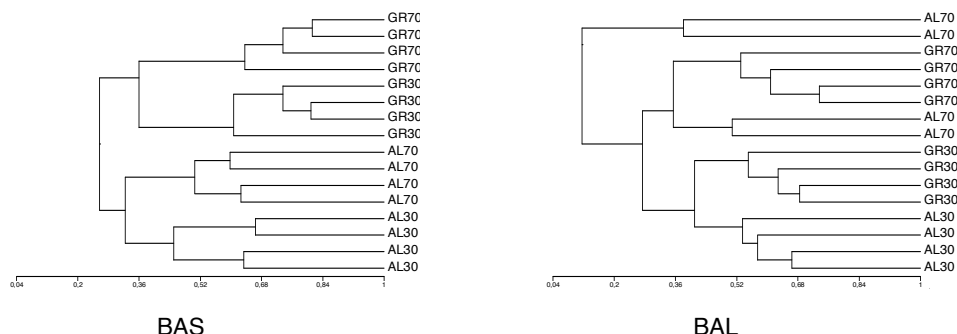
Los perfiles de las comunidades bacterianas de las digestas y los pellets se estudiaron mediante ARISA (Análisis Automatizado de la Región Espaciadora Intergénica Ribosomal). La extracción de ADN de las muestras se realizó siguiendo la metodología propuesta por Yu y Morrison (2004). El ADN extraído se 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  $\mu$ 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  $\mu$ m y polímero POP-4 (Perkim 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 de la matriz de porcentaje de similitud.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran como ejemplo dos electroferogramas de pellets BAS y BAL. Se detectaron un total de 121 filotipos, asumiendo que cada fragmento diferente corresponde a una especie bacteriana. La figura 2 representa los dendrogramas de los análisis cluster de las comunidades bacterianas de los pellets BAS y BAL. Las comunidades bacterianas de las BAS se dividieron claramente en dos grupos distintos en función del forraje utilizado como sustrato (heno de alfalfa y de gramíneas). Dentro de cada tipo de forraje, las comunidades microbianas se agruparon en función de la relación forraje:concentrado para ambos forrajes. Estos resultados indican que el factor que más influyó en la estructura de las comunidades bacterianas de las BAS fue el tipo de forraje de la dieta, y dentro de cada tipo de forraje, la proporción del mismo. Sin embargo, al analizar los perfiles de las comunidades de las BAL las diferencias parecen estar más relacionadas con la proporción de forraje en la dieta que con el tipo de forraje. Así, los pellets BAL de las dietas con un 30% de forraje se agruparon en un solo cluster, en dos grupos diferentes para cada tipo de forraje. Los pellets BAL de las dietas con un 70% de forraje siguieron un esquema similar de agrupamiento, aunque dos de los pellets de la dieta con heno de alfalfa se situaron en un grupo más alejado. En este sentido, la estructura de las comunidades microbianas de la fase líquida parece depender primariamente de la relación forraje:concentrado de la dieta, aunque el tipo de forraje también influyó en el perfil de dichas comunidades.



**Figura 1.** Ejemplo de dos electroferogramas de los perfiles ARISA obtenidos a partir de ADN de pellets de bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) y líquida (BAL) del contenido ruminal



**Figura 2.** Dendrogramas de los ARISA de los pellets de bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) y líquida (BAL) del contenido ruminal en fermentadores Rusitec (ver texto para la descripción de las dietas)

**Tabla 1.** Índice de Shannon y número de picos del ARISA en fermentadores Rusitec 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).

Item	Dieta	PB <sup>1</sup>		EEM <sup>3</sup>	Efecto (P =) <sup>2</sup>					
		BAS	BAL		PB <sup>1</sup>	F:C	FOR	F:C x FOR	PB x F:C	PB x FOR
Número de filotipos	AL70 <sup>c</sup>	25,3 <sup>a</sup>	50,8 <sup>a</sup>	0,29	<0,001	0,29	<0,001	0,14	0,94	0,002
	GR70	64,5 <sup>b</sup>	73,0 <sup>b</sup>							
Índice de Shannon	AL30 <sup>c</sup>	33,8 <sup>b</sup>	61,8 <sup>ab</sup>	0,092	<0,001	0,25	<0,001	0,21	0,95	<0,001
	GR30	63,8 <sup>b</sup>	70,5 <sup>b</sup>							
	AL70 <sup>c</sup>	3,18 <sup>a</sup>	3,85 <sup>a</sup>							
	GR70	4,17 <sup>b</sup>	4,26 <sup>b</sup>							
	AL30 <sup>c</sup>	3,44 <sup>a</sup>	4,12 <sup>ab</sup>							
	GR30	4,15 <sup>b</sup>	4,25 <sup>b</sup>							

<sup>a, b</sup> Dentro de cada columna y para cada parámetro analizado, los valores con diferente superíndice difieren (P<0,05).

<sup>c</sup> Diferencias entre BAS y BAL (P<0,05).

<sup>1</sup> PB: pellet bacteriano; BAS: bacterias asociadas a la fase sólida; BAL: bacterias de la fase líquida.

<sup>2</sup> F:C: relación forraje:concentrado; FOR: tipo de forraje.

<sup>3</sup> error estándar de la media.

Los resultados obtenidos indican que la relación forraje:concentrado no afectó al perfil de las comunidades bacterianas en fermentadores Rusitec, mientras que el tipo de forraje afectó en mayor medida a la estructura de las BAS que a la de las BAL. El forraje de gramíneas promovió el desarrollo de un mayor número de especies bacterianas y con una mayor diversidad que el heno de alfalfa.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Czerkawski, J. W., and G. Breckenridge. 1977. *Br. J. Nutr.*-38: 371–384.
- Danovaro, R. Luna, G.M., Dell'Anno, A. and Pietrangeli, B. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5982-5989.
- Ranilla, M.J. and Carro, M.D. 2003. *J. Anim. Sci.* 81: 537-544.
- Yu, Z., and M. Morrison. 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. M.E. Martínez disfrutó de una beca F.P.U. del M.E.C. (AP2005-1797).

### 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 Rusitec fermenters. In order to study microbial diversity, DNA was isolated from samples of solid- and liquid-associated bacteria (SAB and LAB, respectively) and the ITS1 region of rDNA operon was amplified by PCR and analyzed by ARISA. Forage:concentrate ratio did not affect the community profiles developed in Rusitec fermenters, but the type of forage had an effect on SAB rather than LAB profiles. Grass forage promoted the development of a higher number of bacterial species and a higher diversity than alfalfa hay.

**Keywords:** rumen microbial communities, ARISA, Rusitec