

APLICACIÓN DE T-RFLP PARA ESTUDIAR LOS CAMBIOS QUE SE PRODUCEN EN LA COMUNIDAD BACTERIANA RUMINAL DE CORDEROS EN CEBO SUPLEMENTADOS CON POLIFENOLES

López-Campos, Ó., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez F.J. y Andrés, S.
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León). 24346 (León).
Email: sonia.andres@eae.csic.es

INTRODUCCIÓN

La utilización de flavonoides en la alimentación de los animales de granja está cobrando importancia a lo largo de los últimos años, dado que estos compuestos administrados a dosis determinadas pueden ejercer efectos beneficiosos no solo sobre el bienestar animal sino también sobre la calidad del producto que llega finalmente al consumidor (carne o leche). Así por ejemplo, varios estudios han descrito la capacidad de los flavonoides para estimular la respuesta inmune o disminuir la inflamación de la mucosa gástrica en diversas circunstancias (Fisher et al., 1997). Además, hay que destacar las propiedades antioxidantes de estos polifenoles (Kim et al., 2004; 2006), lo que en último término podría tener gran importancia para mejorar la calidad de la carne y de la leche, especialmente en animales que reciben una ración rica en ácidos grasos poliinsaturados.

En todo caso, la particularidad que presenta el rumen en algunos de los animales de granja más importantes hace necesario estudiar el efecto que los flavonoides ejercen sobre la comunidad bacteriana de este compartimiento, dado que ésta es responsable, en gran medida, de la degradación de los componentes de la ración administrada a los rumiantes. Es por ello que el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto del consumo de pienso suplementado con naringina (una flavanona glicosilada presente en la piel de pomelo) sobre la diversidad de la comunidad bacteriana ruminal de corderos en cebo a través del empleo de la técnica T-RFLP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 20 corderos de raza Assaf (peso vivo 24.8 ± 1.64 kg), distribuidos en dos grupos equilibrados en función del peso. Los animales se alojaron en jaulas individuales y dispusieron en todo momento de agua fresca y paja de cebada a voluntad. La pauta de administración del pienso [cebada (55%), soja (21%), maíz (19%), melazas (3%), y corrector (2%)] fue a razón de $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ PV. El pienso se administró solo (grupo CONTROL, n=10 animales) o bien con un 0,15% de naringina ($1,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MS, grupo NAR, n=10 animales). El periodo experimental tuvo una duración de 8 semanas. Diariamente se recogieron y pesaron los restos de alimento. Al finalizar el periodo experimental los animales se sacrificaron y se procedió a recoger una muestra representativa del contenido ruminal de cada cordero, que se congeló inmediatamente a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas muestras se liofilizaron y posteriormente se procedió a la extracción de ADN microbiano con el kit QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, UK). Tras la extracción se amplificó un fragmento de ADN ribosómico (fracción 16S) mediante PCR empleando cebadores específicos y universales para bacterias, uno de ellos marcado con fluorescencia en el extremo 5' (FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; CTTGTACACACCGCCCGT). Seguidamente el producto resultante de la PCR se purificó con el Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). A continuación se cuantificó el DNA y de cada muestra se tomaron 100 ng que fueron sometidos a una digestión a 37°C durante 12h con la enzima de restricción HhaI. El ADN se precipitó con etanol y posteriormente se resuspendió en $10 \mu\text{L}$ de Tween20 al 0.1% conteniendo un patrón de tamaño de fragmentos de entre 60 y 400 pb marcado con otro fluoróforo diferente (ET-ROX). Los fragmentos resultantes de esta digestión se analizaron en un secuenciador de capilares Megabace 500 (GE Healthcare) con un voltaje de 10 kV durante 70 min. Por último, la matriz de datos con la presencia o ausencia (1 y 0, respectivamente) de picos para

cada muestra (programa Gene Marker) se sometió a un análisis de componentes principales (PCA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El PCA de la matriz de datos con la presencia o ausencia (1 y 0, respectivamente) de los picos detectados en cada muestra (Figura 1) permitió diferenciar claramente los corderos que habían consumido el pienso control (**C**, grupo CONTROL sin naringina) de aquéllos que habían recibido pienso con naringina (**N**, grupo NAR con naringina). De hecho, el PC2 permitió clasificar correctamente el 85% de las muestras en dos clusters diferentes (Figura 1). Estos resultados evidencian variaciones en la diversidad de las comunidades bacterianas de los corderos que consumen naringina con respecto a aquéllos que no lo hacen. Esto resulta lógico, ya que diferentes estudios han constatado la capacidad antimicrobiana de los flavonoides (Wu et al., 2009). Además, los microorganismos ruminales son capaces de metabolizar la naringina (Gladine et al., 2007). De hecho, parece indispensable que esta flavanona glicosilada sea hidrolizada y liberada de su fracción glicosídica a nivel ruminal para que su aglicona (naringenina) sea finalmente absorbida por los animales. Una vez absorbida, la naringenina puede encontrarse en el plasma conjugada en forma de glucurónidos o sulfatos (Gladine et al., 2007), todo ello debido a la hidrólisis de la naringina que los microorganismos ruminales ejercen previamente a ese nivel.

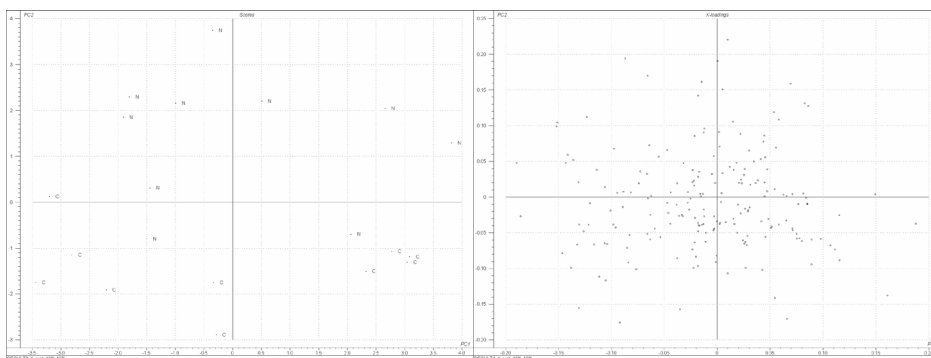


Figura 1. Discriminación obtenida mediante PCA de la matriz de datos con presencia (1) y ausencia (0) de los picos detectados con T-RFLP. (N: grupo Naringina y C: grupo Control).

Figura 2. Cargas que cada una de las variables (picos) tiene en el cálculo de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2).

El hecho de no conseguir clasificar correctamente el total de muestras se puede atribuir, en parte, a la gran variabilidad individual que presentan los animales empleados en estudios in vivo con respecto a las comunidades bacterianas ruminales.

Además, esta elevada variación individual también pudo ser la causante de la imposibilidad de identificar los picos responsables de la discriminación de las muestras (Figura 2). Esto impidió utilizar el programa tap-trFLP del software Ribosomal Data Project (RDP) para hacer una asignación teórica de las especies o géneros bacterianos determinantes en la discriminación de las muestras.

En resumen, la utilización de T-RFLP permite detectar los cambios que se producen en las comunidades bacterianas del rumen de corderos en cebo como consecuencia de la adición de flavonoides al pienso. No obstante, parece necesario realizar pruebas in vitro con un único inóculo de partida con el fin de reducir la variabilidad individual entre tratamientos. De este modo, podría ser posible identificar los fragmentos (pb) que realmente permiten esta discriminación así como los grupos bacterianos compatibles con ellos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gladine, C., Rock, E., Morand, C., Bauchart, D., Durand, D. 2007. *British Journal of Nutrition* 98: 691–701.
- Fisher, A.D., Crowe, M.A., Prendiville, D.J., Enright, W.J. 1997. *Animal Science* 64: 53-62.
- Kim, H.J., OH, G.T., Park, Y.B., Lee, M.K., Seo, H.J., Choi, M.S. 2004. *Life Sciences* 74: 1621-1634.
- Kim, S.Y., Kim, H.J., Lee, M.K., Jeon, S.M., Do, G.M., Kwon, E.Y., Cho, Y.Y., Kim, D.J., Jeon, K.S., Park, Y.B., Ha, T.Y., Choi, M.S. 2006. *Journal of Medicinal Food* 9: 582-586.
- Wu, V.C.H., Qiu, X., de los Reyes, B.G., Lin, C.-S., Pan, Y. 2009. *Food Microbiology* 26: 32-38.
- Ribosomal Data Project [Online: <http://rdp8.cme.msu.edu/html/TAP-trflp.html>]

Agradecimientos: Empresa Destilaciones Bordás Chunchurreta S.A.

APPLICATION OF TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP) TO STUDY THE EFFECT OF A DIET WITH POLYPHENOL SUPPLEMENTATION ON RUMINAL BACTERIAL COMMUNITY IN LAMBS

ABSTRACT: Twenty Assaf lambs (initial age 13-15 weeks) were used in this experiment. After random stratification on the basis of body weight (average BW, 24.8 ± 1.64 kg), lambs were allocated to two groups (ten lambs per group). Then, animals were housed individually. After 7 days of adaptation to the basal diet (barley straw and basal concentrate feed), during 8 weeks all the lambs were fed barley straw and the concentrate alone (CONTROL group), or enriched with 0.15% of naringin [1.5 g kg^{-1} DM (NAR group)]. When slaughtered, samples of ruminal content were collected to perform the T-RFLP analysis.

Principal component analysis (PCA) performed on matrix data showing the presence (1) or absence (0) of terminal restriction fragments peaks in ruminal content revealed two clusters corresponding to the lambs having consumed naringin or the control feedstuff, with 85% samples suitably classified. These results highlight variations in the ruminal bacterial community of lambs caused by the naringin consumption. The antimicrobial properties reported on flavonoids might be partially responsible for this circumstance.

Keywords: flavonoids, T-RFLP, lambs, ruminal bacteria, 16S rRNA, PCA