

## CUANTIFICACIÓN DE PROTOZOOS EN EL FLUIDO RUMINAL MEDIANTE RECUESTO EN CÁMARA Y PCR EN TIEMPO REAL

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

Diversos factores, como la relación forraje:concentrado, el tipo de forraje o el nivel de alimentación influyen en la población de protozoos del rumen (Dehority y Orpin, 1997). La forma tradicional de determinar la concentración de protozoos en el líquido ruminal ha sido realizar recuentos de los mismos en una cámara de recuento. En la actualidad existen técnicas moleculares con las cuales es fácil y rápido el cuantificar el número de copias de un gen en una muestra, y estas técnicas han sido adaptadas para la cuantificación de los protozoos ruminales (Sylvester et al., 2004). Sin embargo no existen estudios que hayan comparado ambas técnicas para el conteo de protozoos en el líquido ruminal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los resultados obtenidos realizando la cuantificación de protozoos mediante PCR en tiempo real (qPCR) comparándolos con el método del recuento.

### 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 era 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 PV<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 misma administración de la primera toma de alimento en dos días no consecutivos. El contenido ruminal se filtró a través de dos capas de gasa para obtener el fluido ruminal. De este fluido, una muestra de 2 mL se mezcló con 2 mL de una solución de formalina al 50% y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad hasta el recuento de protozoos. Otra muestra de 5 mL fue congelada inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la extracción de ADN.

Los recuentos se hicieron de cada muestra por duplicado en una cámara Hausser Nageotte Bright, en 10 campos microscópicos y a 40 aumentos. Cuando el coeficiente de variación entre réplicas era mayor de 10% se contó una tercera muestra. Los recuentos fueron realizados según los procedimientos descritos por Dehority (1993), y los datos se expresan en número de protozoos por mL.

Las muestras de líquido ruminal para la cuantificación de protozoos mediante qPCR se descongelaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , se tomó 1 mL y se centrifugó ( $13000 \times g$ , 15 minutos). Se descartó el sobrenadante y se extrajo el ADN del pellet utilizando el kit QIAamp DNA stool (QIAGEN, Valencia, CA, EEUU). Los pellets se mezclaron con el 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. La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Yu y Morrison (2004), pero incluyó un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR. El ADN de todas las muestras se diluyó 1:10 antes de realizar los análisis de qPCR en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Se utilizaron cebadores previamente validados para el ADN codificante del gen del ribosoma 16S bacteriano (Denman y McSweeney, 2006) y el gen del ribosoma 18S de los protozoos (Sylvester et al., 2004). Como estándares para la cuantificación de las bacterias se utilizaron pellets de bacterias asociadas a la fase líquida que se aislaron del rumen de las ovejas siguiendo los procedimientos descritos por Ramos et al. (2009). Las condiciones de PCR fueron:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos y  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 minuto, seguidos de una curva de desnaturalización. Cada mezcla de PCR (20  $\mu\text{L}$ ) contenía: 10  $\mu\text{L}$  de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,9  $\mu\text{L}$  de cada primer, 2  $\mu\text{L}$  de muestra de

ADN y agua destilada hasta un volumen final de 20  $\mu$ L. Los valores obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y los datos de protozoos se expresan en relación a la cuantificación absoluta de bacterias según los cálculos descritos por Livak y Schmittgen (2001).

Los resultados obtenidos por cada método 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, tiempo de muestreo y el período se consideraron efectos fijos, mientras que la oveja se consideró efecto aleatorio. La significación estadística se estableció en  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos con las dos dietas experimentales. Para las dos dietas, en el recuento de protozoos con cámara (Figura 1A) se observó una disminución del número de los mismos a las 4 ( $P < 0,001$  y  $0,012$  para las dietas AL y GR, respectivamente) y 8 horas ( $P < 0,001$  y  $0,034$ ) tras la administración del alimento. La concentración de protozoos fue mayor ( $P = 0,015$ ) con la dieta AL que con la dieta GR. En cambio, los resultados obtenidos mediante la cuantificación relativa a la cantidad de bacterias totales mediante qPCR fueron diferentes, ya que la cantidad de protozoos en el líquido ruminal no varió ( $P = 0,355$ ) con el tiempo de muestreo y fue mayor ( $P = 0,010$ ) cuando las ovejas recibían la dieta GR que cuando ingerían la dieta AL (Figura 1B). Cuando se utilizó el método de cálculo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en el que la cantidad de protozoos en cada tiempo de muestreo se expresó en relación a la observada a la hora 0, no se observó efecto del tiempo de muestreo con la dieta AL ( $P > 0,05$ ), pero con la dieta GR la cantidad relativa de protozoos a las 4 horas fue mayor ( $P < 0,05$ ) que la cantidad observada antes de la administración de alimento y no existieron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre las 0 y 8 horas (Figura 1C). Los resultados contradictorios obtenidos con los dos métodos podrían ser debidos al hecho de que con el método qPCR la variación en el número de protozoos se expresa en términos relativos, en función de la cuantificación absoluta de las bacterias totales. Como se observa en la Figura 1D, con las dos dietas la cantidad de bacterias totales en el fluido ruminal a las 4 horas post-alimentación fue menor ( $P < 0,05$ ) que la observada a las 0 horas. Por ello, aunque se hubiera producido también una disminución del número de protozoos a las 4 horas, si esta hubiese sido de menor magnitud que la de las bacterias, el resultado final sería la ausencia de cambios o incluso un aumento relativo de la cantidad de protozoos.

La disminución postprandial de la concentración de protozoos observada con los recuentos coincide con los resultados de otros autores utilizando el mismo método (Dehority y Orpin, 1997; Santra et al., 1998), y se ha atribuido a la migración de protozoos hacia las partículas de alimento y la dilución provocada por la secreción de saliva (Dehority y Orpin, 1997). Por otra parte, Valiki et al. (2009) utilizaron qPCR para realizar una cuantificación relativa de los protozoos ruminales en el líquido ruminal de ovejas y observaron que la cantidad de protozoos, expresada en relación a la cantidad de bacterias, aumentaba significativamente a las 4 horas tras la ingestión de alimento. Los resultados del presente estudio indican que la utilización de la cuantificación relativa de protozoos mediante qPCR puede producir resultados diferentes de los obtenidos mediante la técnica clásica del recuento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dehority, B.A., and C.G. Orpin. 1997. Pages 196-245 in *The Rumen Microbial Ecosystems*. Hobson, P. N., and C. S. Stewart, eds. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, London. • Dehority, B.A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. Boca Raton, CRC Press. • Denman, S.E., and C.S. McSweeney. 2006. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58(3): 572-582. • Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. *Methods.* 25(4): 402-408. • Ramos, S., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, M.E. Martínez, C. Saro, and M.D. Carro. 2009. *J. Dairy Sci.* 92(11): 5659-5668. • Santra, A., S.A. Karim, A.S. Mishra, O.H. Chaturvedi, and R. Prasad. 1998. *Small Rum. Res.* 30:13-18. • Sylvester, J.T., S.K.R. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, and J.L. Firkins. 2004. *J. Nutr.* 134(12): 3378-3384. • Yu, Z., and M. Morrison. 2004. *Biotechniques.* 36: 808-812. • Valiki, A., M.D. Mesgaran, A.H. Mousavi, R. Valizadeh, D.R. Yáñez Ruiz, and C.J. Newbold. 2009. *Proc. of the BSAS 2009 Ann. Meeting.* Page 173.

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).

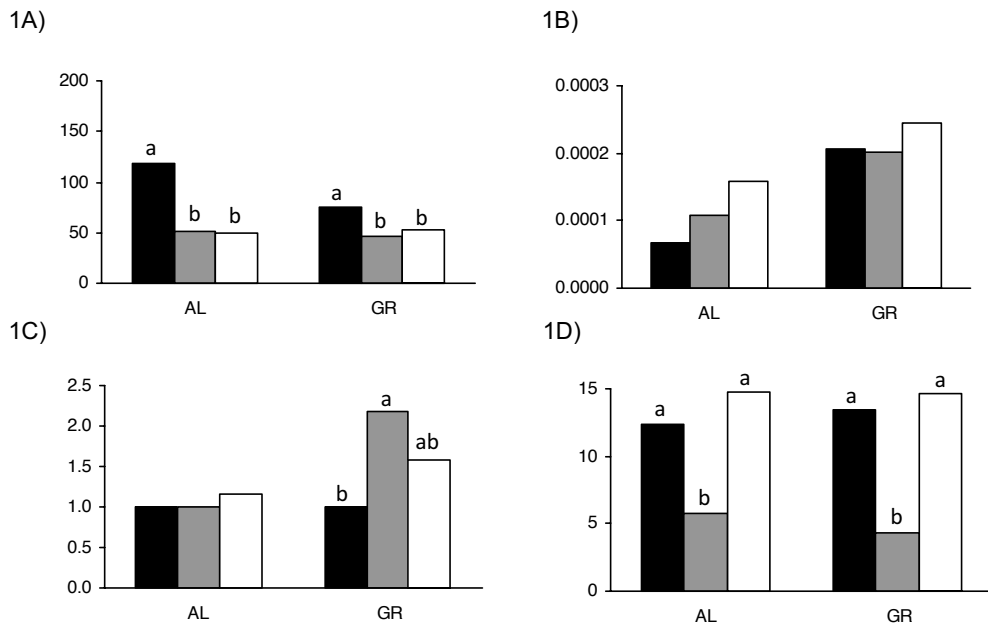


Figura 1. Evolución postprandial en el líquido ruminal de ovejas alimentadas con dos dietas con relación forraje:concentrado 70:30 y heno de alfalfa (AL) o heno de gramíneas (GR) como forraje de la cantidad de protozoos determinados por recuento directo (número de protozoos x 10<sup>4</sup>/mL; Figura 1A), mediante qPCR y cuantificación relativa a la cantidad de bacterias totales, expresada como  $2^{-[(Cq \text{ protozoos} - Cq \text{ bacterias totales)} \text{ muestreo X}]}$ , Figura 1B) o como  $2^{-[(Cq \text{ protozoos} - Cq \text{ bacterias totales)} \text{ muestreo X}] - [(Cq \text{ protozoos} - Cq \text{ bacterias totales)} \text{ muestreo 0}]}$ , siendo los tiempos de muestreo (X) las 0, 4 y 8 horas tras la administración de alimento (Figura 1C), y evolución de la cantidad de ADN bacteriano (µg ADN/mL) determinado mediante qPCR (Figura 1D). Para cada dieta, los valores con diferente letra en la columna difieren (P<0,05) entre sí.

□ 0 horas ▒ 4 horas post alimentación ■ 8 horas post alimentación.

#### QUANTIFICATION OF PROTOZOA POPULATIONS IN RUMEN FLUID AS DETERMINED BY MANUAL COUNTING AND REAL TIME PCR

**ABSTRACT:** Four cannulated merino sheep were used to evaluate the real time PCR (qPCR) method to quantify protozoa populations in rumen fluid. Two diets were formulated with 70:30 forage:concentrate ratio and alfalfa hay (AL) or grass hay (GR) as forage. Rumen fluid was sampled before feeding (0 h) and 4 and 8 h after feeding. Protozoa data from qPCR were expressed relative to absolute quantification of total bacteria population and were compared with results from manual counting of protozoa in a microscopic chamber. Results from both methods were different. In manual counting a decrease in protozoa number was observed at 4 and 8 hours post feeding (P<0.05), whereas qPCR results did not detect any change (P<0.05) between sampling times. Protozoa population was higher (P<0.015) for AL compared with GR diet with manual counting, whereas diet GR promoted a higher (P<0.010) protozoa population than AL diet with the qPCR method. Differences between methods may have been due to the fact that the results were expressed in relation to total bacteria quantification, and bacteria concentrations varied between sampling times.

Keywords: protozoa, qPCR, rumen, sheep