

CAMBIOS TEMPORALES EN POBLACIONES BACTERIANAS DEL RUMEN Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA BIOHIDROGENACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN OVEJAS ALIMENTADAS CON MICROALGAS MARINAS

Castro-Carrera, T., Toral, P. G., Frutos, P., Hervás, G. y Belenguer, A.
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León,
España. Correo electrónico: a.belenguer@csic.es

INTRODUCCIÓN

La administración de fuentes lipídicas de origen marino, como las microalgas, a la dieta de ovejas en lactación permite modular el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche mediante su efecto sobre el metabolismo microbiano de los lípidos en el rumen (Belenguer et al., 2010). Aunque se sabe que las bacterias son los principales microorganismos responsables de este proceso, la información disponible sobre las poblaciones implicadas es aún limitada (Huws et al., 2011; Castro-Carrera et al., 2014). Además, este tipo de suplementos marinos puede provocar modificaciones a largo plazo en la comunidad bacteriana ruminal (Castro-Carrera et al., 2012), pero los escasos estudios que relacionan dichos cambios con los de la composición de AG en el rumen se limitan a periodos de tiempo relativamente cortos (<30 días; Boeckeaert et al., 2008; Belenguer et al., 2010).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar las variaciones en poblaciones bacterianas del rumen en respuesta a la suplementación de la dieta de ovejas con microalgas marinas durante un periodo prolongado, así como examinar de forma paralela los cambios en el perfil lipídico ruminal, para tratar de establecer relaciones entre grupos microbianos y el proceso de biohidrogenación de los AG insaturados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 ovejas adultas de raza assaf en lactación, que fueron distribuidas en 6 lotes de 6 animales cada uno, asignados a 2 tratamientos experimentales (dietas). Todas las ovejas recibieron ad libitum una dieta mixta completa compuesta por heno de alfalfa (40%) y un concentrado (60%) que contenía maíz, soja, cebada, pulpa de remolacha, melazas, un complemento vitamínico-mineral y 25 g de aceite de girasol/kg materia seca (MS). Esta dieta estaba suplementada con 0 (control) o con 8 g de microalgas marinas (Market Biosciences Corp., EE. UU.)/kg MS. Tras un periodo de adaptación de 3 semanas, los animales del grupo control continuaron con la misma dieta durante los siguientes 52 días, mientras que al resto se le ofertó la dieta con microalgas marinas. Los días 0, 26 y 52 de experimento, 3 h después de retirar los restos de alimento, se tomaron muestras individuales de fluido ruminal de todos los animales mediante el uso de una sonda esofágica. Una vez filtrado, se tomaron alícuotas que fueron congeladas inmediatamente a -80 °C y posteriormente liofilizadas para el estudio de la comunidad bacteriana mediante PCR cuantitativa (qPCR) y la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP), y también para el análisis de AG mediante cromatografía de gases (Toral et al., 2010).

La extracción de ADN microbiano y el análisis de la comunidad bacteriana mediante T-RFLP, en el que se emplearon tres enzimas de restricción (*HhaI*, *MspI* y *HaellI*) por separado, se llevaron a cabo tal y como describen Castro-Carrera et al. (2014). Los fragmentos terminales de restricción (T-RF) se analizaron en un secuenciador capilar automático Megabace 500 (Amersham Biosciences, Reino Unido), utilizando fragmentos de entre 60 y 900 pares de bases (pb) como patrones. La qPCR se realizó según Belenguer et al. (2010) para cuantificar los géneros *Prevotella* y *Ruminococcus* (Weimer et al., 2008).

El perfil de picos de T-RFLP se obtuvo mediante el programa *GeneMarker* (Softgenetics, EE. UU.) y los datos fueron analizados con el *software* R (www.r-project.org, versión 3.1.1). Las abundancias obtenidas mediante qPCR (% sobre bacterias totales) y T-RFLP (% sobre el área total de los T-RF) fueron transformadas (\log_{10}). El efecto de la dieta (D), del tiempo (T) y de su interacción (D×T) se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo, anidando los datos de cada lote al tratamiento. Para ello se utilizó el procedimiento MIXED del SAS 9.4 (SAS Institute Inc, EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos mediante qPCR, *Ruminococcus* alcanzó abundancias importantes (5,6±0,42%) y *Prevotella* fue el grupo dominante (71,3±1,81%), lo que coincide

con otros estudios en el rumen (Weimer et al., 2008; Castro-Carrera et al., 2014). A pesar de que se ha sugerido que especies de estos géneros podrían estar implicadas en el metabolismo ruminal de los AG (Huws et al., 2011; Castro-Carrera et al., 2014), la inclusión de microalgas marinas en la dieta de ovejas durante un periodo relativamente largo (52 días) no alteró las proporciones relativas de estas poblaciones, ya que no hubo efecto ni de la dieta ni de la interacción con el tiempo ($P>0,10$; datos no presentados). Su elevada diversidad bacteriana podría explicar la ausencia de cambios significativos. Por el contrario, la T-RFLP, que puede discriminar microorganismos emparentados filogenéticamente, sí permitió detectar modificaciones en subpoblaciones bacterianas concretas que pueden corresponder a algunas especies no cultivadas de dichos grupos. Así, se observó que fragmentos compatibles con diversas bacterias de *Prevotella* (103 pb con *MspI* y 270 con *HaeIII*; Tabla 1) desaparecieron con la inclusión de las microalgas marinas, lo que podría sugerir una posible implicación en la síntesis de 18:0 (Huws et al., 2011). Por otra parte, la dieta con microalgas marinas incrementó la abundancia del T-RF de 181 pb obtenido con *HaeIII*, siendo mayor el día 52 (Tabla 1), de manera semejante a la concentración de 10-oxo-18:0, *cis*-11 18:1 y *trans*-10 18:1 (Tabla 2). Es interesante destacar que este último T-RF podría proceder de varios microorganismos específicos del género *Prevotella* que no han sido previamente relacionados con la biohidrogenación ruminal.

Tabla 1. Abundancias relativas de algunos fragmentos detectados mediante T-RFLP (expresadas como \log_{10} del % del área total - valores no transformados entre paréntesis) en muestras de ADN microbiano del fluido ruminal recogido los días 0, 26 y 52 de ovejas en lactación alimentadas con una dieta control o suplementada con microalgas marinas.

	Control			Microalgas marinas			eed ²	P ³		
	0	26	52	0	26	52		D	T	D×T
<i>Prevotella</i> ¹										
103 pb	0,16 ^{ab}	0,06 ^{ab}	0,22 ^a	0,18 ^a	-0,22 ^b	-0,22 ^b	0,173	NS	**	**
(<i>MspI</i>)	(1,12)	(0,66)	(1,07)	(0,91)	(0,00)	(0,00)				
270 pb	0,18 ^{ab}	0,14 ^{ab}	0,19 ^{ab}	0,29 ^a	-0,15 ^b	-0,15 ^b	0,176	NS	*	*
(<i>HaeIII</i>)	(1,03)	(0,84)	(1,06)	(1,29)	(0,00)	(0,00)				
181 pb	0,56 ^{bc}	0,57 ^{bc}	0,60 ^{bc}	0,45 ^c	0,66 ^b	0,88 ^a	0,094	NS	*	*
(<i>HaeIII</i>)	(1,66)	(1,56)	(1,84)	(0,70)	(2,49)	(5,51)				
<i>Ruminococcaceae</i> ¹										
540 pb	0,11 ^{ab}	-0,22 ^b	-0,02 ^{ab}	-0,22 ^b	0,34 ^a	-0,03 ^{ab}	0,292	NS	NS	*
(<i>MspI</i>)	(0,84)	(0,00)	(0,60)	(0,00)	(1,64)	(0,57)				
<i>Succinivibrio</i> ¹										
201 pb	0,04 ^z	0,35 ^{xy}	0,42 ^x	0,04 ^z	0,15 ^{yz}	0,67 ^w	0,117	NS	***	t
(<i>HhaI</i>)	(0,00)	(1,41)	(1,54)	(0,00)	(0,42)	(3,63)				
461 pb	-0,05 ^y	0,29 ^x	0,35 ^x	-0,05 ^y	0,06 ^y	0,58 ^w	0,119	NS	***	t
(<i>MspI</i>)	(0,00)	(1,28)	(1,35)	(0,00)	(0,31)	(3,00)				

Distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (^{a-d} $P<0,05$) o una tendencia (^{w-z} $P<0,10$) a la significación.

¹Identificación taxonómica potencial. ²error estándar de la diferencia; ³nivel de significación del efecto de la dieta (D), del tiempo (T) y de la interacción (D×T). NS=no significativo; t= $P<0,10$; *= $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$

La administración de microalgas marinas también indujo un aumento transitorio (día 26) de un T-RF (540 pb con *MspI*) compatible con unas pocas especies de la familia *Ruminococcaceae* que tampoco se han asociado anteriormente con el metabolismo ruminal de los AG. Esta modificación es similar a la del *trans*-11 18:11 (Tabla 2), lo que podría indicar su capacidad para formar este AG. Además, fragmentos que pueden provenir de determinadas cepas de *Succinivibrio* (201 pb con *HhaI* y 461 con *MspI*) tendieron a ser más abundantes con la adición de microalgas marinas que con la dieta control el día 52 ($P<0,10$), lo que parece coincidir con los cambios en la concentración de 10-oxo-18:0 y algunos isómeros 18:1 (e. g., *trans*-10 o *cis*-11) y con una posible relevancia de estas bacterias en el metabolismo de los lípidos en el rumen (Castro-Carrera et al., 2014).

Tabla 2. Concentración de algunos ácidos grasos (AG; g/100 g AG totales) en el fluido ruminal recogido los días 0, 26 y 52 de ovejas en lactación alimentadas con una dieta control o suplementada con microalgas marinas.

	Control			Microalgas marinas			eed ¹	P ²		
	0	26	52	0	26	52		D	T	D×T
18:0	44,4 ^{ab}	42,7 ^b	39,2 ^b	49,7 ^a	9,15 ^c	7,73 ^c	2,712	***	***	***
cis-9 18:1	4,17 ^{cd}	5,76 ^{bc}	6,37 ^b	3,36 ^d	8,75 ^a	10,61 ^a	0,844	***	***	**
cis-11 18:1	0,52 ^{cde}	0,59 ^d	0,68 ^c	0,48 ^e	1,03 ^b	1,26 ^a	0,059	***	**	*
trans-10 18:1	2,85 ^c	2,10 ^{bcd}	1,94 ^{cd}	1,49 ^d	7,49 ^{ab}	11,52 ^a	2,276	*	t	*
trans-11 18:1	17,2 ^c	14,7 ^c	16,1 ^c	15,3 ^c	34,0 ^a	26,2 ^b	2,623	***	**	***
10-oxo-18:0	0,10 ^c	0,07 ^c	0,10 ^c	0,07 ^c	2,10 ^b	3,02 ^a	0,436	***	***	***

Distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (^{a-e}P<0,05).

¹error estándar de la diferencia; ²nivel de significación del efecto de la dieta (D), del tiempo (T) y de la interacción (D×T). t=P<0,10; *=P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001.

En definitiva, estos resultados sugieren que algunas subpoblaciones bacterianas que no habían sido relacionadas previamente con la biohidrogenación ruminal, podrían estar ligadas a la acumulación de determinados AG. Además, su posible asignación filogenética a especies concretas de la familia *Ruminococcaceae* y del género *Prevotella*, de las que se conoce la secuencia de su ADNr 16S, podría facilitar el diseño de cebadores específicos que pueden contribuir a confirmar su participación real in vivo y por tanto a incrementar el conocimiento de la compleja microbiología del metabolismo lipídico en el rumen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer et al., 2010. J. Dairy Sci. 93: 3275–3286.
- Boeckaert et al., 2008. Appl. Environ. Microbiol. 74: 6923–6930.
- Castro-Carrera et al., 2012. Abstracts of the 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, p.111.
- Castro-Carrera et al., 2014. J. Dairy Sci. 97: 1661–1669.
- Huws et al., 2011. Environ. Microbiol. 13: 1500–1512.
- Toral et al., 2010. J. Dairy Sci. 93: 4804–4817.
- Weimer et al., 2008. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 135-145.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (proy. AGL2011-23700). T. Castro-Carrera ha disfrutado de una beca predoctoral del CSIC (programa JAE) cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

TEMPORAL CHANGES IN RUMEN BACTERIAL POPULATIONS AND THEIR POSSIBLE RELATION TO FATTY ACID BIOHYDROGENATION IN SHEEP FED MARINE ALGAE

ABSTRACT: Diet supplementation with marine algae (MA) in sheep alters rumen fatty acid (FA) metabolism via changes in the bacterial community, which may occur over an extended period. Examining these time-dependent variations, together with the FA profile, may allow to relate microbial groups to FA biohydrogenation. With this aim, 36 lactating ewes were divided in 6 lots (3 lots/treatment) and offered a diet containing alfalfa hay (40%) and a concentrate (60%) with 25 g of sunflower oil/kg dry matter (DM), and supplemented with either 0 (Control) or 8 g of MA/kg DM. On days 0, 26 and 52, samples of rumen fluid were collected through a stomach tube and composited per lot for microbial analysis, using quantitative PCR (qPCR) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), and FA determination. The genera *Prevotella* and *Ruminococcus*, quantified by qPCR, showed no changes due to the treatment or its interaction with time (P>0.05). Conversely, several fragments detected by T-RFLP were modified by MA over the long time similarly to certain FA, suggesting a potential role of the compatible bacteria in rumen FA metabolism. Some of these fragments may correspond to species of *Ruminococcaceae* and *Prevotella* that had not been previously related to FA biohydrogenation.

Keywords: biohydrogenation, lipid, molecular biology, rumen microbiota.