

DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN LAS FASES LÍQUIDA Y SÓLIDA DE LA DIGESTA DEL RUMEN DE OVEJAS ALIMENTADAS CON DOS DIETAS FORRAJERAS

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

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

INTRODUCCIÓN

La proporción de bacterias asociadas a la fase sólida del contenido ruminal puede ser afectada por diversos factores, entre los que destaca la dieta que reciben los animales. Diversos estudios han demostrado que en dietas con elevado contenido en forraje hay mayor cantidad de microorganismos asociados a la fibra del alimento (Yang et al., 2001; Ranilla and Carro, 2003) o que varían las proporciones en función del tiempo que haya transcurrido desde la alimentación (Craig et al., 1987). Sin embargo, no existe información sobre cómo puede afectar el tipo de forraje en la dieta a la asociación de los microorganismos a la fibra. La PCR en tiempo real (rtPCR) es una técnica muy útil para estimar de una manera precisa la cantidad de ADN microbiano que se encuentra en una muestra. El objetivo de este trabajo fue estudiar, mediante rtPCR, cómo está influida la distribución de las comunidades bacterianas en las fases líquida y sólida del rumen por el tipo de forraje en la dieta y el tiempo tras la administración del alimento.

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). El contenido en proteína bruta y fibra neutro-detergente de la dieta AL fue de 186 y 426 g/kg de materia seca (MS), respectivamente, y el de la dieta GR de 121 y 499 g/kg MS. Las dietas fueron administradas a los animales a nivel restringido (56 g MS/kg peso vivo^{0,75}), para minimizar la selección del alimento, en dos tomas diarias iguales (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. Una muestra (50 g) se secó en estufa para determinar el contenido en MS. El resto se filtró a través de dos capas de gasa para separar y las fracciones líquida y sólida. A continuación se tomaron muestras del contenido sólido (10 g) y líquido (5 mL) y se congelaron a -80°C hasta la extracción del ADN.

Las muestras líquidas se descongelaron, se centrifugó 1 mL ($13000 \times g$, 15 minutos) y se utilizó el pellet obtenido para la extracción de ADN. Las muestras de sólido (120 mg) y los pellets obtenidos de las muestras líquidas se mezclaron con un buffer de lisis y se trataron durante 3 minutos en un Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, EEUU) para provocar la lisis de los microorganismos ruminales. Posteriormente, la extracción de ADN se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Yu y Morrison (2004) y utilizando el kit QIAamp DNA stool (QIAGEN, Valencia, España), pero incluyó un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR. Se utilizaron primers previamente validados para el ADN codificante del gen del ribosoma 16S bacteriano (Denman y McSweeney, 2006). Como estándares se utilizaron pellets de bacterias asociadas a la fase sólida y líquida que se aislaron del rumen de las ovejas siguiendo los procedimientos descritos por Ramos et al. (2009). El ADN extraído se diluyó 1:10 antes de realizar los análisis de rtPCR en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, seguidos de una curva de desnaturalización. Cada mezcla de PCR (20 μL) contenía: 10 μL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,9 μL de cada primer, 2 μL de muestra de ADN y agua destilada hasta un volumen final de 20 μL . Los valores obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

La concentración de ADN bacteriano (ADNb) en la digesta ruminal se calculó como la suma de la concentración de ADNb en la digesta sólida y en el contenido líquido, teniendo en cuenta el contenido en MS de la digesta. Los resultados obtenidos para cada fase ruminal (digesta total, fase sólida y fase líquida) se analizaron independientemente. Los datos 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. La significación estadística se estableció a $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cantidades de ADN extraído de las muestras de contenido sólido fueron 68, 261 y 83 $\mu\text{g/g MS}$ a las 0, 4 y 8 horas para la dieta AL, y 105, 301 y 171 $\mu\text{g/g MS}$ para la dieta GR (valores no mostrados), valores que están en el rango de los obtenidos en otros estudios (Sharma et al., 2003; Yu y Morrison, 2004). Para las dos dietas, fueron mayores ($P < 0,001$) a las 4 que a las 0 horas post-ingestión, sin que existiesen diferencias ($P > 0,05$) entre las concentraciones a las 0 y 8 h post-ingestión. Las relaciones A_{260}/A_{280} en las muestras del contenido sólido oscilaron entre 1,70 y 1,98, y no se vieron afectadas por el tiempo de muestreo ($P = 0,861$) ni por el tipo de forraje ($P = 0,550$). Las cantidades de ADN extraído del líquido ruminal fueron 2,57, 2,11 y 3,34 $\mu\text{g/mL}$ a las 0, 4 y 8 horas post-alimentación para la dieta AL, y 2,15, 2,06 y 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para la dieta GR (valores no mostrados), y no se observaron diferencias entre dietas ($P = 0,373$). Estos valores son similares a los indicados por Broudiscou et al., 1998, quienes obtuvieron entre 2,6 y 4,0 μg de ADN/mL de líquido ruminal de ovejas utilizando diferentes métodos de extracción. No hubo diferencias ($P = 0,352$) en la cantidad de ADN extraído entre las 0 y 4 horas post-ingestión, pero la cantidad de ADN fue mayor a las 8 horas post-ingestión que a las 0 y 4 h ($P < 0,05$). Las relaciones A_{260}/A_{280} en las muestras del líquido ruminal oscilaron entre 1,62 y 2,00, y no se vieron afectadas por la dieta ($P = 0,475$) ni por el tiempo de muestreo ($P = 0,114$). En los análisis de rtPCR, los valores medios para la curva estándar de las bacterias asociadas a la fase sólida fueron -3,382 para la pendiente y 0,998 para el coeficiente de regresión, y para las bacterias asociadas a la fase líquida -3,325 y 0,993. Las eficiencias medias de la PCR fueron 97,6% y 98,3% para las muestras de las fases sólida y líquida, respectivamente.

Como puede observarse en la Tabla 1, el porcentaje de MS de la digesta ruminal no sufrió variaciones con el tipo de forraje en la dieta ($P = 0,634$), pero fue más alto ($P < 0,05$) a las 4 horas post-alimentación que a las 0 y 8 horas, posiblemente debido al alimento ingerido. El contenido de ADNb de la fase sólida varió de 180 a 290 $\mu\text{g/g MS}$, y no existieron diferencias ($P = 0,664$) entre dietas. En cambio, la concentración de ADNb en el sólido a las 4 horas tras la alimentación fue menor ($P < 0,05$) que a las 0 y 8 horas, pudiendo ser debido al efecto de dilución del alimento ingerido y al lapso de tiempo que tardan los microorganismos asociados a la fibra en colonizarla y comenzar a reproducirse. En cuanto al contenido en ADNb en la fase líquida, los resultados observados son similares al caso de la fase sólida, no existiendo variación entre dietas pero sí una marcada diferencia entre los valores a las 4 y las 0 y 8 horas ($P = 0,013$ y $0,002$ respectivamente). Estos resultados podrían ser debidos a la migración de bacterias de la fase líquida para adherirse a las partículas de alimento en las primeras horas post-alimentación y están en consonancia con los cambios observados en otros estudios (Leedle et al., 1982). Como consecuencia de estos cambios, la cantidad de ADNb en la digesta total fue menor ($P < 0,05$) a las 4 horas, que a las 0 y 8 horas.

Para las dos dietas y los tres tiempos de muestreo, la cantidad de ADNb fue mayor ($P < 0,001$) en la fase sólida que en la líquida, y las bacterias de la fase sólida representaron entre el 82,3% y el 91,6% del total de bacterias en la digesta ruminal. Estos valores están en el rango de los observados por otros autores (Craig et al., 1987; Yang et al., 2001) utilizando diferentes metodologías de medida, y confirman que las bacterias asociadas a la fase sólida representan un porcentaje mayoritario de las bacterias ruminales en animales alimentados con dietas forrajeras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Broudiscou, L., H. Geissler, and A. Broudiscou. 1998. *Anaerobe*. 4(3): 145-152.
- Craig, W. M., G. A. Broderick, and D. B. Ricker. 1987. *The Journal of Nutrition*. 117(1): 56-62.
- Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58(3): 572-582.
- Leedle, J. A., M. P. Bryant, and R. B. Hespell. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(2): 402-412.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. J. Ranilla, M. E. Martinez, C. Saro, and M. D. Carro. 2009. *J. Dairy Sci.* 92(11): 5659-5668.
- Ranilla, M. J., and M. D. Carro. 2003. *J. Anim. Sci.* 81(2): 537-544.
- Sharma, R., S. J. John, M. Damgaard, and T. A.

McAllister. 2003. *Biotechniques*. 34: 92-97. • Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. *J. Anim. Sci.* 79(10): 2736-2746. • Yu, Z., and M. Morrison. 2004. *Biotechniques*. 36: 808-812.

Tabla 1. Efecto del tipo de forraje (FOR) y tiempo de muestreo tras la administración de alimento (T) en el contenido en materia seca (MS) y la cantidad de ADN bacteriano (ADNb) del contenido ruminal 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	Valor de P		
	0	4	8		FOR	T	FOR x T
MS (%)							
AL	22,8 ^a	24,5 ^b	23,2 ^{ab}	0,54	0,634	0,013	0,963
GR	23,0 ^a	24,9 ^b	23,3 ^{ab}				
ADNb en el contenido ruminal (µg ADNb / g materia fresca)							
AL	75,3 ^a	48,0 ^b	68,5 ^{ab}	7,13	0,843	0,008	0,968
GR	72,3 ^a	48,7 ^b	67,3 ^{ab}				
ADNb en el contenido sólido (µg ADNb / g materia seca)							
AL	290 ^a	179 ^b	245 ^{ab}	26,7	0,664	0,008	0,868
GR	265 ^a	180 ^b	241 ^a				
ADNb en el líquido ruminal (µg ADNb / mL)							
AL	12,3 ^a	5,78 ^b	14,8 ^a	1,621	0,895	<0,001	0,750
GR	13,4 ^a	4,32 ^b	14,7 ^a				
% ADN bacteriano en la MS							
AL	87,7 ^{ab}	91,3 ^a	83,9 ^b	2,15	0,378	0,006	0,690
GR	84,3 ^a	91,6 ^b	82,3 ^a				

^{a,b} En la misma fila, valores con diferente superíndice difieren (P<0,05)

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyectos AGL-2004-04755-CO2-01 y AGL2008-04707-CO2-02) y la Junta de Castilla y León (Proyecto GR158). C. Saro disfruta de una beca FPU del MEC (AP 2006-03049).

DISTRIBUTION OF BACTERIAL POPULATION IN LIQUID AND SOLID DIGESTA IN THE RUMEN OF SHEEP FED TWO FORAGE DIETS

ABSTRACT: Four cannulated merino sheep were used to evaluate the effects of two diets (AL: 70:30 alfalfa hay:concentrate; GR: 70:30 grass hay:concentrate) and the sampling time (0, 4 and 8 hours post-feeding) on the distribution of bacteria between the liquid and solid phase in ruminal digesta. Real time PCR was used to measure bacterial DNA (DNAb) concentration in both phases. Forage type did not affect DNAb concentration in the solid (P=0.664), the liquid (P=0.895) or total (P=0.843) ruminal digesta. Amount of DNAb at 4 hours post-feeding was lower than just before feeding in both the solid and liquid digesta (P<0.05 and 0.001 respectively), but recovered initial values at 8 hours post feeding. This may have been due to the lag time that takes bacteria to attach fiber particles. Proportion of bacteria in the solid digesta ranged from 82.6% to 91.3% of total ruminal bacteria, and was higher (P<0.05) at 4 hours compared with that at 0 and 8 hours post-feeding. These results confirm that solid-associated bacteria represent the major proportion of ruminal bacteria in ruminants fed forage diets, and indicate that forage quality has no influence on their relative proportion.

Keywords: solid-associated bacteria, rumen, rtPCR