

ESTUDIO DE LA POBLACION RUMINAL DE BACTERIAS Y HONGOS MEDIANTE TRFLP Y ARISA: EFECTO DEL NIVEL DE L PROTEINA Y TIPO DE CARBOHIDRATO

Belanche¹, A., Pinloche¹, E., Edwards¹, J.E., Moorby¹, J.M., Doreau², M. y Newbold¹ C.J.

¹IBERS, Aberystwyth University, SY23 3EB, UK.

²INRA, Herbivore Research Unit, 63122 Saint-Genès Champanelle, France. aib@aber.ac.uk

INTRODUCCIÓN

En los países desarrollados se ha optado por utilizar raciones con elevados niveles de proteína y suplementadas con carbohidratos fibrosos para maximizar la producción láctea y evitar un descenso en el contenido de grasa. Esta estrategia ocasiona una elevada excreción de N urinario que puede desencadenar problemas medioambientales. La reducción del nivel de proteína en la dieta puede ocasionar un desequilibrio ruminal entre la rápida degradación de N y la lenta fermentación de la fibra, aunque la suplementación con energía fácilmente fermentable podría solucionar dicho problema.

En el presente ensayo (ver material y métodos) se observó que una disminución severa del nivel de proteína bruta (del 14.4 al 10.5%) redujo a la mitad la excreción de N urinario e incrementó la eficiencia de utilización del N dietético (del 25 al 29%, Fanchone et al., 2011a), aunque también redujo ligeramente la producción de leche (-9.2%). Además, la sustitución de fibra por almidón incrementó el contenido proteico en la leche (+7.2%, Fanchone et al., 2011a). Curiosamente, estas dietas tan extremas no modificaron sustancialmente la síntesis microbiana ni su eficiencia de síntesis. Ello pone de manifiesto la gran adaptabilidad del ecosistema ruminal frente a las diferentes situaciones nutricionales e incita a indagar sobre el tipo de cambios microbiológicos que pueden explicar tan sorprendentes resultados.

Para comprender el funcionamiento ruminal es preciso estudiarlo como un ecosistema microbiano. Actualmente existen diversas técnicas moleculares que pueden ayudarnos a ello. El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de la subalimentación proteica y el tipo de carbohidrato sobre la población ruminal de bacterias y hongos anaerobios mediante TRFLP (polimorfismo en longitud del fragmento terminal de restricción) y ARISA (análisis automatizado del espacio intergénico ribosomal), respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro vacas Holstein a mitad de lactación y provistas de cánula ruminal (662±62 kg de peso vivo y 30.3±1.2 kg leche/d) fueron utilizadas siguiendo un modelo de cuadrado latino 4x4. Las 4 dietas iso-energéticas fueron elaboradas a base de heno/silo de hierba y concentrado (70:30 en MS) y proporcionando dos niveles de proteína (Alto; 110% vs. Bajo; 80% de los requerimientos en proteína degradable) y dos tipos de carbohidratos (ratio FND/almidón 2.85 vs. 1.31). Durante tres días alternos el contenido ruminal (300 g MF) fue muestreado a las 0, 2.5 y 5 horas, congelado inmediatamente y liofilizado para su posterior extracción de ADN (QIAamp DNA mini kit, Qiagen).

La población bacteriana ruminal fue estudiada mediante TRFLP, utilizando un par de cebadores específicos del 16S ARNr bacteriano (27F y 1389R, Liu et al., 1997), estando el primero marcado con fluorescencia. El producto de PCR, tras ser purificado en placas MontageTM PCRµ96 50/PK de Milipore, fue sometido a cuatro digestiones con las enzimas de restricción Hha I, Hae III, Msp I y Rsa I. Los productos de restricción fueron purificados mediante precipitación en etanol y posteriormente analizados en un secuenciador CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter), utilizando un estándar de entre 60 y 600pb. El área de cada fragmento fue corregida con el método de la desviación estándar (Abdo et al., 2006) y finalmente el dendrograma y la distancia Bray-Curtis de disimilitud fueron elaborados en base al método UPGMA del programa R (versión 2.10.0).

La población ruminal de hongos anaerobios fue estudiada mediante ARISA, utilizando un par de cebadores específicos de la región ITS1 del 18S ARNr fúngico (Edwards et al., 2008). Tras realizar la PCR por triplicado, y posterior mezcla de los mismos, los productos de PCR fueron analizados en un secuenciador ABI 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystem) utilizando un estándar de 500 pb. El perfil de picos fue explorado mediante el programa Genemapper (Applied Biosystems), mientras que el dendrograma y la distancia Pearson de similitud fueron elaborados en base al método UPGMA del programa Fingerprinting (Bio-Rad). Los picos con un área inferior al 3% del área total no fueron considerados en los cálculos de biodiversidad (número de picos e índice Shannon). El análisis estadístico

consistió en un modelo de medidas repetidas (REML, GenStat) donde el nivel de proteína, tipo de carbohidrato y tiempo fueron los efectos fijos y el animal fue considerado aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El momento de muestreo no ocasionó diferencias en las poblaciones bacterianas y fúngicas ruminales y las tres muestras procedentes de cada animal tendieron a agruparse juntas con una alta similitud. El análisis de TRFLP mostró que el tipo de carbohidrato utilizado es el principal factor que determina la estructura bacteriana ruminal. Animales alimentados con diferentes tipos de carbohidrato mostraron más de un 40% de disimilitud (Fig. 1A), sin embargo este factor no modificó los índices de biodiversidad (Tabla 1). Ello muestra que dependiendo del tipo de carbohidrato (energía fermentable) se produce una sustitución de unas especies bacterianas por otras (supuestamente entre comunidades celulolíticas y amilolíticas), sin que ello modifique sustancialmente el número total de las mismas.

El nivel de proteína también originó cambios en la estructura poblacional bacteriana, aunque en este caso las diferencias no superaron el 37%. Un aspecto a considerar fue la interacción entre el nivel de proteína y el tipo de energía, pues la suplementación con almidón originó mayores cambios en el ecosistema bacteriano cuando los animales recibieron dietas bajas en proteína (Fig. 1A) y fue acompañado por un descenso tanto en el número de fragmentos (de 38.0 a 34.6; $P=0.02$) como en el índice Shannon de diversidad (de 3.31 a 3.22, $P=0.05$).

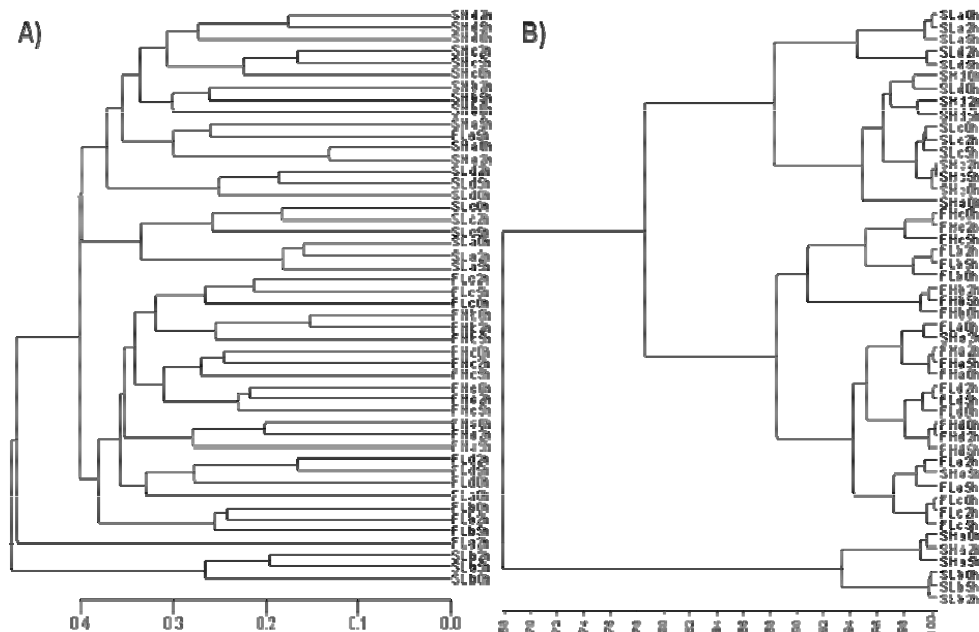


Figura 1. Dendrogramas correspondientes al análisis de las poblaciones ruminales de bacterias (A) y hongos (B) estudiadas mediante TRFLP y ARISA respectivamente. Cuatro vacas (a,b,c,d) fueron muestreadas (0, 2.5 y 5h post-ingesta) tras ser alimentadas con un nivel alto (H) o bajo (L) en proteína y suplementadas con fibra (F) o almidón (S).

El análisis de la población fúngica ruminal mediante ARISA originó resultados similares que el análisis bacteriano. Nuevamente el tipo de carbohidrato fue quien ocasiono las mayores diferencias en la población fúngica (Fig. 1B), de modo que los animales alimentados con un mismo tipo de energía fermentable mostraron más de un 79% de similitud (excepto dos animales). Como era esperable, la dieta fibrosa ocasionó tanto un incremento en el número señales fúngicas (de 30.5 a 33.5; $P<0.001$), como de la abundancia relativa de hongos ruminales determinada mediante PCR cuantitativa (+30%, Belanche et al., 2011), respecto a

la dieta rica en almidón, lo que demuestra que la fibra es un apropiado sustrato para el crecimiento de los hongos ruminales. Dicha proliferación fúngica tanto en cantidad como en biodiversidad, así como su extraordinaria capacidad fibrolítica, pudo explicar la ausencia de diferencias en la digestibilidad ruminal y total entre los dos tipos de carbohidratos (Fanchone et al., 2011b). Por otro lado, aunque el nivel de proteína en la dieta no ocasionó importantes diferencias en la estructura de la población fúngica (Fig. 1B), sí que lo hizo en los niveles de biodiversidad (Tabla 1). En concreto, el nivel alto en proteína incrementó el número de señales fúngicas (de 30.7 a 33.3, $P<0.001$) y del índice Shannon (del 2.95 al 3.00, $P=0.02$). Al igual que lo observado en las poblaciones bacterianas, el menor número de señales fúngicas se observó cuando los animales recibieron dietas bajas en proteína y suplementadas con almidón (interacción, $P=0.05$). Estos descensos en biodiversidad fueron también acompañados por una disminución del nivel de amoníaco ruminal (Fanchone et al., 2011b) y podrían estar relacionados con la mayor eficiencia de utilización de N dietético observada en este tratamiento experimental.

Tabla 2. Efecto del nivel de proteína y tipo de carbohidrato dietético sobre los índices ruminales de biodiversidad bacteriana y fúngica estudiados mediante TRFLP y ARISA.

	Proteína alta		Proteína baja		SED n=12	Significación		
	Fibra	Almidón	Fibra	Almidón		Proteína	Energía	P x E
Bacterias (TRFLP)								
Fragmentos	36.7 ^{ab}	36.9 ^a	38.0 ^a	34.6 ^b	1.04	*	ns	*
Shannon	3.27	3.29	3.31	3.22	0.039	ns	ns	T
Hongos anaerobios (ARISA)								
Productos de PCR	34.1	32.4	32.8	28.6	0.91	***	***	T
Shannon	2.98	3.02	2.94	2.95	0.032	ns	*	ns

T, $P<0.1$; * $P<0.05$; *** $P<0.001$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdo, Z., Schuetz, U.M.E., Bent, S.J., Williams, C.J., Forney, L.J. & Joyce, P. 2006. Environ. Microbiol. 8, 929-938
- Belanche, A., Moorby, J.M., Doreau, M. & Newbold C.J. 2011, AIDA-ITEA (en prensa)
- Edwards, J.E., Kingston-Smith, A.H., Jimenez, H.R., Huws, S.A., Skot, K.P., Griffith, G.W., McEwan, N.R. & Theodorou, M.K. 2008. Fems Microbiol. Ecol. 66: 537-545
- Fanchone, A., Doreau, M. & Nozière, P. 2011a Procc. BSAS (en prensa)
- Fanchone, A., Nozière, P., Portelli, J., Chauveau-Duriot, B., Largeau, V. & Doreau, M. 2011b Procc. BSAS (en prensa)
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. 1997. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4516-4522

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la UE, FP7, KBB-2007-1.

STUDY OF RUMEN BACTERIAL AND ANAEROBIC FUNGAL POPULATION BY TRFLP AND ARISA; EFFECT OF THE PROTEIN LEVEL AND TYPE OF CARBOHYDRATE: Four rumen-cannulated dairy cows were fed with two levels of degradable protein (110 vs. 80% of requirements) and two type of carbohydrates (NDF/starch of 2.8 and 1.3) according to a 4x4 Latin square. Rumen contents were sampled at 0, 2.5 and 5h after feeding for DNA extraction. Bacterial and anaerobic fungal populations were studied by using TRFLP and ARISA respectively. Sampling time modified neither the microbial population structure nor the biodiversity indexes. Bacterial population composition was affected by the type of carbohydrate used but did not modify the bacterial diversity, suggesting a shift in the bacterial species profile but the maintenance of population structure. Bacterial clustering was also affected by the protein level, particularly in animals supplemented with starch. Anaerobic fungal population was also affected by the type of carbohydrate, and fibrous diet increased the number of amplicons ($P<0.001$). Dietary protein level did not modify the anaerobic fungal clustering, but high protein diets increased the number of amplicons ($P<0.001$). Animals fed the low protein diet supplemented with starch showed the lowest bacterial (34.6 vs. 37.2 fragments; $P=0.01$) and fungal (28.6 vs. 33.1 amplicons; $P=0.05$) diversity, and may be related to the highest efficiency of dietary N utilization observed in this experimental group.

Keywords: arisa, fungi, rumen, trflp