

## ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN DE VACAS, OVEJAS Y CABRAS EN PASTOREO

Belenguer, A.<sup>1,\*</sup>, Osoro, K.<sup>2</sup>, Hervás, G.<sup>1</sup>, Toral, P.G.<sup>1</sup>, Celaya, R.<sup>2</sup>, García, U.<sup>2</sup>, Frutos, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León.

<sup>2</sup> Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Área de Sistemas de Producción Animal, 33300 Villaviciosa, Asturias.

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

### INTRODUCCIÓN

En pastoreo, las vacas y las ovejas se caracterizan por consumir mayoritariamente especies vegetales con un alto contenido de pared celular, sobre todo las primeras (es decir, las vacas), mientras que las cabras incluyen en su dieta proporciones más elevadas de arbustos, gracias a su mayor capacidad de ramoneo y selección (Celaya et al., 2008). Este comportamiento tiene una influencia directa en la ecología microbiana del rumen y por tanto en la composición de su comunidad bacteriana, ya que esta está determinada esencialmente por la dieta consumida. A su vez, una diferente microbiota podría explicar una distinta capacidad de cada especie para utilizar determinados alimentos (por ejemplo, más o menos lignificados, con presencia o no de compuestos secundarios, etc.). Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura de la comunidad bacteriana del rumen de animales de las tres especies de rumiantes domésticos más comunes (i. e., vacas, ovejas y cabras), que se encontraban en pastoreo en una misma parcela con vegetación mixta de brezal-tojal y pradera, mediante la utilización de una técnica molecular cualitativa, el polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP).

### MATERIAL Y MÉTODOS

En este experimento, se utilizaron 16 animales pertenecientes a 3 especies diferentes de rumiantes: 5 vacas, 6 ovejas y 5 cabras. Todos ellos se encontraban en pastoreo en una parcela experimental (22,3 ha) situada a 900-1000 m de altitud en el concejo de Illano (Asturias). La vegetación natural ocupaba el 76% de la superficie y consistía mayoritariamente en matorrales de brezal-tojal dominados por el brezo *Erica umbellata* y el tojo *Ulex gallii*. El resto de la superficie correspondía a un pasto sembrado de raigrás inglés (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), aunque dominado por la gramínea espontánea *Agrostis capillaris*. Tras un periodo de pastoreo de unos 2 meses y medio, en julio todos los animales fueron intubados mediante sonda esofágica para obtener muestras de fluido ruminal. Estas muestras fueron congeladas inmediatamente a -80°C y posteriormente liofilizadas para el estudio de la comunidad bacteriana.

El ADN del contenido ruminal liofilizado se extrajo siguiendo el método descrito por Yu y Morrison (2004), con la modificación de una mayor temperatura (95°C) en la lisis celular. Para el análisis mediante T-RFLP se utilizaron cebadores específicos para amplificar 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 la enzima de restricción *MspI* (10 U; 37°C, 12 h). Los productos de dicha digestión fueron de nuevo purificados y finalmente los fragmentos terminales de restricción (T-RF) se analizaron en un secuenciador capilar automático Megabace 500 (Amersham Biosciences, Reino Unido), utilizando 22 fragmentos de entre 50 y 550 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 Jaccard, y al análisis de porcentajes de similitud (SIMPER), que emplea las distancias Bray-Curtis. con el programa informático Community Analysis Package 4 (Pisces Conservation Ltd., Reino Unido). El análisis estadístico de los índices de diversidad (número de T-RF e índice Shannon) y de los porcentajes del área de ciertos fragmentos sobre el área total de los picos obtenidos se realizó mediante análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.1. (SAS Institute Inc., EE. UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se esperaba, la estructura de la comunidad bacteriana del rumen mostró diferencias considerables entre las tres especies de rumiantes (ver Figura 1). De acuerdo con un estudio previo realizado por Celaya et al. (2008) en la misma parcela utilizada, durante el mes de julio, la dieta seleccionada por las vacas y las ovejas incluye mayoritariamente especies herbáceas (>90%), las cuales son más ricas que los brezos y los tojos en hidratos de carbono estructurales como la hemicelulosa. Estos últimos, a su vez, presentan un contenido superior de lignina y son consumidos en una mayor proporción por el ganado caprino (≈21 y 10% de brezos y tojos, respectivamente). Estos resultados coinciden con las diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana entre las tres especies, ya que el porcentaje de similitud fue superior entre las vacas y las ovejas (46%) que entre las cabras y las ovejas (37%) o las cabras y las vacas (34%), lo que apunta claramente al efecto de la dieta sobre las variaciones en la microbiota. Además, los índices de diversidad también mostraron diferencias significativas entre especies (Tabla 1), siendo inferiores en el caprino, lo que posiblemente sugiera una mayor especialización bacteriana (Dehority, 2003).

Tabla 1.- Índices de diversidad (número de T-RF e índice Shannon) 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 vacas, ovejas y cabras que se encontraban en pastoreo en una misma parcela.

	Bacterias compatibles	Vacas	Ovejas	Cabras	eed	P
N.º de T-RF		51,4 <sup>a</sup>	53,0 <sup>a</sup>	37,4 <sup>b</sup>	4,62	**
Índice Shannon		3,36 <sup>a</sup>	3,23 <sup>a</sup>	2,76 <sup>b</sup>	0,126	***
T-RF (pb)						
85	Bacteroidetes	0,16 <sup>b</sup>	5,05 <sup>a</sup>	0,08 <sup>b</sup>	1,217	**
315	Lachnospiraceae (Butyrivibrio)	1,66 <sup>a</sup>	1,15 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,264	***
475	Firmicutes	1,25 <sup>a</sup>	0,79 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,244	***
484	Clostridiales	3,36 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,598	***
531	Clostridiaceae	6,64 <sup>a</sup>	1,25 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	1,396	**
540	Clostridiaceae	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	3,04 <sup>a</sup>	0,800	**
545	Bacteroidetes / Lactobacillus	0,40 <sup>b</sup>	1,70 <sup>b</sup>	17,95 <sup>a</sup>	1,708	***

eed, error estándar de la diferencia; P, nivel de significación del efecto de la especie.

\*\*=P<0,01; \*\*\*=P<0,001. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, distintos superíndices en la misma fila indican diferencias significativas.

También se observaron diferencias significativas en la frecuencia relativa de algunos T-RF (Tabla 1) que podrían estar relacionadas con la dieta consumida. En este sentido, destaca la mayor abundancia relativa del fragmento de 545 pb observada en las cabras (casi un 18%). Mediante el uso de la base de datos Ribosomal Database Project II, es posible hacer una asignación teórica de especies o grupos bacterianos a los fragmentos detectados, aunque un mismo fragmento podría corresponder a varias especies, por lo que esta inferencia debe considerarse con cautela. Así, el T-RF de 545 pb es compatible con bacterias no cultivadas de la división Bacteroidetes, lo que podría estar relacionado con la mayor ingestión de taninos presentes en el brezo, ya que se sabe que algunas especies de este grupo son resistentes a dichos compuestos secundarios (McSweeney et al., 2000). Además, este fragmento también puede proceder de especies del género *Lactobacillus*, que parecen estar favorecidas por la presencia de lignina en la dieta (Baurhoo et al., 2007).

Por otra parte, en el fluido ruminal de las cabras no se detectaron tres T-RF (315, 475 y 484 pb) que sí aparecieron en ovejas y vacas y que podrían provenir de bacterias hemicelulolíticas, como es el caso del de 315 pb. Este T-RF es compatible con especies no cultivadas de la familia Lachnospiraceae, por ejemplo del género *Butyrivibrio*, algunas de las cuales son muy activas en la degradación de la hemicelulosa (Dehority, 2003).

Otros fragmentos mostraron igualmente diferencias importantes entre vacas, ovejas y cabras, lo que podría deberse no sólo a la dieta, sino también a ciertas diferencias

funcionales derivadas de la distinta adaptación evolutiva de estas especies (Hofmann, 1989). Aunque esta hipótesis no puede ser comprobada con el diseño de este estudio, sería de incuestionable interés poder continuar la investigación, comparando las estructuras de las comunidades bacterianas del rumen cuando estas tres especies de rumiantes consumen exactamente la misma dieta.

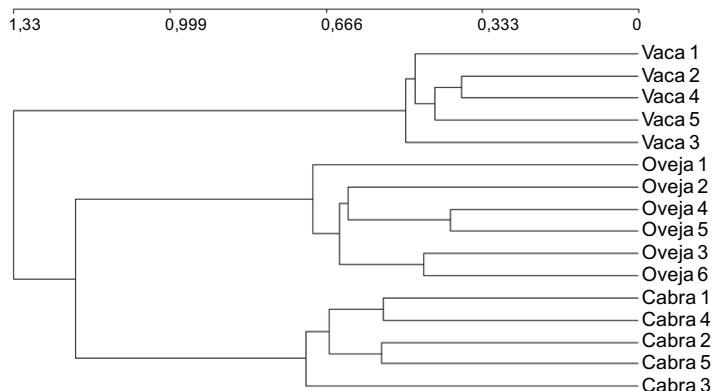


Figura 1. Dendrograma obtenido utilizando el método Ward's y las distancias Jaccard a partir del análisis mediante T-RFLP del ADN extraído de fluido ruminal de vacas, ovejas y cabras en pastoreo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baurhoo, B., Phillip, L. & Ruiz-Feria, C.A. 2007. *Poult. Sci.* 86: 1070–1078.
- 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.
- Hongoh, Y. H., Yuzawa, M., Okhuma, M. & Kudo, T. 2003. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 299-304.
- McSweeney C. S., Palmer B. & Krause D. O. 2000. *Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia. ACIAR Proceedings No. 92'*. (Ed. Brooker J. D.) p. 140–145.
- Yu, Z. & Morrison, M. 2004. *BioTechniques* 36: 808-812.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Proyecto RTA2007-00098-C03).

#### BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN THE RUMEN OF GRAZING CATTLE, SHEEP AND GOATS

**ABSTRACT:** The rumen bacterial community structure was studied in cattle, sheep and goats that were managed in mixed grazing on a big plot with about 76% of short heather–gorse shrubland and 24% of improved pasture. After a grazing period of approximately 2.5 months, rumen samples were obtained via a stomach tube, and DNA was extracted and analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Bacterial profiles differed clearly among the three species, with a greater similarity percentage between cattle and sheep. This agrees with the known strong relationship between diet and bacterial composition, and with previous studies on the same plot showing that these two species consume more herbaceous plants and less shrubs than goats. Furthermore, goats' rumen bacterial community presented a lower diversity and significant differences in the relative frequencies of some fragments, such as a greater proportion of one that may match *Bacteroidetes* species potentially resistant to tannins. On the other hand, a peak compatible with bacteria of the genus *Butyrivibrio*, which include microorganisms that are very active in degrading hemicellulose, only appeared in sheep and cattle.

**Keywords:** molecular technique, rumen bacteria, ruminant, T-RFLP.