

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PIROSECUENCIACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN EN OVEJAS ALIMENTADAS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON MICROALGAS MARINAS

Castro-Carrera^{1,2}, T., Toral¹, P. G., Hervás¹, G., McEwan², N. R., Abecia³, L., Frutos¹, P., Girdwood², S. E., Worgan², H. J. y Belenguer^{1*}, A.

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España

²IBERS, Aberystwyth University, Aberystwyth SY23 3DA, Reino Unido

³Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1. 18008 Granada, España

*Correo electrónico: a.belenguer@csic.es

INTRODUCCIÓN

Se sabe que la adición a la dieta de fuentes lipídicas de origen marino, como las microalgas, altera la microbiota ruminal (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012) y en consecuencia el metabolismo de los ácidos grasos insaturados (AGI) en el rumen. Las bacterias son los principales microorganismos responsables de la biohidrogenación ruminal (Lourenço et al., 2010) pero, aunque existen diversos trabajos basados en la aplicación de técnicas moleculares (mediante el análisis del gen del ARNr 16S), persiste un gran desconocimiento sobre los microorganismos concretos implicados en dicho proceso (Huws et al., 2011). Esto es especialmente acusado en ovino, donde hay pocos estudios (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012) y no se ha empleado una técnica de secuenciación de ADN de alto rendimiento, como la pirosecuenciación (Dowd et al., 2008).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar, mediante análisis de secuenciación masiva (pirosecuenciación), el efecto de la inclusión de microalgas marinas en la dieta sobre la comunidad bacteriana del rumen en ovejas lecheras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este experimento se utilizaron 11 ovejas adultas de raza assaf en lactación, que fueron distribuidas en dos grupos (de 6 y 5 animales), y asignadas a 2 tratamientos experimentales (dietas). Todas las ovejas recibieron ad libitum una dieta mixta completa (relación forraje:concentrado 40:60) que contenía 25 g de aceite de girasol/kg MS y que estaba suplementada con 0 (control, C) o con 8 (MA) g de microalgas marinas (MA; Market Biosciences Corp., EE. UU.)/kg MS. Tras un periodo de adaptación de 20 días, los animales del grupo control continuaron con la misma dieta (C) durante los siguientes 54 días, mientras que al resto se les ofertó la dieta MA. Al final del experimento, tras el sacrificio de las ovejas, se tomaron muestras de la digesta ruminal, que se almacenaron a -80°C y posteriormente fueron liofilizadas.

El ADN microbiano se extrajo siguiendo el método descrito por Yu y Morrison (2004), con la modificación de una mayor temperatura (95°C) en la lisis celular. A partir de cada muestra de ADN genómico se amplificó un fragmento del gen del ARNr 16S bacteriano mediante PCR, utilizando cebadores bacterianos universales (27f y 357r) etiquetados con identificadores "multiplex". Los amplicones fueron normalizados, mezclados y secuenciados en un pirosecuenciador Roche 454 GS FLX Titanium (Roche, Brandford, EE. UU.), analizándose las secuencias mediante el programa informático QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; Caporaso et al., 2010). Las unidades taxonómicas operacionales (OTU) fueron asignadas al 97% de similitud. La matriz de proporciones de las OTU se utilizó para construir un dendrograma, utilizando el método Ward's y las distancias Bray-Curtis, mediante el programa R (www.r-project.org). Los porcentajes de cada OTU fueron transformados (\log_{10}) y sometidos a análisis de varianza con el procedimiento MIXED del SAS (SAS Institute Inc., EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis jerárquico de la matriz obtenida a partir de los porcentajes de cada OTU, identificadas a nivel de género, muestra una separación de la estructura de las comunidades bacterianas en función de la dieta (Figura 1), ya que la mayor parte de las muestras de los animales que recibieron la dieta C se agrupan conjuntamente y de forma separada a las de las ovejas alimentadas con la dieta MA. Este efecto coincide con el observado en experimentos previos mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos

terminales de restricción (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012).

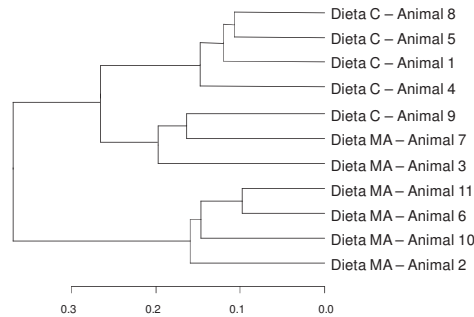


Figura 1. Dendrograma construido utilizando el método Ward's y las distancias Bray-Curtis a partir de los datos de pirosecuenciación del ADN microbiano de la digesta ruminal de ovejas lecheras alimentadas con una dieta suplementada (MA) o no (C) con microalgas marinas.

La técnica de pirosecuenciación proporciona información taxonómica de un elevado número de OTU (Dowd et al., 2008). En este caso, su utilización permitió obtener 57379 secuencias (de media, 5216 por muestra) y realizar asignaciones taxonómicas a nivel de género, así como establecer a qué grupos bacterianos afectaron los tratamientos experimentales. Las abundancias de algunas poblaciones relevantes se presentan en la Tabla 1. Las bacterias del filo *Bacteroidetes*, uno de los grupos mayoritarios en el rumen, fueron claramente dominantes (69%), seguidas por *Firmicutes* (21-26%) y *Proteobacteria* (1-6%). Además, la abundancia de este último grupo aumentó de forma significativa con la dieta MA ($P < 0,01$), lo que se debió a variaciones en especies de la familia *Succinivibrionaceae*. Esto podría indicar que estos microorganismos no son inhibidos por los AGI de cadena larga de las microalgas, o que están implicados en su metabolismo, ya que se ha sugerido que *Succinivibrio dextrinosolvens* podría ser capaz de biohidrogenar (Tokoyama y Davis, 1970).

Tabla 1. Abundancias de diferentes poblaciones bacterianas (datos expresados como \log_{10} del % de todas las secuencias del ARNr 16S - valores no transformados entre paréntesis) en muestras de ADN microbiano de la digesta ruminal de ovejas lecheras alimentadas con una dieta suplementada (MA) o no (C) con microalgas marinas.

Taxonomía	C	MA	EED	P
<i>Bacteroidetes</i>	1,84 (69,2)	1,83 (68,8)	0,032	NS
<i>Bacteroidales (no clasificadas)</i>	0,93 (8,55)	0,70 (5,35)	0,082	*
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,41 (2,66)	-0,19 (0,71)	0,109	***
<i>Prevotellaceae</i>	1,69 (49,3)	1,72 (53,0)	0,039	NS
<i>Prevotella</i>	1,69 (49,3)	1,72 (53,0)	0,039	NS
<i>Firmicutes</i>	1,41 (25,9)	1,32 (21,8)	0,058	NS
<i>Lachnospiraceae</i>	1,02 (10,6)	0,98 (9,9)	0,055	NS
Other	0,70 (5,07)	0,59 (4,50)	0,121	NS
<i>Butyrivibrio</i>	0,41 (2,72)	0,43 (2,74)	0,077	NS
<i>Ruminococcaceae</i>	0,78 (6,24)	0,54 (3,92)	0,108	t
Other	0,34 (2,32)	0,04 (1,26)	0,129	*
<i>Proteobacteria</i>	-0,08 (1,07)	0,68 (6,02)	0,215	**
<i>Succinivibrionaceae</i>	-0,30 (0,76)	0,63 (5,71)	0,258	**

EED, error estándar de la diferencia; P, nivel de significación del efecto de la dieta. NS=no significativo; t= $P < 0,10$; *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$.

Dentro de *Bacteroidetes*, el género *Prevotella* presentó una abundancia muy elevada (49-53%), aunque no varió. En este filo se observaron descensos debido a la inclusión de MA en la dieta en grupos de la familia *Porphyromonadaceae* ($P < 0,001$) y en especies no clasificadas del orden *Bacteroidales* ($P < 0,05$). Algunas de estas especies podrían estar

implicadas en el último paso de la biohidrogenación (i.e., en la formación de ácido esteárico; Huws et al., 2011), el cual suele ser inhibido por los lípidos de origen marino. También podrían estar relacionadas con esta ruta metabólica bacterias de la familia *Ruminococcaceae* (Huws et al., 2011), cuya proporción también disminuyó con la presencia de MA. Las principales bacterias cultivadas capaces de metabolizar los AGI pertenecen a la familia *Lachnospiraceae* (Lourenço et al., 2010) y entre ellas se encuentran especies del género *Butyrivibrio*, aunque estas no se vieron afectadas por el tratamiento ($P > 0,10$). En resumen, la adición de MA a una dieta suplementada con aceite de girasol alteró, tal como se esperaba, la estructura y composición de la comunidad bacteriana. A diferencia de estudios previos con otras técnicas moleculares, la pirosecuenciación permitió detectar todos los componentes de la comunidad bacteriana e identificar aquellas poblaciones afectadas por las MA. Entre estas, y coincidiendo con estudios previos, parecen estar algunas poblaciones implicadas en la biohidrogenación ruminal (*Bacteroidales*, *Porphyromonadaceae*, *Ruminococcaceae*) y otras que podrían estarlo (*Proteobacteria*). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la microbiología del metabolismo lipídico en el rumen es mucho más compleja de lo que sugerían los primeros estudios al respecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P. & Hervás, G. 2010. *J. Dairy Sci.* 93: 3275-3286. ● Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenkov, T., Zaneveld, J. & Knight, R. 2010. *Nat. Methods* 7: 335-336. ● Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeethan, T., Hagevoort, R. G. & Edrington, T. S. 2008. *BMC Microbiol.* 8: 125-133. ● Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J. & Scollan, N. D. 2011. *Environ. Microbiol.* 13: 1500-1512. ● Lourenço, M., Ramos-Morales, E. & Wallace, R. J. 2010. *Animal* 4: 1024-1036. ● Tokoyama, M. T. & Davis, C. L. 1970. *Fed. Proc.* 29: A691. ● Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V. & Frutos, P. 2012. *J. Dairy Sci.* 95: 794-806. ● Yu, Z. & Morrison, M. 2004. *BioTechniques* 36: 808-812. ●

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

PYROSEQUENCING STUDY OF THE RUMEN BACTERIAL COMMUNITY IN SHEEP FED DIETS SUPPLEMENTED WITH MARINE ALGAE

ABSTRACT: Eleven assaf ewes in lactation were divided in two groups and used to examine, using the pyrosequencing technique, the effect of the dietary inclusion of marine algae (MA) on the structure and composition of the rumen bacterial community. Animals received a total mixed ration based on alfalfa hay and a concentrate (F:C 40:60), supplemented with 25 g of sunflower oil/kg dry matter (DM) plus 0 (Control) or 8 (MA) g of MA/kg DM. After 54 days on treatments, animals were slaughtered and rumen digesta were sampled for microbial analysis by 454 pyrosequencing. Addition of MA altered, as expected, the bacterial community structure and composition. In particular, decreases in the abundance of bacteria that have been previously suggested to be related to rumen biohydrogenation of unsaturated fatty acids (*Bacteroidales*, *Porphyromonadaceae* and *Ruminococcaceae*) were observed, whereas other species of the phylum *Proteobacteria*, particularly those of the family *Succinivibrionaceae*, some of which can potentially biohydrogenate, showed an increase. The use of pyrosequencing, a high throughput sequencing methodology, allowed to establish the taxonomy of the bacterial populations affected by the addition of MA to a diet supplemented with sunflower oil in sheep.

Keywords: lipid supplementation, molecular biology, rumen microbiota, sheep.