

## EVOLUCIÓN POSTPRANDIAL DE LA DIVERSIDAD DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN DE OVEJAS

Saro, C., Carro, M.D y Ranilla, M.J..

Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071, León. IGM (CSIC-ULE).  
Finca Marzanas, s/n. 24348, Grulleros, León (cristina.saro@unileon.es)

### INTRODUCCIÓN

La fase sólida del rumen es conocida por ser la de mayor capacidad para degradar la pared celular de los alimentos (Michalet-Doreau et al., 2001). Varios trabajos han estudiado cómo afecta a la diversidad bacteriana el cambio de la proporción forraje:concentrado en la dieta (Wanapat et al., 2009; Julien et al., 2010), pero no hay estudios acerca del efecto del tipo de forraje en la misma. Las técnicas moleculares son una herramienta muy valiosa para este tipo de estudios, ya que permiten caracterizar una muestra de una manera rápida y sencilla. El objetivo de este estudio fue evaluar cómo afecta el tipo de forraje en la dieta y el tiempo de muestreo a la comunidad bacteriana en la digesta sólida del rumen mediante análisis automático de los fragmentos interribosomales (ARISA).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 ovejas merinas ( $58,3 \pm 3,27$  kg) canuladas en el rumen en un diseño cruzado. Se formularon 2 dietas experimentales con una relación forraje:concentrado de 70:30, siendo el forraje heno de alfalfa (AL) o heno de gramínea (GR). Las dietas fueron administradas a los animales a nivel restringido (56 g materia seca (MS)/kg peso vivo<sup>0,75</sup>) para minimizar la selección del alimento, en dos tomas iguales diarias (8:00 y 20:00 h). Tras 15 días de adaptación a la dieta se tomaron muestras del contenido ruminal inmediatamente antes (0 h) y 4 y 8 horas tras la administración de la primera toma de alimento en dos días no consecutivos. El contenido ruminal se filtró por dos capas de gasa y la parte sólida se congeló inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente liofilizarla. Las muestras procedentes de los dos días se mezclaron por oveja y hora de muestreo antes de su análisis.

La extracción del ADN se realizó partiendo de 120 mg de material sólido del rumen liofilizado siguiendo el método propuesto por Yu y Morrison (2004). Para el ARISA el ADN extraído se amplificó usando los cebadores bacterianos universales 16S-1392f y 23S-123r (Danovaro et al., 2006) que amplifican la región en el operón ITS1 del ARNr. El cebador inverso fue marcado con el fluorocromo 6-FAM. Cada mezcla de PCR (25  $\mu\text{L}$  volumen final) contenía tampón de reacción de PCR 1x, 1,5 mM,  $\text{MgCl}_2$ , 0,25  $\mu\text{M}$  de cada cebador, cada desoxinucleótido trifosfato en una concentración de 0,2 mM y 2,5 UI de Taq polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España). La PCR se realizó en un termociclador 2720 (Applied Biosystem, Foster City, CA, Estados Unidos), y se inició con un ciclo de desnaturalización inicial ( $94^{\circ}\text{C}$ , 240 s) seguido de 30 ciclos de desnaturalización ( $94^{\circ}\text{C}$ , 60 s), anillamiento ( $55^{\circ}\text{C}$ , 60 s) y elongación ( $72^{\circ}\text{C}$ , 120 s), con un paso final de extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 120 s. El tamaño y calidad de los productos de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para cada muestra, 5 ng de amplicón se mezclaron con un estándar interno de tamaño (GS 1200 LIZ, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) en formamida desionizada, después se desnaturalizaron a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 4 min e inmediatamente se colocaron en hielo. La detección automática de los fragmentos del ARISA se llevó a cabo usando un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) con un capilar de 36 cm por 50  $\mu\text{m}$  y el polímero POP-7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). El tamaño del pico y su área fueron estimados por comparación con el estándar interno de tamaño usando el software GeneMaker v1.80 (SoftGenetics, State College, PA, Estados Unidos). Con el fin de incluir el máximo número de picos y estandarizar los electroferogramas, se utilizó un umbral de 100 unidades de fluorescencia y se consideró que el perfil de los picos de los electroferogramas reflejó las especies o comunidades bacterianas predominantes presentes en cada muestra. Se calculó el índice de diversidad de Shannon (Shannon, 1949) para cada grupo de muestras y este índice fue utilizado para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas. La matriz de datos con la presencia o ausencia (1 y 0, respectivamente) de picos para las muestras recogidas a cada tiempo de muestreo se sometió a un análisis de componentes principales (PCA).

Los datos referentes al número de picos en el ARISA y el índice de Shannon se sometieron a un análisis de varianza para medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). El tipo de forraje, el tiempo de muestreo y el período fueron considerados efectos fijos, mientras que la oveja se consideró efecto aleatorio. El nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fue imposible obtener ADN de calidad suficiente para la PCR a partir de la digesta del muestreo de la hora 0 en una oveja cuando recibió heno de gramíneas, a pesar de los repetidos intentos de extracción. En total se detectaron 109 filotipos, de los cuales, 17 estuvieron presentes únicamente en las digestas de los animales que recibieron la dieta AL y 7 en las de los que recibieron la dieta GR. El número de filotipos detectado (Tabla 1) fue mayor ( $P=0,015$ ) cuando las ovejas recibían la dieta AL que cuando se les administraba la dieta GR (44,7 y 35,6, respectivamente). Para ambas dietas, el número de filotipos detectado a las 4 horas tras la ingestión de alimento fue menor ( $P < 0,05$ ) que el observado a las 0 y 8 horas, sin que existieran diferencias ( $P > 0,05$ ) entre las 0 y 8 horas. Los índices de Shannon obtenidos con la dieta AL fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que los observados con la dieta GR, lo que indicaría que el heno de alfalfa dio lugar a una mayor diversidad bacteriana.

Las ovejas 1, 2 y 3 presentaron valores medios de índice de Shannon similares para las dos dietas (3,90, 3,84 y 3,88 para la dieta AL, y 3,66, 3,58 y 3,44 para la dieta GR), pero la oveja 4 mostró valores inferiores (3,61 y 3,22 para las dietas AL y GR, respectivamente). Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas la variabilidad individual observada por otros autores (Wanapat et al., 2009; Julien et al., 2010).

Tabla 1. Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo tras la administración de alimento (T) sobre el índice de Shannon y número de filotipos en el análisis ARISA de la digesta ruminal sólida de ovejas alimentadas con dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje.

Parámetro y dieta	T (horas)			EEM <sup>1</sup>	Valor de P		
	0	4	8		FOR	T	FOR x T
Número de filotipos							
AL	50,8 <sup>a</sup>	33,3 <sup>b</sup>	50,0 <sup>a</sup>	4,014	0,015	<0,001	0,612
GR	45,5 <sup>a</sup>	20,0 <sup>b</sup>	41,3 <sup>a</sup>				
Índice de Shannon							
AL	3,91 <sup>a</sup>	3,62 <sup>b</sup>	3,89 <sup>ab</sup>	0,095	<0,001	<0,001	0,045
GR	3,78 <sup>a</sup>	2,99 <sup>b</sup>	3,66 <sup>a</sup>				

<sup>1</sup> error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> En la misma fila, valores con diferente superíndice difieren ( $P < 0,05$ )

El análisis de componentes principales sugiere similares diferencias en la composición de las comunidades bacterianas entre dietas apuntada anteriormente, especialmente en algunos tiempos de muestreo (Figura 1). En general, las muestras de las digestas de los animales alimentados con la dieta AL tienden a agruparse por encima del eje 1, y las de la dieta GR por debajo de dicho eje. Además, las muestras AL tienden a situarse más concentradas que las GR, sobre todo a las 4 y 8 horas tras la comida, lo que sugiere una mayor similitud entre las comunidades bacterianas. A las 4 horas tras la ingestión de alimento se advierte una clara separación espacial entre las comunidades AL y GR, lo que indica una clara diferencia en composición entre las mismas.

Estos resultados indican una influencia clara del tipo de forraje sobre la estructura de las comunidades bacterianas de la digesta sólida del rumen de ovejas. Sin embargo, los cambios postprandiales observados fueron similares para las dos dietas, e indicarían una menor diversidad de las comunidades bacterianas en las primeras horas tras la ingestión de alimento que en periodos de tiempo posteriores. En efecto, los electroferogramas de las

muestras correspondientes a la hora 4 presentaron un menor número de picos, pero, en general, de mayor altura que los detectados a las 0 y 8 horas.

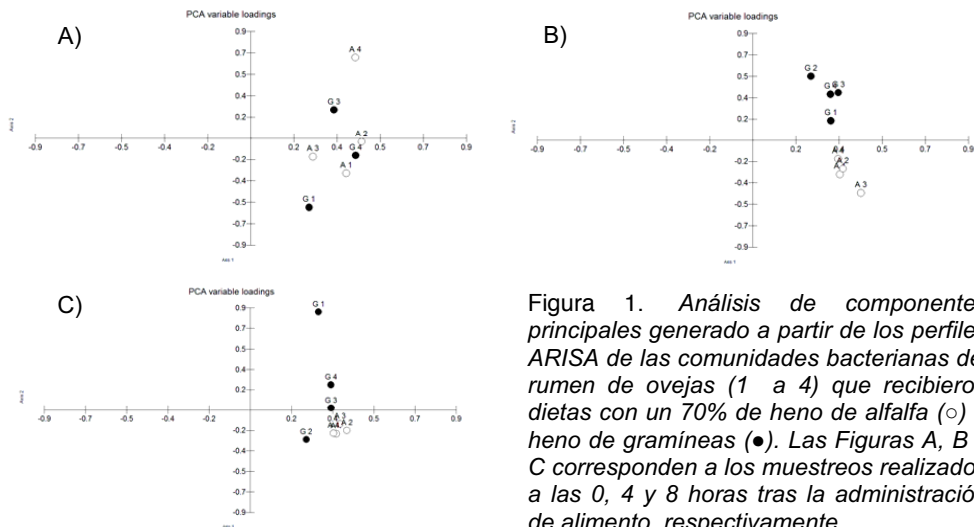


Figura 1. Análisis de componentes principales generado a partir de los perfiles ARISA de las comunidades bacterianas del rumen de ovejas (1 a 4) que recibieron dietas con un 70% de heno de alfalfa (○) o heno de gramíneas (●). Las Figuras A, B y C corresponden a los muestreos realizados a las 0, 4 y 8 horas tras la administración de alimento, respectivamente.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Danovaro, R., G. M. Luna, A. Dell'Anno, and B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 5982-5989.
- Julien, C., J. P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, and V. Monteils. 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal.* 4(10): 1641.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, and G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41(2): 187-194.
- Shannon, C. E., and W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication.* Urbana, IL, USA, University of Illinois Press.
- Wanapat, M., and A. Cherdthong. 2009. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. *Curr. Microbiol.* 58(4): 294-299.
- Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques.* 36: 808-812.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyectos AGL-2004-04755-CO2-01 y AGL2008-04707-CO2-02). C. Saro disfruta de una beca FPU del MEC (AP 2006-03049).

#### POSTPRANDIAL EVOLUTION OF BACTERIAL COMMUNITY DIVERSITY IN THE RUMEN OF SHEEP

**ABSTRACT:** The aim of this work was to analyze the effects of forage type (alfalfa and grass hay) and time after feeding on the bacterial communities in ruminal solid digesta from sheep. In order to study bacterial diversity, DNA was isolated from samples of solid digesta sampled 0, 4 and 8 hours after feeding, and the ITS1 region of rDNA operon was amplified by PCR and analyzed by ARISA. A total of 109 peaks were detected in the ARISA electropherograms across the full set of 24 samples. Bacterial diversity, as assessed by Shannon index, was greater ( $P < 0.001$ ) for AL compared with GR diets. For both diets, bacterial diversity at 0 and 8 hours after feeding was greater ( $P < 0.05$ ) than that at 4 h post-feeding.

**Keywords:** ruminal bacterial community, ARISA, sheep