

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RACION Y LA AUSENCIA DE PROTOZOOS SOBRE OTRAS POBLACIONES DEL ECOSISTEMA RUMINAL

Belanche^{1,2}, A., Newbold¹, C.J., De la Fuente², G, y Balcells², J.

¹Institute of Biological, Environmental & Rural Sciences, Aberystwyth University, Llanbadarn, SY23 3AL, Aberystwyth, Ceredigion, United Kingdom. aib@aber.ac.uk

²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, España.

INTRODUCCIÓN

El rumen alberga a una gran variedad de microorganismos, las bacterias son el grupo más abundante y son responsables de la mayor parte de los procesos de degradación y biosíntesis que se producen en el compartimiento retículo- ruminal. Los protozoos, a pesar de no ser indispensables en dicho ecosistema, contribuyen junto a los hongos en la digestión de la fibra. Estos protozoos representan el nivel más alto en la pirámide trófica, ejerciendo de depredadores de microbios de menor tamaño (bacterias y protozoos), y por tanto su simple presencia determina el equilibrio de dicho ecosistema. A pesar de la elevada biodiversidad ruminal, las limitaciones metodológicas existentes para estudiar la contribución microbiana al intestino del rumiante, han obligado a asumir la presencia de dos únicas poblaciones ruminales, las bacterias asociadas a la fracción líquida (BAL) y a la sólida (BAS). Sin embargo, la existencia de secuencias de ADN específicas de los diferentes grupos microbianos y la implementación de técnicas moleculares, como la PCR cuantitativa, han supuesto importantes avances en la microbiología digestiva, permitiendo analizar de una forma más precisa la composición y evolución de la microbiota ruminal, así como la contribución de las diferentes especies microbianas al sistema digestivo del hospedador. En este sentido, el presente trabajo se plantea con un doble objetivo, i) estudiar de qué forma la ausencia de protozoos y el tipo de dieta pueden afectar a la abundancia otros grupos microbianos en el ecosistema ruminal; ii) analizar en qué medida ambos parámetros modifican la proporción de dichos microorganismos en los extractos microbianos convencionalmente utilizados como referencia y en el contenido abomasal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron veinte corderos de la raza Rasa Aragonesa provenientes de partos dobles, siendo uno de los hermanos separado de la madre tras el parto y criado en un ambiente libre de protozoos (Defaunados) mientras el otro recibió un manejo convencional (Control). A los 6 meses de edad los animales fueron aleatoriamente divididos en cuatro grupos ($n=5$) y alimentados (a nivel de 1,5 mantenimiento) durante 21 días con dos raciones experimentales compuestas por 100% heno de alfalfa (Alfalfa) o 50-50% heno de alfalfa- cebada molida (Mixta). Tras el sacrificio (2 h tras la última toma) se muestreo el contenido ruminal procediendo a la extracción del ADN, el recuento protozoario y el aislamiento de los extractos microbianos BAL y BAS (Martín-Orúe et al., 2000). La extracción de ADN de las muestras congeladas fue realizada por triplicado mediante el kit QIAamp® Stoll Mini Kit (Quiagen). En la PCR a tiempo real se utilizaron 25µl de volumen de reacción (25 pmol de cada cebador, 12.5 µl de Platinum® SYBR Green y 0,5 µl de ROX Invitrogen™). Los cebadores empleados fueron específicos para bacterias totales (Maeda 2003), *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* (Koike y Kobayashi, 2001), *Ruminococcus flavefaciens*, *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium* (Tajima et al., 2001), *Streptococcus bovis* (Stevenson y Weimer, 2007), metanógenos (Denman et al., 2007) y hongos anaerobios totales (Zhang et al., 2008). Se utilizaron unas condiciones de amplificación comunes para todos los microorganismos (95°C 10 min, y 45 ciclos de 95 °C 15 s, 55 °C 30s y 72 °C 30s) y se determinó la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores para corregir la abundancia relativa de cada grupo microbiano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incorporación de cebada en la dieta incrementó la concentración de protozoos ruminales en el grupo control ($3,7 \cdot 10^4$ vs $1,4 \cdot 10^6$ protz./ml; $P < 0,01$). Las eficiencias de amplificación de la PCR cuantitativa fueron del 98, 90, 84, 93, 92, 91, 96, 96 y 74% para bacterias totales, *R.albus*, *R.flavefaciens*, *F.succinogenes*, *P.ruminicola*, *S.ruminantium*, *S.bovis*, Metanógenos y hongos anaerobios respectivamente, obteniendo en todos los casos un único producto de la amplificación. Las especies cultivables representan una baja proporción del total de microorganismos ruminales, en concreto los grupos microbianos estudiados únicamente supusieron el 8.7% de las bacterias ruminales, siendo *F.succinogenes* la más abundante con el 3.35%, seguida de *P.ruminicola* (2.26%), *R.flavefaciens* (1.47%) y *S.ruminantium* (1.29%), mientras que el resto de microorganismos mostró una baja concentración a nivel ruminal ($< 0.13\%$). Las especies celulolíticas, representadas por *R.albus*, *R.flavefaciens* y *F.succinogens*, constituyen alrededor del 5% del total de secuencias bacterianas, lo que sugiere que una importante digestión de la fibra es llevada a cabo por células eucariotas (hongos y protozoos) o por bacterias celulíticas actualmente desconocidas. Una característica de las bacterias celulolíticas es el escaso efecto que la dieta ejerce sobre su concentración, mientras que la presencia de protozoos puede ocasionar diferentes respuestas en función de la especie, reduciendo la abundancia de *R.albus* e incrementando la de *F.succinogenes* ($P < 0,05$). Por el contrario, las bacterias amilolíticas manifestaron una mayor sensibilidad a la presencia de concentrado, incrementando la abundancia de *S.ruminantium* (0,16 vs 2,69%, $P < 0,01$) y *S.bovis*, mientras que *P.ruminicola* mostró su máximas concentraciones en los corderos que ingirieron sólo alfalfa (3.24 vs 1.74%), mostrando así su faceta proteolítica y su consiguiente preferencia por dietas ricas en proteína. Además, la ausencia de ciliados incremento la disponibilidad de sustrato fácilmente fermentable, lo que potenció la proliferación de *P.ruminicola* (0,70 vs 3,00%, $P < 0,05$) y *S.bovis* (0,015 vs 0,020%, $P < 0,05$), mientras *S.ruminantium* mostró una buena simbiosis con los protozoos, que estimularon su presencia (1,99 vs 2,15%, $P = 0,08$). Los metanógenos presentaron sus máximos niveles en el grupo control recibiendo dietas forrajeras (0,36% interacción PxD $P < 0,05$), mostrando su dependencia de los protozoos y de dietas ricas en carbohidratos estructurales. Los hongos anaerobios, que fueron expresados respecto a bacterias totales debido a la dificultad de su aislamiento, incrementaron su concentración en presencia de protozoos (0,07 vs 0,17%, $P < 0,01$) y bajo dietas completamente forrajeras (0,03 vs 0,17%, $P < 0,01$). El origen de la muestra (rumen, abomaso, BAL y BAS) afecto al perfil poblacional. La constitución BAL y BAS estuvo determinada por la fisiología de los microorganismos, así las tres especies celulolíticas presentaron un tropismo por los sustratos sólidos, donde representaron hasta el 17% de las bacterias, mientras que *S. ruminatium* mostró una mayor predilección por la fase líquida (3,3%). De esta forma, la concentración ruminal de cada especie estuvo comprendida entre lo límites marcados por los extractos de referencia. Los hongos anaerobios presentaron sus máximas concentraciones en las muestras sin procesar (rumen y abomaso) evidenciando su alta sensibilidad a la presencia de oxígeno. Finalmente, salvo *P.ruminicola*, la concentración abomasal de las especies estudiadas no mostro diferencias con la ruminal, descartando así una posible retención selectiva de bacterias en el rumen. Incluso las bacterias metanogénicas y los hongos mostraron una mayor presencia a nivel post-ruminal, posiblemente debido a una elevada persistencia de sus secuencias de ADN. El presente trabajo muestra que la PCR cuantitativa es una valiosa herramienta para estudiar el ecosistema ruminal y las interacciones entre los diferentes grupos microbianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Denman S.E., Tomkins N.W. & McSweeney C.S. 2007. *FEMS Microbiol Ecol.* 62: 313-22. • Koike, S. & Kobayashi, J. 2001. *FEMS Microbiol. Let.* 204(2) 361-366 • Maeda, H. et al. 2003, *FEMS, In. Med. Mic.* 39, 81-86 • Martín-Orúe, S.M. Balcells, J. Zakraoui, F. & Castrillo, C. 1998, *Anim. Feed .Sci. Technol.* 71: 269-282 • Stevenson, D.M. & Weimer, P.J. 2007, *App. Microbiol. Biotech.* 75(1) 165-174 • Tajima, K. Animov, R.I. Nagamine, T. Matsui, H. Nakamura, M. & Benno, J. 2001, *App. Environ. Microbiol.* 67(6) 2766-2774 • Zhang, CM. 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 de la defaunación y el tipo de dieta sobre la abundancia relativa de diferentes grupos microbianos en rumen, abomaso y extractos bacterianos aislados de la fracción líquida (BAL) y sólida (BAS) del contenido ruminal.

	(100·E ^{ACT})	Control		Defaunados		SEM n=5	Significación		
		Alfalfa	Mixta	Alfalfa	Mixta		Protz.	Dieta	PxD
<i>R.albus</i>	Rum.	0.02	0.04	0.18	0.13	0.062	T		
	Abo.	0.03	0.22	0.07	0.06	0.059	*		T
	BAL	0.01	0.02	0.21	0.12	0.064	*		
	BAS	0.14	0.50	0.99	1.19	0.486			
<i>R.flave.</i>	Rum.	2.30	0.90	1.50	2.04	0.625			
	Abo.	0.52	0.60	0.30	0.22	0.160	T		
	BAL	0.75	0.77	0.29	1.31	0.422			
	BAS	6.12	4.57	3.15	6.59	1.808			
<i>F.succi.</i>	Rum.	7.77	2.17	0.02	5.05	1.745			**
	Abo.	4.68	1.38	0.01	1.62	0.792	*		**
	BAL	5.22	1.47	0.00	2.54	1.215			*
	BAS	10.62	2.96	0.01	10.60	3.597			*
<i>P.rumin.</i>	Rum.	0.94	0.46	5.55	3.03	1.311	*		
	Abo.	1.20	0.47	3.86	1.05	0.759	*	*	
	BAL	2.78	1.28	2.94	1.35	0.816		T	
	BAS	1.64	1.22	2.59	2.96	1.077			
<i>S.rumin.</i>	Rum.	0.32	3.98	0.00	1.40	0.767	T	**	
	Abo.	0.08	0.58	0.00	0.10	0.109	*	*	T
	BAL	0.76	12.43	0.00	1.45	1.995	**	**	*
	BAS	0.16	1.98	0.00	0.69	0.332	*	**	
<i>S.bovis.</i>	Rum.	0.01	0.01	0.02	0.02	0.003	*		
	Abo.	0.01	0.02	0.01	0.01	0.002			*
	BAL	0.01	0.02	0.02	0.04	0.003	***	**	
	BAS	0.01	0.02	0.01	0.04	0.004	**	***	*
Metang.	Rum.	0.36	0.07	0.06	0.11	0.059	*	T	*
	Abo.	0.65	0.16	0.05	0.12	0.082	**	*	**
	BAL	0.62	0.04	0.05	0.03	0.099	**	**	*
	BAS	0.30	0.11	0.05	0.09	0.058	*		T
Hongos	Rum.	0.28	0.06	0.07	0.00	0.043	**	**	
	Abo.	0.37	0.08	0.08	0.00	0.074	*	*	
	BAL	0.04	0.00	0.01	0.00	0.008	T	**	T
	BAS	0.09	0.01	0.00	0.00	0.008	***	***	*

EFFECT OF DEFAUNATION AND DIET ON RUMEN MICROBIAL POPULATIONS

ABSTRACT: This assay studied the effect of defaunation and diet on relative abundance of several microorganisms using real time PCR. Cellulolytic species represented 5% of rumen bacteria and were not affected by the diet. Defaunation incremented the abundance of *P. ruminicola* and *S.bovis* while barley supplementation increased the *S.ruminantium* presence. Rumen protozoa and fibre were essential to improve the methanogens in the rumen and anaerobic fungi represented around 0.1%. However, the abundance of each microorganism was always affected by the origin of the sample (rumen, abomasum, LAB or SAB).

Keywords: rumen, bacteria, defaunation, real time PCR.