

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITES VEGETALES AL SUSTRATO DE FERMENTACIÓN SOBRE LAS COMUNIDADES DE BACTERIAS RUMINALES EN CULTIVOS CONTINUOS (RUSITEC)

Vargas^{1,2}, J.E., Andrés¹, S., Yáñez Ruiz³, D.R., López^{1*}, S.

¹ Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), 24346 León.

* s.lopez@unileon.es. ² Universidad de Caldas, Colombia.

³ Estación Experimental del Zaidín (CSIC), 18008 Granada

INTRODUCCIÓN

La inclusión de aceites en los piensos destinados a rumiantes puede incrementar el contenido de ácido linoleico conjugado en la carne y de la leche. Por esta razón, la adición de aceites en la ración de los rumiantes se está valorando como estrategia para incrementar la calidad del producto final que llega al consumidor. No obstante, el efecto inhibitorio que los lípidos tienen sobre la comunidad microbiana del rumen y sobre su actividad fermentativa ha de ser evaluado convenientemente antes de ofrecer ningún tipo de recomendación al sector productivo. En este sentido, las técnicas de biología molecular permiten investigar los cambios que se producen en las comunidades microbianas del rumen en respuesta a diversos factores de variación.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la adición de varios aceites de origen vegetal (oliva, girasol y lino) al pienso sobre la diversidad de la comunidad bacteriana ruminal en fermentadores continuos (Rusitec), utilizando la técnica T-RFLP.

MATERIAL Y MÉTODOS

El pienso utilizado fue una mezcla *unifeed* compuesta por maíz (25%), cebada (15%), soja (20%), alfalfa deshidratada (20%), pulpa de remolacha (9%), melaza (6%), bicarbonato (1,5%) y corrector (3,5%). Los tratamientos consistieron en distintos tipos de aceite vegetal añadidos al 6% al pienso control (pienso sin aceite, **C**), que fueron los siguientes; oliva (**C** + aceite de oliva, **O**), girasol (**C** + aceite de girasol, **G**) y lino (**C** + aceite de lino, **L**). El experimento se realizó con 16 vasijas de fermentación Rusitec (4 vasijas por tratamiento) y tuvo una duración total de 3 semanas (Carro et al., 1999). El último día de la prueba se tomó una muestra compuesta por 1,5 g (materia fresca) del residuo de la bolsa incubada durante 48h, 1,5 g del residuo de la bolsa incubada 24h y 30 ml de sobrenadante de cada vasija. Estas tres fracciones se mezclaron y la muestra resultante se consideró representativa de la digesta y se destinó a la extracción de DNA 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 (fluorocromo carboxifluoresceína 6, FAM) 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 Hha I. El ADN se precipitó con etanol y posteriormente se resuspendió en 10 μ L de Tween20 al 0.1% que contenía un patrón de tamaño de fragmentos de entre 60 y 400 pb marcado con el fluoróforo 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, para cada muestra se calculó la altura relativa de los picos obtenidos con el programa GeneMarker[®] y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir de estos valores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El PCA de la matriz de datos con las alturas relativas de los picos detectados en cada muestra evidenció claras diferencias en las comunidades bacterianas de las vasijas control

(pienso sin aceite) con respecto a aquéllas que contenían pienso con aceites (Figura 1). Además, la información obtenida mediante T-RFLP permitió clasificar en *clusters* diferentes las muestras tratadas con distintos tipos de aceite (Figura 1). No obstante, pequeñas variaciones en las condiciones de cada uno de los dos fermentadores Rusitec empleados en este estudio (8 vasijas por Rusitec con 2 vasijas por tratamiento en cada uno de ellos) pudieron ocasionar diferencias más importantes en las comunidades bacterianas que las debidas al tipo de aceite añadido, lo que explicaría que en la Figura 1 se observen dos *clusters* diferentes para cada tipo de aceite.

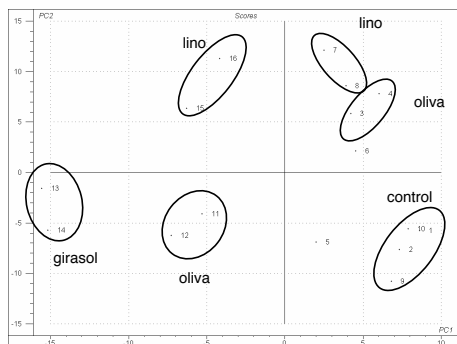


Figura 1. Discriminación obtenida mediante PCA de las alturas relativas de los picos de T-RFLP

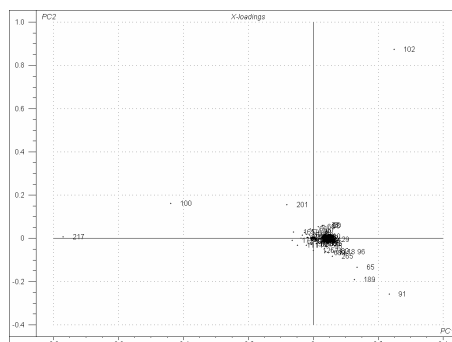


Figura 2. Fragmentos (pb) cuya altura relativa posibilita la discriminación entre muestras de la Figura 1

En todo caso, el PCA no solo permite realizar una discriminación adecuada de las muestras en función de las alturas relativas de los picos detectados mediante T-RFLP (Figura 1), sino que, además, facilita la identificación de los picos que, con mayor probabilidad, determinan dicha discriminación. La Figura 2 ilustra la importancia relativa que cada una de las variables (altura relativa de los picos) tiene en el cálculo de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2). Por tanto, las variables (picos) más excéntricas serán aquéllas que resultan más determinantes en la discriminación de las muestras mediante PCA, mientras que aquéllas próximas al centro pueden ser consideradas como menos relevantes.

Por otra parte, la herramienta tap-tRFLP del software Ribosomal Data Project (RDP) permite realizar una asignación teórica de la especie o género bacteriano a cada uno de estos picos (Castillo et al., 2007) que resultan determinantes en la discriminación de las muestras (Figura 2). Esto es posible gracias a las secuencias introducidas en esta base de datos por otros autores. En nuestro caso, los fragmentos (pb) identificados en la Figura 2 como determinantes en la discriminación de las muestras permitieron identificar algunas bacterias ruminales compatibles a partir del programa RDP (Tabla 1). Gracias a esta información es posible sugerir que algunas bacterias de los géneros *Prevotella* y *Ruminobacter* podrían resultar favorecidas con la adición de aceites al pienso, dado que la altura relativa de los fragmentos correspondientes a estos géneros aumenta en las muestras tratadas con aceites con respecto a las del pienso control (sin aceite). Este hecho parece ser especialmente destacable en el caso de *Ruminobacter*, ya que el fragmento compatible con este género (217 pb) ni siquiera pudo ser detectado en las muestras control (Tabla 1).

Por el contrario, otros géneros que han sido relacionados con la hidrogenación de los ácidos grasos y, por tanto, con el metabolismo lipídico a nivel ruminal, como son *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio* (Paillard et al., 2007), parecen más sensibles a la adición de aceites al pienso. Así parece constatarlo el hecho de que la altura relativa media del pico compatible con estos géneros (189 pb) se reduzca a la mitad en las muestras tratadas con aceite con respecto a las del pienso control.

Tabla 1. Bacterias ruminales compatibles según Ribosomal Data Project (RDP) con los fragmentos (pb) que en el presente estudio han facilitado la discriminación de muestras con o sin aceites añadidos

Grupo	Bacterias ruminales compatibles	^a Tamaño de fragmento <i>in silico</i> (pb)	^b Tamaño de fragmento real (pb)	^c Frecuencia	
				Control	Aceites
Bacteroidales	Bacteroidales	91-93	91	4 (7,9)	11 (2,9)
Bacteroidales	Bacteroidales	100	100	4 (5,0)	12 (11,7)
Bacteroidales	Prevotella	102	102	4 (22,7)	12 (28,1)
Clostridiales	Roseburia, Ruminococcus, Butyrivibrio, Pseudobutyrvibrio	189-190	189	4 (6,6)	11 (3,0)
Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiales	201	201	2 (0,6)	12 (2,0)
Proteobacteria	Ruminobacter	217	217	0	10 (8,1)

^a Tamaño de fragmento *in silico* obtenido con la herramienta tap-trFLP del RDP y Hha I;

^b Tamaño de fragmento en nuestras muestras tras la digestión del producto de la PCR con Hha I;

^c Número de muestras que contienen el pico. La altura relativa media (%) de cada pico en las muestras se encuentra entre paréntesis.

En resumen, la utilización de T-RFLP permite evidenciar los cambios que se producen en las comunidades bacterianas del rumen en fermentadores continuos (Rusitec) como consecuencia de la adición de aceites de origen vegetal al pienso. Además, la combinación de T-RFLP con el análisis de la altura relativa de los picos obtenidos mediante PCA permite identificar aquellos fragmentos (pb) que realmente posibilitan esa discriminación y los grupos bacterianos compatibles con ellos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G., Gasa, J., 2007. *Vet. Microbiol.*, 124, 239–247.
- Carro, M.D., López, S., Valdés, C., Ovejero, F.J., 1999. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 79, 279-288.
- Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L., Walker, N., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N., Kopečný, J., Vercoe, P., Louis, P., Wallace, R.J., 2007. *Antonie Leeuwenhoek*, 91, 417-422.
- Ribosomal Data Project [on line: <http://rdp8.cme.msu.edu/html/TAP-trflp.html>]

Agradecimientos: Investigación financiada por la CICYT AGL2005-04760-C02-02 y la Junta de Castilla y León (GR158 y LE007A07)

EFFECTS OF THE ADDITION OF VEGETABLE OILS TO FEED ON RUMEN BACTERIA COMMUNITIES IN CONTINUOUS CULTURES (RUSITEC)

ABSTRACT: The objective of this work was to investigate the effects of the addition of vegetable oils to the feed on ruminal bacteria communities in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. Rusitec vessels were fed a total mixed ration, without oil supplement (control) or with the addition of one vegetable oil (olive, sunflower or linseed oils). Fermentation was maintained in the cultures for three weeks, samples of digesta were collected and bacterial DNA was extracted for studies of microbial diversity using the T-RFLP method. Experimental treatments were significantly clustered from the T-RFLP profiles, so that unsupplemented cultures were clearly differentiated. Using fragment size libraries for a most probable identification of peaks recorded differences between control and supplemented cultures could be established. It was concluded that oil supplementation had a significant and selective effect on ruminal bacteria communities.

Key words: rumen bacteria, rumen fermentation, vegetable oil, T-RFLP, Rusitec