

EFECTO DEL POLIETILENGLICOL SOBRE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RUMEN: CULTIVOS IN VITRO CON INÓCULO DE OVEJAS ALIMENTADAS SOLO CON FORRAJE O CON UNA DIETA RICA EN CONCENTRADO

Belenguer, A.^{1,*}, Hervás, G.¹, Toral, P.G.¹, Fondevila, M.², Frutos, P.¹

¹ Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León.

² Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet, 177 50013 Zaragoza.

*correo electrónico: a.belenguer@eae.csic.es

INTRODUCCIÓN

El polietilenglicol (PEG) es un detergente no iónico que presenta una gran afinidad por los taninos, a los que se une e inactiva, y que se utiliza muy habitualmente para estudiar el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal, a la cual se ha demostrado que no afecta (Makkar, 2003). Sin embargo, aún no está claro si su uso puede afectar o no a la comunidad microbiana del rumen.

En un estudio preliminar in vitro (Belenguer et al., 2010) se investigó el efecto del PEG sobre la comunidad bacteriana del rumen mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP). Aunque los perfiles bacterianos no mostraron diferencias acusadas, sí se observaron variaciones significativas en la frecuencia relativa de diversos fragmentos que podrían corresponder a bacterias relevantes en estudios de microbiología ruminal relacionados con la acción de los taninos. Dichas variaciones fueron especialmente claras cuando se utilizó maíz como sustrato.

Por tanto, este trabajo se planteó con el objetivo de confirmar el posible efecto del PEG sobre la comunidad bacteriana del rumen, utilizando inóculos procedentes de ovejas alimentadas solo con forraje o con una dieta rica en alimentos concentrados.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este experimento se utilizaron 6 ovejas canuladas en el rumen que se dividieron en dos grupos y se alimentaron con 2 dietas diferentes: heno de hierba (F) y una dieta completa con un 60% de concentrado (C). Después de 10 días de adaptación, y tras una noche de ayuno, se recogieron muestras de fluido ruminal de cada animal y se mezclaron para dar lugar a un único inóculo por dieta. A continuación, se llevaron a cabo cultivos discontinuos de microorganismos ruminales, siguiendo el procedimiento descrito para la técnica in vitro de producción de gas (Mauricio et al., 1999). Los cultivos se realizaron por triplicado, utilizando maíz como sustrato (500 mg/botella) y con la adición o no de PEG (1 g/botella). La fermentación se detuvo a las 22 h y se mezclaron los contenidos de las 3 botellas de cada tratamiento. Las muestras fueron congeladas inmediatamente a -80°C y posteriormente liofilizadas. Para disponer de réplica estadística, todo el proceso se repitió 2 días después.

El ADN de las muestras liofilizadas se extrajo con el kit QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Alemania), con la modificación de una mayor temperatura (95°C) en la lisis celular. Para el análisis mediante T-RFLP se utilizaron cebadores que amplifican el gen del ARN ribosómico 16S bacteriano (Hongoh et al., 2003), estando uno de ellos marcado con 6-carboxifluoresceína. El producto de la PCR fue purificado, cuantificado y a continuación digerido (95 ng) utilizando las enzimas de restricción HhaI y MspI (10 U; 37°C, 12 h) por separado. Los productos de dicha digestión fueron purificados y finalmente los fragmentos terminales de restricción (T-RF) se analizaron en un secuenciador capilar automático Megabace 500 (Amersham Biosciences, Reino Unido), utilizando fragmentos de entre 50 y 900 pares de bases (pb) como patrones.

El perfil de picos se analizó mediante el programa GeneMarker (Softgenetics, EE. UU.) y, tras estandarizar los datos, se procedió a la construcción de un dendrograma, utilizando el método Ward's y las distancias Bray-Curtis, con el programa informático Community Analysis Package 4 (Pisces Conservation Ltd, Reino Unido). El análisis estadístico del número de fragmentos detectados y de los porcentajes del área de ciertos fragmentos se realizó mediante análisis de varianza, utilizando el programa MIXED del paquete estadístico SAS versión 9.1. (SAS Institute Inc., EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra claramente cómo los perfiles bacterianos se agruparon principalmente por tanda y por dieta (C y F), lo que parece indicar que la estructura de la comunidad bacteriana no se vio afectada por la adición de PEG.

No obstante, y al igual que ocurría en el estudio previo (Belenguer et al., 2010), la inclusión de este detergente sí que alteró las proporciones relativas sobre el área total de picos de algunos T-RF (ver Tabla 1). Sin embargo, en este experimento hubo menos fragmentos que mostraron variaciones significativas y estas se observaron únicamente en las incubaciones con el inóculo procedente de los animales que consumían solo forraje. Entre los T-RF afectados, destacan el de 192 pb obtenido con HhaI y el de 316 pb con MspI, que presentaron frecuencias relativas elevadas, las cuales, además, descendieron con la adición de PEG. Ambos T-RF son compatibles con bacterias del género *Butyrivibrio*, que incluye diversos microorganismos que serían capaces no solo de resistir la presencia de taninos, sino incluso de degradarlos (Odenyo et al., 2001).

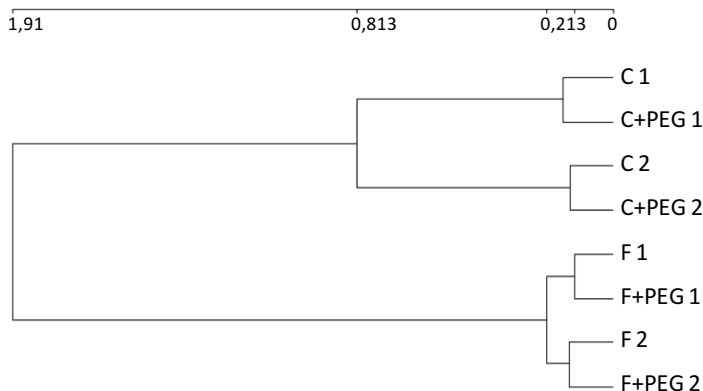


Figura 1. Dendrograma construido a partir del análisis mediante T-RFLP del ADN extraído de muestras de incubaciones de maíz con inóculos de ovejas alimentadas con forraje (F) o con una dieta completa con un 60% de concentrado (C) y con la adición (+PEG) o no de polietilenglicol, realizadas en dos tandas separadas por 2 días (1 y 2).

Conviene destacar que, en este ensayo, las diferencias entre tandas (i.e., debidas al inóculo) resultaron significativas en la mayor parte de los casos (aunque esta información no se presenta en la tabla). Dichas diferencias fueron especialmente acusadas cuando los donantes del inóculo fueron los animales alimentados con la dieta completa (ver Figura 1), lo cual podría haber dificultado la detección del efecto del PEG sobre algunas poblaciones bacterianas. A pesar de que se ha descrito una cierta estabilidad en la estructura de la microbiota ruminal a lo largo de periodos de tiempo cortos (Yáñez-Ruiz et al., 2009), es posible que existan variaciones temporales de algunas poblaciones bacterianas dentro de un mismo animal.

Por lo tanto, aunque nuestros resultados no permitirían confirmar el efecto del PEG sobre la comunidad bacteriana del rumen, tampoco permiten rechazar categóricamente su existencia. De existir, los datos sugieren que el efecto sería diferente dependiendo de la dieta consumida por los animales. En cualquier caso, dada la relevancia del posible efecto del PEG sobre la comunidad bacteriana en estudios de microbiología ruminal sobre los mecanismos de acción de los taninos, sería recomendable completar esta investigación con nuevos ensayos en los que se intentara reducir la variación debida al inóculo (e. g., incrementando el número de muestras).

Tabla 1.- Número de T-RF y frecuencias relativas (%) sobre el área total de picos de algunos T-RF de diferente longitud (pares de bases, pb) obtenidos a partir de los resultados de T-RFLP en incubaciones de maíz con inóculos de ovejas alimentadas con un forraje (F) o con una dieta completa con un 60% de concentrado (C) y con la adición (PEG+) o no (PEG-) de polietilenglicol.

Enzima		Dieta C		Dieta F		eed	Nivel de significación		
		PEG-	PEG+	PEG-	PEG+		Dieta	PEG	DietaxPEG
HhaI	Nº de T-RF	35,0	36,0	29,5	32,5	2,60	t	ns	ns
	T-RF (pb)								
	100	23,2	22,8	13,1	12,6	7,18	ns	ns	ns
	203	3,52	2,06	0,41	0,37	0,847	*	ns	ns
	192	<0,001 ^c	<0,001 ^c	42,5 ^a	36,0 ^b	0,823	***	**	**
	216	11,4	10,9	13,5	15,5	9,06	ns	ns	ns
MspI	Nº de T-RF	97,0	93,5	38,5	46,5	11,89	**	ns	ns
	T-RF (pb)								
	91	3,52 ^b	3,13 ^b	3,72 ^b	5,06 ^a	0,385	*	ns	*
	96	13,6	14,4	12,2	13,7	5,416	ns	ns	ns
	152	0,11	0,06	2,61	2,20	0,103	***	*	t
	316	<0,001	<0,001	37,7	32,8	1,44	***	t	t

eed= error estándar de la diferencia; ns= no significativo ($P>0,10$); t= $P<0,10$; *= $P<0,05$; **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Belenguer, A., Hervás, G., Toral, P. G. & Frutos, P. 2010. Proceedings of the 7th Symposium Rowett-INRA. Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems. p. 58. ● Hongoh, Y. H., Yuzawa, M., Okhuma, M. & Kudo, T. 2003. FEMS Microbiol. Lett. 221: 299-304. ● Makkar, H. P. S. 2003. A laboratory manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. ● Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S. & Theodorou, M. K. 1999. Anim. Feed Sci. Technol. 79: 321-330. ● Odenyo, A. A., Bishop, R., Asefa, G., Jamnadass, R., Odongo, D. & Osuji, P. 2001. Anaerobe 7: 5-15. ● Yañez-Ruiz D. R., Soto, E. C., Newbold, C. J., & Molina Alcaide, E. 2009. Proceedings of the 13th Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Sheep and Goat Nutrition. p. 26.

EFFECT OF POLYETHYLENGLYCOL ON THE RUMEN BACTERIAL COMMUNITY: IN VITRO CULTURES WITH INOCULA FROM SHEEP FED ONLY FORAGE OR A CONCENTRATED-RICH DIET

ABSTRACT. In vitro batch cultures of rumen microorganisms were performed with or without polyethilenglycol (PEG) to study the effect of this tannin-binding agent on the rumen bacterial community. Six cannulated sheep were divided in two groups and fed only forage or a total mixed ration with 60% of concentrate. Rumen fluid was collected in two different days from these animals to obtain one inoculum per diet and day (4 in total) for the batch cultures of maize. After 22 h of incubation, microbial DNA was extracted and then analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism. The bacterial profiles clustered basically according to the day of rumen fluid collection and the diet, suggesting that the bacterial community structure was not affected by PEG. On the other hand, the relative frequency of some fragments varied with PEG addition. Thus, for instance, fragments compatible with *Butyrivibrio* spp., which may tolerate or even degrade tannins, showed a lower proportion with PEG. However, this effect was only significant with the inocula derived from animals fed forage. The remarkable differences between days in the rumen bacterial composition of the same sheep on the same diet, especially in those fed the total mixed ration, might have precluded the detection of further PEG effects on specific bacterial populations.

Keywords: molecular technique, rumen microbiota, tannin, T-RFLP.