

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD INDIVIDUAL EN LAS CONCENTRACIONES DE DISTINTAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL RUMEN DE CAPRINO

Yáñez-Ruiz D.R.¹, Soto E.C.¹, Newbold C.J.², Molina-Alcaide E.¹

¹ Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España. Email: david.yanez@eez.csic.es.

² Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences (IBERS), Aberystwyth University, Llanbadarn Campus, SY23 3AL, Aberystwyth, Reino Unido.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas de biología molecular como la PCR a tiempo real (qPCR) está permitiendo la cuantificación, con gran precisión, de comunidades microbianas del rumen (bacterias, protozoos o arqueas metanogénicas), y de especies de interés por su implicación en distintos procesos metabólicos. Algunos resultados publicados recientemente en este campo apuntan una elevada variabilidad en las concentraciones de distintos grupos microbianos ruminales entre animales y, dentro de un mismo animal, a lo largo del día (Swain et al., 1996; Belenguer et al., 2009) o entre días de muestreo. Esto representa una dificultad para diseñar la pauta de muestreo, el análisis estadístico y la interpretación de los resultados en estudios que relacionen las comunidades microbianas presentes en el rumen y el comportamiento digestivo del animal.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la variación entre animales de un mismo rebaño alimentados con una dieta estándar en cuanto a la evolución diaria en la concentración ruminal de los grupos microbianos mayoritarios y de dos especies de bacterias implicadas en la degradación de fibra (*Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*).

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento consistió en 3 períodos, cada uno de los cuales se llevó a cabo con 3 cabras de raza granadina adultas ($54,2 \pm 7,65$ kg peso vivo), secas y canuladas en rumen. Los animales se alimentaron durante 1 mes a nivel de mantenimiento energético con heno de alfalfa de buena calidad, servido dos veces al día antes del inicio del primer periodo experimental. Los animales se mantuvieron dentro del establo, en cubículos individuales y sin contacto entre ellos. En el período I se recogieron muestras (100 g) de contenido ruminal de cada animal a las 0, 2 y 4 horas tras el suministro de alimento de la mañana durante dos días (d1 y d2) con una semana de diferencia entre ambos. Las muestras se pesaron y fueron inmediatamente congeladas, liofilizadas y conservadas a -20°C hasta la extracción de ADN. Al comienzo del período II, se obtuvo 1 litro de contenido ruminal de cada uno de los animales en un termo precalentado a 39°C antes del primer suministro de alimento. A continuación, se transfirió el del animal 1 al 2, el del 2 al 3 y el del 3 al 1. Dos (d3) y quince días (d4) después se recogió contenido ruminal de cada animal a las mismas horas y siguiendo el mismo proceso descrito en el período I. En el período III se transfirió 1 litro del contenido ruminal del animal 1 al 3, del 3 al 2 y del 2 al 1 procediéndose de igual manera que en el período II. Tras la liofilización, las muestras se sometieron a agitación mecánica (Mini Bead Beater™) y el ADN se extrajo con el kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, UK). En los extractos de ADN se cuantificó, mediante qPCR (iCycler, IQ5, BioRad) y empleando sondas específicas, la concentración de bacterias totales (Maeda et al., 2003), protozoos totales (Sylvester et al., 2005), arqueas metanogénicas totales (Denman et al., 2007), *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* (Denman y McSweeney, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los animales mantuvieron un nivel de ingesta y peso constantes. La evolución de la concentración de los distintos grupos microbianos durante el período I no respondía a un patrón definido, lo que puede deberse a diversos factores: el análisis se realizó con

contenido ruminal completo y no líquido, la dieta estaba constituida solo por forraje y suministrada a nivel de mantenimiento y, sólo se recogieron muestras hasta 4 horas después del suministro del alimento. Los coeficientes de variación (CV) de las concentraciones de los distintos grupos microbianos (Tabla 1) durante el Periodo I y a las 0 horas eran, generalmente, superiores a los obtenidos a las 2 y 4 horas tras el suministro de alimento. Ello sugiere que las muestras recogidas antes de la ingestión de alimento reflejan la biomasa microbiana propia de cada animal y que, la variabilidad animal se diluye por efecto de la ingestión del alimento (Dehority, 2003). En el Periodo I, los grupos microbianos mayoritarios analizados mostraron una variación media entre animales del 20 % (1-32 en bacterias, 7-58 en protozoos y 5-28 en arqueas metanogénicas). La variabilidad entre animales de las concentraciones de *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* resultó notablemente superior (66-172 y 46-62 %, respectivamente).

La variabilidad en un mismo animal (datos no mostrados) era similar a observada entre animales para las poblaciones mayoritarias pero muy inferior para las especies bacterianas estudiadas (Swain et al., 1996). Sin embargo, cada animal parece albergar concentraciones muy distintas de algunas especies, como muestra la Figura 1, en la que se puede observar que en el Periodo I, tanto en el día 1 como en el 2, existe un patrón fijo de concentraciones de *R. flavefaciens* (animal 1>2>3). En los períodos II y III, en los que se realizó un trasvase de contenido ruminal, la variación entre animales de las concentraciones de *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* disminuyó notablemente a niveles similares observados en los grupos mayoritarios, especialmente en el muestreo del día 1.

Nuestros resultados muestran que las concentraciones ruminales de los grupos mayoritarios de microorganismos en animales de un mismo rebaño, alimentados con forraje a nivel de mantenimiento, son muy similares. Sin embargo, existe una alta variabilidad individual en determinadas especies bacterianas, que podría explicar diferencias individuales en la capacidad o respuesta digestiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer A., Hervás G., Doce R.R., Yáñez-Ruiz D.R., Santos N., Mantecón A.R. & Frutos P. 2009. *XII Jornadas sobre producción Animal, AIDA* • Dehority B.A. 2003. Nottingham University Press • Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS. 2007. *FEMS Microbiol Ecol.* 62: 313-22. • Denman SE, McSweeney CS. 2006. *FEMS Microbiol Ecol.* 58: 572-82. • Maeda H., Koikeguchi S., Arai, H., Tanimoto I., Nishimura, F. & Takashiba S. 2003 *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 39: 81-86. • Swain RA, Nolan JV & Klieve AV. 1996. *Appl Environmental Microbiol.* 62: 994-997 • Sylvester JT, Karnati SK, Yu Z, Newbold CJ & Firkins JL. 2005. *J Dairy Sci.* 88: 2083-2095.

Tabla 1. Coeficientes de variación (%) medios de las concentraciones (n° copias gen/g materia fresca) de bacterias (BT), protozoos (PT) y metanogénicas (MET) totales, *R. flavefaciens* (Rf) y *F. succinogenes* (Fs) en el contenido ruminal de caprino alimentado con heno de alfalfa.

| | | | BT | PT | MET | Rf | Fs |
|-------------|----|-----|------|------|------|------|------|
| Periodo I | d1 | 0 h | 33,2 | 35,8 | 27,8 | 172 | 62,8 |
| | | 2 h | 11,5 | 7,21 | 6,55 | 105 | 59,5 |
| | | 4 h | 18,6 | 57,9 | 16,2 | 90,0 | 45,4 |
| | d2 | 0 h | 31,7 | 25,3 | 15,3 | 93,5 | 52,2 |
| | | 2 h | 1,60 | 15,8 | 18,3 | 66,0 | 43,5 |
| | | 4 h | 24,6 | 19,2 | 5,0 | 99,5 | 46,3 |
| Periodo II | d3 | 2 h | 2,52 | 19,5 | 13,6 | 34,2 | 11,3 |
| | d4 | 2 h | 32,8 | 30,0 | 40,4 | 51,3 | 30,1 |
| Periodo III | d5 | 2 h | 36,0 | 48,5 | 13,3 | 41,5 | 12,4 |
| | d6 | 2 h | 8,44 | 15,2 | 45,9 | 63,3 | 57,2 |

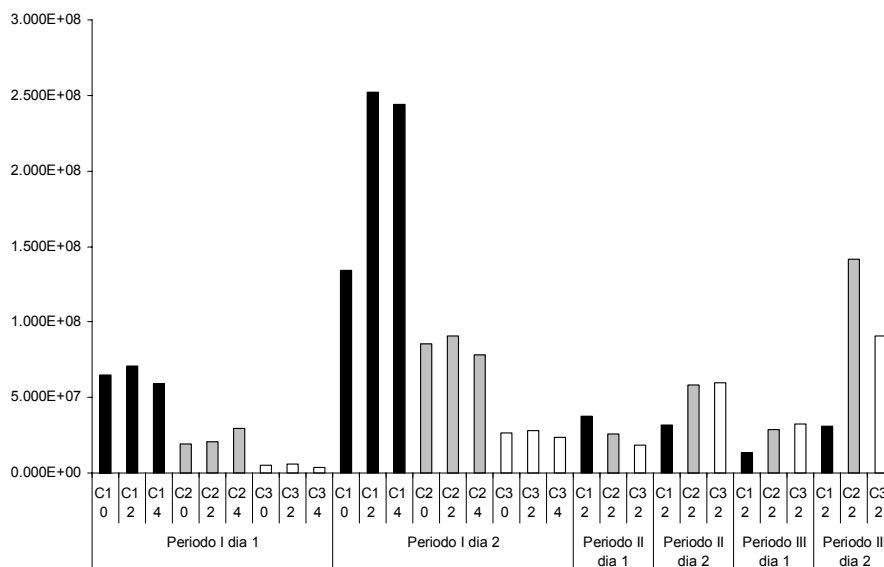


Figura 1. Concentración de *Ruminococcus flavefaciens* (copias gen 16s/g MF) en el contenido ruminal de caprino alimentado con heno de alfalfa (Cabra 1: C1; Cabra 2: C2; Cabra 3: C3) a las 0, 2 y 4 horas tras la administración del alimento.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del programa Marie Curie de la Comisión Europea (ERG-224816-METANORUMEN).

STUDY OF THE ANIMAL VARIABILITY ON THE NUMBERS OF DIFFERENT MICROBIAL GROUPS IN THE GOATS' RUMEN

ABSTRACT. The use of classical culture and, more recently, modern molecular techniques such as real-time PCR to quantify microbial groups in the rumen show a high animal to animal variability and, sometimes, a contradictory diurnal variation pattern. This work aimed to study the animal variation in the numbers of some microbial groups in the rumen within an established flock. In a first period (I), three adult goats cannulated in the rumen were fed alfalfa hay and samples of rumen contents collected at 0, 2 and 4 hours after the morning feeding in two non consecutive days. In two following periods (II and III) rumen contents was transferred between animals to evaluate the consistency of the differences between animals observed in Period I. The concentration of total bacteria, methanogenic archaea, protozoa, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* were determined by real time PCR. The animal to animal variability was higher before than after the morning feeding and lower with regards to bacteria, protozoa and archaea than to *F succinogenes* and *R flavefaciens*. The high variability in these two bacterial species was reduced after the rumen contents were exchanged between animals.

Keywords: animal variability, alfalfa hay, molecular techniques, rumen, qPCR.