

COMPARACIÓN DEL PERFIL BACTERIANO DEL CONTENIDO CECAL Y CECOTROFOS DE CONEJOS EN CRECIMIENTO ALIMENTADOS CON DOS NIVELES DE FIBRA INDIGESTIBLE

Rodríguez-Romero, N., Abecia, L., Balcells, J., Martínez, B¹., Fondevila, M.

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013. Zaragoza. labecia@unizar.es.

¹ Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia.

INTRODUCCIÓN

La fibra dietética, además de ser una fuente de nutrientes en conejos, tiene un papel esencial en la regulación de la motilidad y la velocidad de tránsito a lo largo del sistema digestivo, y en particular, en el ciego, que aloja una comunidad bacteriana responsable de los procesos de fermentación. Por tanto, la proporción de fibra en la dieta puede afectar significativamente a la densidad y diversidad de la microbiota. La caracterización de la población microbiana cecal exige la canulación o el sacrificio de los animales, pero esto podría evitarse estudiando la microbiota de los cecotrofos excretados, siempre que éstos sean representativos (Micheland *et al.*, 2007). En este trabajo se planteó evaluar la biodiversidad microbiana en contenido cecal (CC) y cecotrofos (CT) de conejos consumiendo dietas con dos niveles de fibra indigestible (FAD), para estimar la similitud de las comunidades bacterianas, con la finalidad de evitar el sacrificio de los animales, facilitar el estudio y reducir la variabilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó contenido cecal y cecotrofos de 10 conejos blancos de raza New Zealand, de 50 días de edad, que consumían dietas con 26 (dieta 1) y 33 (dieta 2) % de fibra ácido detergente (FAD) desde el destete (28 días). Después de una fase de acostumbramiento a jaulas metabólicas individuales, se colocaron collares cervicales (6 cm d.i y 27 cm d.e) durante 24 horas para evitar la cecotrofia, y se muestrearon los cecotrofos (3 g aproximadamente). Posteriormente, se retiraron los collares y durante 24 horas los animales recibieron la dieta previa. Al sacrificio, se tomaron muestras de contenido cecal de los mismos animales. Los cecotrofos y el contenido cecal muestreados se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. La extracción del DNA se realizó con el kit QIAamp DNA (QIAGEN S.A., West Sussex, Inglaterra) siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante PCR se amplificó unas 200 pb de la región V3 del gen 16S rRNA (correspondiente a las posiciones 341-534) con los cebadores de bacterias universales 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' y 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (Muyzer *et al.* 1993). El programa de la PCR fue: 94°C por 4 min; 32 ciclos (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) y una fase final de elongación a 72°C por 4 min. Se realizó un gel de electroforesis en gradiente desnaturante (DGGE) usando el DGGE-1001 de CBS Scientific Company. Los productos de amplificación de la PCR (16µl) fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 8% (p/v) con un gradiente desnaturante de 40-60%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 V y a una temperatura de 60°C durante 16 h. El gel se tiñó con el kit DNA Silver Staining (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. La imagen del gel fue escaneada a 600 dpi y analizada con el programa Quantity One (BIO-RAD Lab, Inc.). Cada banda fue codificada binariamente (1-0) en función de su presencia o ausencia en cada muestra, y fue utilizada para construir una matriz de similitud mediante el algoritmo ultramétrico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Además, se calculó el índice de Shannon modificado (Buckland *et al.*, 2005) para analizar la diversidad bacteriana en ambos sustratos.

Los índices de similitud (IS) y biodiversidad (IB) fueron analizados mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (versión 8.2), y las medias comparadas por la mínima diferencia significativa ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la distribución del perfil microbiano del CC (a) y CT (b) de cada uno de los conejos alimentados con una dieta con dos niveles de FAD. La microbiota del CC de los animales alimentados con la dieta 1 se agruparon en un clado, mientras que la de los conejos que consumían la dieta 2 se distribuyeron de una manera menos definida (Figura 1a). La microbiota cecal de los CT mostró, en su mayoría, una distribución en función de la dieta y por ello se pueden observar dos clados bien definidos (Figura 1b), aunque en ambos clados se clasificó también una muestra de la dieta contraria, posiblemente debido a factores individuales del hospedador.

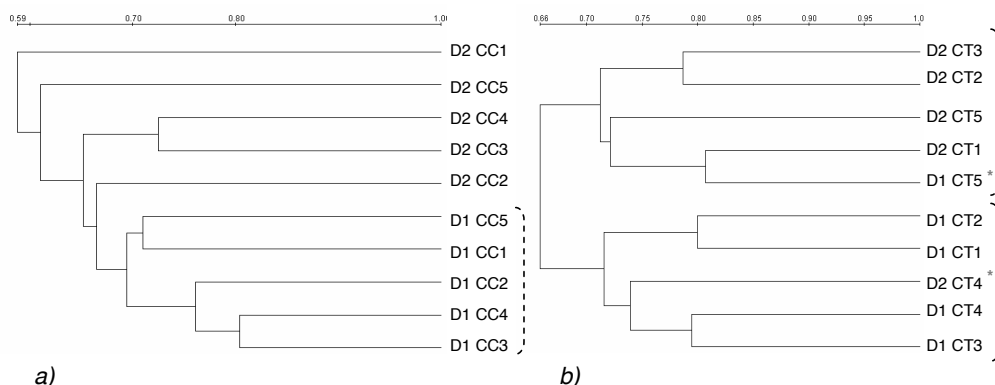


Figura 1. Dendrograma de comparación del perfil de diversidad microbial en el contenido cecal (a) y cecotrofos (b) de conejos alimentados con dietas con un 26 (D1) o 33 (D2) % de FAD.

El índice de similitud (IS) dentro de individuos entre las comunidades bacterianas observado a partir de muestras de CC y CT fue del $71,6\% \pm 0,07$. Se observó un efecto de la dieta ($P < 0,001$) siendo mayor el IS en los conejos que consumieron la dieta 1 ($77,9\%$) que en los que consumieron mayor contenido de FAD ($66,0\%$).

El índice de biodiversidad de las comunidades bacterianas cecales de los conejos fue similar estimado a partir de CC y CT (Tabla 1). Estos valores fueron un poco inferiores a los descritos en el trabajo de Micheland *et al.* (2007; 3.75 y 3.94 para CC y CT, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en la biodiversidad de las poblaciones en función de la dieta o del individuo ($P > 0,05$).

Tabla 1. Índice de biodiversidad (IB) de comunidades bacterianas en contenido cecal y cecotrofos de conejos alimentados con dos niveles de fibra indigestible (26 y 33% de FAD).

	Dieta 1	Dieta 2	X	ee
Contenido cecal	3.506	3.472	3.489	0.042
Cecotrofo	3.486	3.413	3.450	0.051

Las diferencias observadas entre CC y CT fueron en cierto modo esperables, teniendo en cuenta el proceso selectivo de la cecotrofia que al llegar los alimentos al colon, por medio de los movimientos peristálticos clasifica las partículas fibrosas en el lumen, mientras que las finas se agrupan en la periferia. Las fibrosas forman las heces duras y son excretadas mientras que las finas se fermentan en el ciego y salen al exterior rodeadas de

una capa de mucus formando las heces blandas o cecotrofos, a unas horas concretas del día. Esto explica la importancia del porcentaje de fibra de la dieta en esta especie.

No obstante, la clasificación de comunidades a partir de los CT (Fig 1b) resultó más definida que a partir del CC (Fig 1a), por lo cual pudiera ser una herramienta útil para el estudio de las diferencias entre ambientes y ecosistemas y de esta manera evitar la variabilidad individual. Resultados similares fueron obtenidos por Micheland *et al.* (2007) empleando CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism), quienes concluyeron que los cecotrofos pueden ser utilizados para el estudio de la dinámica de poblaciones microbianas del contenido cecal. Para nuestro conocimiento, estos dos trabajos constituyen las únicas referencias respecto a esta comparación.

Teniendo en cuenta lo anterior, el estudio de la biodiversidad de las comunidades bacterianas a partir de muestras de cecotrofos permitiría caracterizar el efecto de factores externos, como la dieta, sobre el ecosistema cecal. Las ventajas de este tipo de muestras sobre el uso del contenido cecal se pueden relacionar con la posible reducción de la variación individual, muy elevada en esta especie, y la ausencia de necesidad del sacrificio de los animales o el empleo de técnicas invasivas como la cirugía, con la consiguiente mejora del bienestar animal en la experimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Buckland, S. T., Maguran, A. E., Green, R. E. and Fewster, R. M. 2005. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360:243-254. •Michelland, R, Combes, S., Cauquil, L., Gidenne, T., Monteils, V., Fortun.Lamothe, L. 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, 2007, France. •Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700. •SAS. Version 8.2. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL 2006-07596/GAN del Ministerio de Educación y Ciencia. N. Rodríguez-Romero disfruta de una beca predoctoral de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (Venezuela).

COMPARISON OF BACTERIAL PROFILE FROM CAECAL CONTENT AND CAECOTROPHES IN GROWING RABBITS FED ON TWO LEVELS OF INDIGESTIBLE FIBRE

ABSTRACT: Fibre plays an important role in the nutrition of the rabbit, not only as a source of nutrient but also as a regulator of the digestive tract, especially in the caecum where a wide variety of microorganisms are located. The aim of this study was to analyze the microbial diversity of caecal content and caecotrophes of growing rabbits fed on a diet with two levels of indigestible fibre (26 and 33%). Bacterial profile of ten animals was analyzed by DGGE and diversity was compared by the modified Shannon index. Caecotrophes were 71% similar to caecal content but diet modified this percentage, being the diet with the high level of FAD (33%) which showed the lowest percentage of similarity between them (66 %). However, nor diet neither source of the sample modified the biodiversity index (3.48 ± 0.042 and 3.45 ± 0.051 for caecal content and caecotrophes, respectively). Taking into account these considerations, soft faeces seem to be a good alternative to represent caecal content in studies of diet comparison.

Keywords: rabbit, caecal content, caecotrophes, DGGE