

EFFECTO DEL NIVEL DE FIBRA SOLUBLE E INSOLUBLE SOBRE EL PERFIL BACTERIANO EN CECOTROFOS DE CONEJOS EN CRECIMIENTO

Rodríguez-Romero, N¹., Abecia, L²., Fondevila, M.

Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón, Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. ¹ Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela. ² Instituto en Formación de Nutrición Animal, Estación Experimental Zaidín, C.S.I.C., Granada.

mfonde@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La fibra es un componente cuantitativamente importante en piensos de conejos y es el principal sustrato energético para la microbiota residente en los tramos finales del aparato digestivo; además, afecta al tiempo de permanencia de la digesta en el ciego, principal compartimento de fermentación, y a sus condiciones ambientales. Como consecuencia, variaciones en el nivel y tipo de fibra en el pienso han sido relacionadas frecuentemente con la densidad y composición de la comunidad microbiana, aunque no se dispone de bibliografía específica en este punto. Los cecotrofos incorporan una considerable concentración de bacterias, habiendo sido propuestos como índice cuantitativo y cualitativo de la población cecal (Micheland et al., 2007; Rodríguez-Romero et al., 2009). El objetivo de este trabajo fue evaluar, a través de los cecotrofos, las características de la población microbiana de conejos en crecimiento alimentados con dietas altas en fibra formuladas con diferentes niveles de fibra soluble e insoluble.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cecotrofos de 24 conejos de raza Neozelandesa, que consumieron dietas formuladas con dos niveles de fibra insoluble (FND; BI: 370 y AI: 460 g/kg) y dos de fibra soluble en detergente neutro (FS; BS: 150 y AS: 180 g/kg) desde el destete a los 28 días (n=6), en instalaciones con ambiente controlado (18-24°C y 12/12 horas de luz/oscuridad). A los 49 días de edad los conejos fueron alojados individualmente y se les colocaron collares cervicales (6 cm d.i y 27 cm d.e) durante 24 horas para evitar la cecotrofia y recoger los cecotrofos (CT), en tres periodos, con dos animales por tratamiento en cada periodo. La proteína bruta (PB) de las dietas y los cecotrofos se analizó por el método Kjeldahl, la FND por el método ANKOM según Van Soest et al. (1991) descontando las cenizas y la FS según Hall et al. (1997).

La biodiversidad bacteriana (IB) se estimó mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE). Se extrajo el ADN de los cecotrofos con el kit QIAamp DNA (QIAGEN, West Sussex, UK) y un fragmento del gen del ARNr 16S se amplificó por PCR usando los cebadores universales de bacterias 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' y 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (Muyzer et al. 1993). El programa de la PCR fue: 94°C por 4 min; 32 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, y finalmente 72°C 4 min, en un volumen total de 50 µl de una mezcla con 0.25 µl de cada cebador, 1 µl de dNTPs (10 mM), 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.50 µl de Taq polimerasa (5u/µl), 10 µl de buffer Green Go Taq (5X) y 1 µl de la extracción de ADN (5 ng/µl). Para verificar el tamaño de los productos de la PCR esperados (200-250 pb), las ampliificaciones resultantes se analizaron en gel de TBE agarosa al 1,5% (p/v). Los productos de PCR (16µl) fueron cargados en un gel de poliacrilamida 8% (p/v) con un 40-60% de gradiente desnaturizante. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 V y a una temperatura de 60°C durante 16 h. El gel se tiñó con el kit DNA Silver Staining (Amersham Biosciences) y la imagen fue analizada usando el programa Quantity One. El dendrograma se construyó utilizando el algoritmo UPGMA a partir del coeficiente Dice. A partir de la identificación de bandas resultantes, las muestras de ADN se compararon usando una matriz de similitud y se estimó el IB de Shannon modificado (Buckland et al., 2005) a partir de un código binario (0-1) en base a su presencia o ausencia. Las bacterias totales se cuantificaron mediante PCR a tiempo real usando un ABI PRISM® 7000 con cebadores para amplificar el gen del ARNr 16S: BAC338F (ACTCCTACGGGAGGCAG) y BAC805R (GACTACCAGGGTATCTAATCC) (Yu et al., 2005). Se añadieron 2 µl del ADN a la reacción de amplificación (25 µl volumen total) que

contenía 0,2 µl de cada cebador y 12,5 µl de Master Mix Power SYBR® Green qPCR de Applied Biosystems. Se usaron tres réplicas de cada muestra de ADN y agua destilada estéril como control negativo. La recta de calibración se estableció con una mezcla de concentración conocida de ADN de cecotrofos diluido desde 10^{-1} a 10^{-5} . El programa de la PCR fue: 95°C, 10 min; 40 ciclos a 95°C, 15 segundos y 61°C, 1 min. La eficiencia de la PCR fue de 99.4%.

Los resultados se analizaron por ANOVA según una estructura factorial 2x2, considerando el periodo experimental como bloque, mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (versión 8.2). Las medias de los tratamientos fueron comparadas por la mínima diferencia significativa ($P<0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución de las comunidades microbianas en los cecotrofos de los conejos de cada tratamiento se muestra en la Figura 1. El dendrograma muestra que las comunidades bacterianas se agruparon en clados diferenciados fundamentalmente por el nivel de fibra soluble. Dentro del nivel bajo de fibra soluble, las comunidades cecales de los cecotrofos se diferenciaron en función de su nivel de fibra insoluble (BIBS vs. AIBS), mientras que éste componente no influyó en la similitud de comunidades bacterianas de los animales que recibieron las dietas altas en fibra soluble (BIAS vs. AIAS). El índice de similitud bacteriana dentro de cada tratamiento aumentó en respuesta al nivel tanto de fibra soluble como insoluble, mostrando una menor dispersión intragrupo cuando los animales recibieron mayores aportes de nutrientes para el ciego (niveles de similitud de 58,5; 69,2; 68,9 y 74,0 % con BIBS, BIAS, AIBS y AIAS, respectivamente).

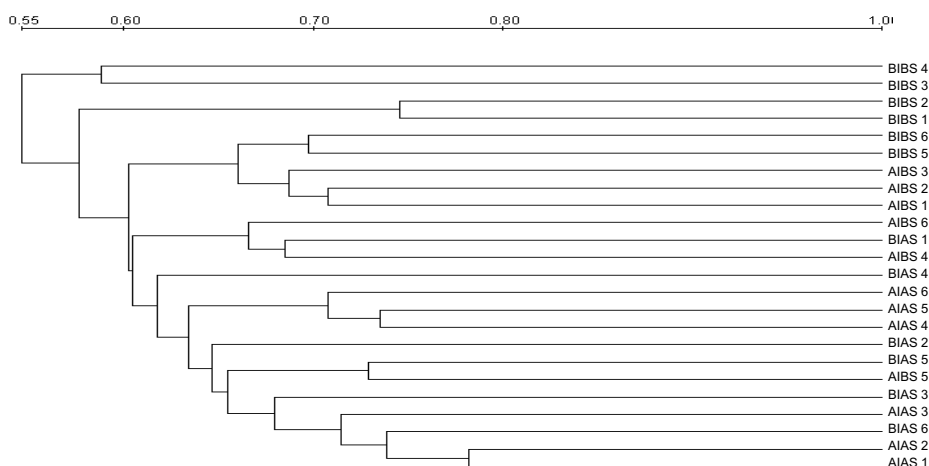


Figura 1. Dendrograma de biodiversidad bacteriana en cecotrofos de conejos en crecimiento alimentados con dos niveles de FND y FS.

La biodiversidad de las comunidades cecales estimada a partir del índice de Shannon (Tabla 1) no fue afectada por el nivel de FND ($P>0,05$), pero incrementó ($P<0,01$) con la FS, resultando superiores a los del contenido cecal que les dio origen (3,10; 3,22; 3,17 y 3,27 para BIBS, BIAS, AIBS y AIAS, respectivamente) y a los obtenidos en contenido cecal y cecotrofos por Micheland et al. (2007) estimados mediante CE-SSCP. Por contra, el incremento de la FND de la dieta provocó un descenso ($P<0,05$) en la cantidad de ADN total obtenido en cecotrofos mediante qPCR, mientras que el nivel de FS no afectó su valor ($P>0,05$). La concentración de PB en cecotrofos respondió de forma similar, disminuyendo en mayor proporción (4,18 u.p.) por efecto de la FND ($P<0,001$), y también se incrementó en 1,93 unidades porcentuales (u.p.) por efecto de la fibra soluble ($P<0,01$).

Tabla 1. Índice de diversidad de Shannon y concentración de ADN bacteriano (ng DNA/mg MS) en cecotrofos de conejos en crecimiento alimentados con dos niveles de FND y FSDN.

	BIBS	BIAS	AIBS	AIAS	DE	Probabilidad	
						FND	FS
Índice de Shannon	3,94 ^b	4,09 ^a	4,00 ^{ab}	4,13 ^a	0,12	NS	**
ng ADN/mg MS	429,96 ^{ab}	526,27 ^a	362,73 ^b	380,48 ^b	102,32	*	NS
PB en cecotrofos (%)	24,11 ^a	25,32 ^a	19,21 ^c	21,87 ^b	0,93	***	**

DE: desviación estándar; ***: P<0,001; **: P<0,01; *: P<0,05; NS: P>0,10

La FS aporta al ciego nutrientes rápidamente fermentables, mientras que la fermentación de la FND está limitada por el rápido ritmo de tránsito; ambos factores justifican una relación entre la concentración bacteriana cecal y la disponibilidad de nutrientes, positiva para el nivel de FS y negativa para el de FND. Por otra parte, la fracción fibrosa cecal, con una alta concentración de las bacterias implicadas en su degradación, es vehiculada mediante las heces duras, por lo que el estudio de la biodiversidad en función del tipo de fibra dietética a partir del muestreo de cecotrofos, que incorporan la población asociada al material de menor tamaño, pudiera estar mediatizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buckland S. T, Maguran A.E., Green R.E., Fewster R.M. 2005. Phil. Trans. R. Soc. B. 360:243-254
- Hall, M.B., Lewis B.A., Van Soest P.J., Chase L.E., 1997. J. Sci. Food Agric. 74, 441-449
- Michelland R, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Monteils V, Fortun-Lamothe L. 12^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 2007, France, 77-80
- Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59:695-700
- Rodríguez-Romero N., Abecia L., Balcells J., Martínez B., Fondevila M. 2009. II Simposio de Metodologías aplicadas al estudio de la microbiología digestiva, Zaragoza. XIII Jornadas sobre Producción Animal, AIDA (II), 784-786
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. 1991. J. Dairy Sci. 74:3583-3597
- Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. 2005. Biotechnol. Bioeng. 89:670-679.

EFFECTS OF SOLUBLE AND INSOLUBLE FIBRE DIETARY LEVELS ON BACTERIAL PROFILE IN CAECOTROPHES FROM GROWING RABBITS

ABSTRACT: The effect of neutral detergent fibre (NDF) and soluble fibre (NDSF) on bacterial diversity of caecotrophes from growing rabbits was studied. Four diets were formulated according to two levels of NDF (BI: 370 and AI: 460) and two levels of NDSF (BS: 150 and AS: 180) in a 2x2 factorial structure (n=6). Caecotrophes from 24 rabbits (49 days old) were obtained and bacterial biodiversity (IB) and total bacterial DNA concentration were determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real time PCR. Bacterial communities clustered according to their NDSF level, and, within BS, were separated by the NDF level. Shannon Index was not affected by the level of NDF (P>0.05), but increased (P<0.01) with the NDSF from 3.97 to 4.11. Total DNA decreased (P<0.05) with NDF, and the crude protein content of caecotrophes decreased with NDF (P<0.001) and increased with SF (P<0.01). Results indicate that the level of NDSF positively affects concentration and diversity of the caecal microbiota.

Keywords: rabbit, caecotrophes, bacterial biodiversity, bacterial concentration.