

COMPARACIÓN DE LA FERMENTACIÓN Y LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN EN VACAS Y CABRAS ALIMENTADAS CON LA MISMA DIETA

Belenguer^{1*}, A., Frutos¹, P., Bernard², L., Hervás¹, G., Chilliard², Y. y Toral², P. G.

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

²INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, Francia

*Correo electrónico: a.belenguer@csic.es

INTRODUCCIÓN

La ecología microbiana del rumen está determinada por numerosos factores, entre los que podría incluirse el genotipo del hospedador (McSweeney y Mackie, 2012). Sin embargo, las variaciones en la microbiota ruminal se han relacionado generalmente con diferencias funcionales derivadas de la adaptación evolutiva de las diversas especies de rumiantes (Hofmann, 1989) y, por lo tanto, con diferencias en la dieta consumida (Celaya et al., 2008). Aunque se han descrito desigualdades en el patrón de fermentación ruminal entre distintas especies de rumiantes, alimentados con la misma dieta (Liu et al., 2009), se desconocen aún las posibles variaciones en la estructura de sus comunidades bacterianas del rumen. Por ello, el objetivo de este trabajo fue examinar el patrón de fermentación y la estructura de la comunidad bacteriana ruminal de vacas y cabras, dos de las especies de rumiantes domésticos más comunes, cuando su alimentación es la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 vacas y 14 cabras en lactación, en un diseño de bloques incompletos equilibrados (BIBD) que incluyó 2 tratamientos experimentales (dietas) y 3 lotes dentro de cada especie (4 animales por grupo en el ganado vacuno, y dos grupos de 5 y uno de 4, en ganado caprino). Las dietas tenían heno de pradera como forraje (41%) y diferían en la composición del concentrado: una contenía maíz en grano como principal componente (dieta A) y la otra, más acidogénica, incluía trigo aplastado y aceite de girasol (dieta B; ver Tabla 1). Ambas se ofertaron ad libitum en dos periodos de 28 días. El día 25 de cada periodo, 4 h después de retirar los restos de alimento, todos los animales fueron intubados mediante sonda esofágica para obtener líquido ruminal. Una vez filtrado, se tomaron alícuotas que fueron congeladas inmediatamente a -80°C y posteriormente liofilizadas para el estudio de la comunidad bacteriana mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP). En el resto del líquido obtenido se midió el pH y se tomaron muestras para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco (n=52).

Las concentraciones de amoníaco y AGV se determinaron por colorimetría y cromatografía de gases, respectivamente, según se describe en Belenguer et al. (en prensa). Para el análisis microbiano, las alícuotas de líquido ruminal liofilizado se mezclaron por lote y periodo (n=12). La extracción de ADN microbiano y el análisis mediante T-RFLP se llevaron a cabo según describen Belenguer et al. (en prensa), utilizando tres enzimas de restricción (*HhaI*, *MspI* y *HaellI*) por separado. Los fragmentos terminales de restricción (T-RF) se analizaron en un secuenciador capilar automático Megabace 500 (Amersham Biosciences, Reino Unido), utilizando fragmentos de entre 60 y 900 pares de bases (pb) como patrones. El perfil de picos se obtuvo mediante el programa *GeneMarker* (Softgenetics, EE. UU.) y los datos fueron analizados con el programa R (www.r-project.org). Los parámetros de fermentación ruminal y de los porcentajes del área de los T-RF sobre el área total de picos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza, con el procedimiento MIXED del SAS (SAS Institute Inc., EE. UU.).

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (g/kg)	Heno de pradera	Maíz (grano)	Trigo (aplastado)	Alfalfa (pellets)	Torta de soja	Aceite de girasol	V/M ¹
Dieta A	410	321	0	173	85	0	7
Dieta B	410	222	222	0	85	50	7

¹ Complemento vitamínico-mineral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias significativas ni en el pH ruminal ni en la concentración total de AGV entre ambas especies ($P>0,10$; Tabla 2). Sin embargo, la concentración de amoníaco y la proporción molar de los AGV minoritarios fueron en todos los casos superiores en las cabras ($P<0,001$), lo que sugiere una mayor actividad proteolítica en el rumen de esta especie. El porcentaje de acetato fue superior en las vacas ($P<0,05$), mientras que en el caprino el propionato mostró una mayor proporción molar cuando los animales recibían la dieta B y el butirato cuando recibían la A (interacción $E \times D$, $P<0,05$).

Tabla 2. Parámetros de fermentación ruminal y frecuencias relativas sobre el área total de picos (%) de algunos T-RF de diferente longitud (pares de bases, pb), obtenidos a partir del análisis mediante T-RFLP del ADN extraído del fluido ruminal, en vacas y cabras en lactación recibiendo las dietas A o B.

	Dieta A		Dieta B		eed ¹	Prob. ²			
	Vacas	Cabras	Vacas	Cabras		E	D	E×D	
pH	7,10	7,13	7,28	7,29	0,060	ns	**	ns	
Amoniaco (mg/l)	70,6	146,5	34,1	74,9	9,19	***	***	t	
AGV totales (mmol/l)	66,8	50,1	50,8	42,5	8,06	ns	*	ns	
Acetato (%)	70,8	66,9	68,6	62,4	0,99	*	***	t	
Propionato (%)	14,6 ^c	15,0 ^c	19,0 ^b	22,8 ^a	0,85	ns	***	t	
Butirato (%)	11,1 ^a	12,5 ^a	7,9 ^b	7,7 ^b	0,47	ns	***	*	
AGV minoritarios (%) ³	3,5	5,5	4,5	7,1	0,28	***	***	ns	
Bacterias compatibles T-RF (pb)									
<i>Bacteroidetes</i>	102 <i>Hhal</i>	0,81 ^b	0,92 ^b	1,50 ^b	5,04 ^a	0,312	**	***	***
	570 <i>Hhal</i>	0,92	2,78	0,34	0,76	0,452	*	*	ns
	91 <i>Mspl</i>	2,69	5,27	3,63	2,27	0,815	ns	ns	t
	259 <i>Haelll</i>	3,61	2,64	1,99	1,40	0,154	**	***	ns
<i>Succinivibrionaceae</i>	221 <i>Hhal</i>	1,05 ^b	0,22 ^b	4,00 ^a	0,00 ^b	0,552	**	*	*
	492 <i>Mspl</i>	1,28	0,16	8,46	0,38	1,622	*	t	t
	202 <i>Haelll</i>	0,86	0,11	3,77	0,00	0,647	*	t	t

^{a, b, c} distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P<0,05$).

¹eed, error estándar de la diferencia.

²Prob., nivel de significación del efecto de la especie (E), dieta (D) o la interacción ($E \times D$).

ns=no significativo ($P>0,10$); t= $P<0,10$; *= $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$.

³Suma de isobutírico, valérico, isovalérico y caproico.

Las diferencias en la fermentación ruminal están seguramente relacionadas con la variación en la estructura de la comunidad bacteriana entre especies y dietas (Figura 1), aunque la dieta B indujo un mayor porcentaje de disimilitud entre vacuno y caprino que la dieta A (50,3 vs. 37,8%). Por su parte, en las cabras las diferencias entre dietas fueron superiores que en las vacas (con disimilitudes de 49,3 vs. 40,7%). También se detectaron diferencias en la frecuencia relativa de numerosos T-RF (Tabla 2), que dependieron en muchos casos de la dieta consumida. Además, se observaron efectos dispares en diversos T-RF (e.g., 102 y 570 pb con *Hhal*, 91 pb con *Mspl*, y 259 pb con *Haelll*) que pueden corresponder a distintas especies del filo *Bacteroidetes*, uno de los más abundantes en el rumen. Algunos microorganismos de este grupo, especialmente del género *Prevotella*, se han relacionado con la actividad proteolítica y la formación de propiónico en el rumen (Dehority, 2003), por lo que es destacable la mayor abundancia relativa detectada en cabras y con la enzima *Hhal* de los fragmentos de 102 pb con la dieta B y de 570 pb con la dieta A, ambos compatibles con distintas bacterias de la familia *Prevotellaceae*. Por otro lado, la presencia de aceite de girasol parece haber favorecido la proliferación de distintas poblaciones relacionadas con el metabolismo lipídico, tales como las ya mencionadas de la familia *Prevotellaceae* (Huws et al., 2011) en caprino, o especies de la familia *Succinivibrionaceae* (Tokoyama y Davis, 1970) en vacuno, compatibles con fragmentos que mostraron una mayor proporción relativa en esta última especie con la dieta B (221 pb con *Hhal*, 492 pb con *Mspl*, y 202 pb con *Haelll*). Nuestros resultados, por lo tanto, mostrarían no solo un efecto de la especie, de la dieta y de su interacción sobre el patrón de fermentación y la estructura de la comunidad bacteriana

ruminal, sino también, lo que parece más interesante, una importancia similar de los efectos de la especie hospedadora y de la dieta consumida.

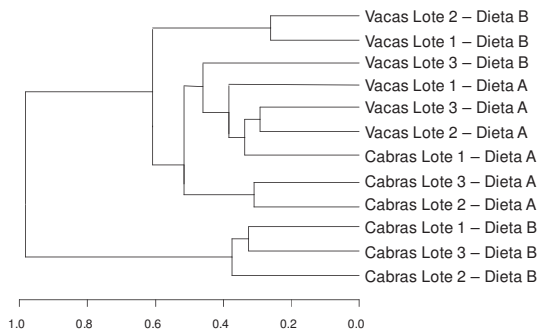


Figura 1. Dendrograma obtenido utilizando el método Ward´s y las distancias Bray-Curtis a partir del análisis mediante T-RFLP del ADN extraído del fluido ruminal de vacas y cabras en lactación recibiendo la dieta A o la dieta B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer, A., Ben Bati, M., Hervás, G., Toral, P. G., Yáñez-Ruiz, D. R. & Frutos, P. 2013. *Animal* (en prensa).
- Celaya, R., Benavides, R., García, U., Ferreira, L. M. M., Ferre, I., Martínez, A., Ortega-Mora, L. M. & Osoro K. 2008. *Animal* 2: 1818-1831.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology* (Ed Dehority B. A.) Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido
- Hofmann, R. R. 1989. *Oecologia* 78: 443-457.
- 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.
- Liu, Q., Dong, C. S., Li, H. Q., Yang, W. Z., Jiang, J. B., Gao, W. J., Peng, C. X. & Liang, Z. Q. 2009. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154: 151-159.
- McSweeney, C. & Mackie, R. 2012. Background Study Paper No. 61. Commission on Genetics Resources for Food and Agriculture, FAO.
- Tokoyama, M.T. & Davis, C.L. 1970. *Fed. Proc.* 29, A691.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proy. AGL2011-23700) y la UMR1213 (INRA, Francia). P. G. Toral disfruta de una beca posdoctoral de la Fundación Alfonso Martín Escudero.

COMPARISON OF THE RUMEN FERMENTATION AND BACTERIAL COMMUNITY IN COWS AND GOATS FED THE SAME DIET

ABSTRACT: Twelve cows and 14 goats were used to examine differences between species in the rumen fermentation pattern and bacterial community structure when animals received the same diet. The balanced incomplete block design included 3 groups per species and 2 treatments (diets), differing in the concentrate composition: with corn as the main component (A diet) or with wheat plus sunflower oil (B diet). After 25 days of each of 2 periods, rumen fluid was collected using a stomach tube for microbial studies and pH, ammonia and volatile fatty acid (VFA) analysis. Differences in rumen fermentation due to species, diets and their interaction were observed, with greater ammonia concentrations and molar proportions of minor VFA, and lower percentages of acetate, in goats. Proportions of propionate and butyrate were higher in goats on B and A diets, respectively. Several terminal restriction fragments (T-RF) also showed different relative frequencies due to species, diets and their interaction. Thus, some T-RF compatible with *Prevotellaceae* were more abundant in goats, whereas others that may correspond to *Succinivibrionaceae* were greater in cattle given B diet. According to the percentages of dissimilarity between bacterial communities, the rumen ecosystem was affected alike by the diet consumed and the ruminant species.

Keywords: bovine, caprine, bacterial species, T-RFLP.