

BACTERIAS TOTALES COMO PARTE DEL N ENDÓGENO EN RATAS ALIMENTADAS CON VIGNA UNGUICULATA

Fernández-Figares1, I., Ruiz1, R., Kapravelou2, G., Porres2, J.M., Rubio1, L.A.

1 Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (EEZ, CSIC). Camino del Jueves s/n Armilla 18100. Granada.

2 Departamento de Fisiología. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Granada.

ifigares@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Las legumbres son fuentes importantes de nutrientes esenciales en la dieta y tienen un gran potencial en nutrición animal y humana aunque contienen compuestos antinutritivos que pueden interferir con su valor nutricional. Vigna unguiculata (Vigna) es una legumbre muy consumida en Asia, Centro y Sudamérica y África (Nwokolo y Smartt, 1996). Tradicionalmente, las legumbres se procesan para mejorar su palatabilidad y destruir compuestos antinutritivos siendo el remojo, el cocinado, la germinación o la fermentación los métodos más ampliamente usados y efectivos (Urbano et al., 2007). El uso de estos métodos de procesado de las legumbres podría alterar la excreción endógena de los animales alimentados con las mismas. No se conocen bien los efectos de las diferentes condiciones de procesado de los alimentos en la excreción endógena o la población bacteriana del intestino grueso. El objetivo de este trabajo fue estudiar si procesos tecnológicos sencillos como la fermentación natural y el calentamiento afectan el número de bacterias a nivel fecal en ratas alimentadas con dietas cuya única fuente de proteína fue la Vigna.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cincuenta ratas albinas Wistar de 3 semanas de edad, recién destetadas, se distribuyeron en 5 grupos experimentales: Caseína o control (CM), Vigna cruda (V), Vigna fermentada naturalmente (FV), Vigna fermentada naturalmente y autoclavada (FVA) y proteinopriva (PP) para determinar las pérdidas fecales endógenas, y se mantuvieron en jaulas metabólicas diseñadas para recoger separadamente heces y orina en un laboratorio termorregulado con ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Cada grupo consumió ad libitum una de las dietas experimentales durante 10 días excepto el grupo consumía la dieta PP que la consumió durante 6 días. Tras un periodo de adaptación de 3 días (2 para PP) se realizó una recogida total de excreta durante 7 días (4 para PP) conservándose las heces a -20°C hasta su liofilización. Las dietas, isoproteicas (12% PB, excepto la PP) e isoenergéticas, se formularon para cubrir las necesidades de ratas en crecimiento (NRC, 1995). Para ajustar la cantidad y el tipo de fibra dietaria a los de la Vigna (Martín-Cabrejas et al., 2004) la dieta CM se suplementó con las siguientes fuentes de fibra: celulosa, agar-agar, xilano de centeno, almidón de patata y lignina como fuentes de fibra insoluble (30,1, 31,3, 5,1, 18,5, y 15,0% del total de fibra insoluble, respectivamente) y pectina de cítrico como fibra soluble. Las semillas de Vigna se lavaron con agua destilada, se secaron en estufa y se molieron previamente a la preparación de las dietas. Fermentación (dieta V): La harina de Vigna cruda se suspendió en agua estéril permitiéndose la fermentación con los microorganismos presentes de forma natural en la semilla (Doblado et al., 2003) a 37°C durante 48h sin aireación en un fermentador con agitación y tras la fermentación se liofilizó la harina. Tratamiento térmico de la harina fermentada: La harina V se esterilizó con calor seco durante 20 min a 121°C. Análisis estadístico: Los datos fueron sometidos a un ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se estimaron mediante el test de Duncan utilizando el paquete estadístico StatGraphics. La extracción y purificación de ADN se llevó a cabo a partir de heces liofilizadas y molidas utilizando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Cat. no 51504) (Ruiz y Rubio 2009): La cuantificación de bacterias totales se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa y se utilizaron los oligonucleótidos F-tot (directo) 5'-GCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' y R-tot (reverso) 5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' (Castillo et al., 2006). Las curvas estándar se construyeron utilizando el plásmido resultante de clonar el producto de amplificación por PCR del gen rRNA 16S de *Escherichia coli* en el vector pCRTM4-TOPOTM. La función que describe la relación entre C_t (ciclo umbral) y el logaritmo del número de copias (x) fue $C_t = 1,741 - 3,578 x$; $R^2 = 0,998$. La PCR cuantitativa

se llevó a cabo utilizando la mezcla FastStart Universal SYBR Green (ROX). Las condiciones de reacción fueron 95°C 10 minutos, 40 ciclos de 95°C 15 segundos y 60°C 1 minuto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las ratas alimentadas con dietas basadas en harina de Vigna tuvieron un número mayor de bacterias a nivel fecal que las dietas de caseína (Fig. 1). La fermentación o el calentamiento no produjeron cambios en el recuento de bacterias totales a nivel fecal. Las diferencias en el contenido en caseína (dietas PP y CM) no dieron lugar a diferencias significativas en el recuento de bacterias totales en heces. Las bacterias fecales son una fracción de las pérdidas endógenas fecales, no distinguiéndose normalmente qué parte del endógeno corresponde a microflora. Marcando la proteína endógena con ¹⁵N se puso de manifiesto que existe una contribución del N bacteriano (con menor enriquecimiento isotópico relativo) a la digesta (Lien et al., 1997). Además, los microorganismos son ricos en proteína (Neidhardt et al., 1990), y no sólo pueden utilizar los aminoácidos no absorbidos sino que pueden sintetizarlos de novo (Fuller y Reeds 1998). Por estas razones, la determinación de la contribución de la microflora a la digesta total es de interés en nutrición animal. Las pérdidas endógenas pueden estimarse suministrando una dieta proteinopriva a un grupo de animales asumiendo que el nitrógeno determinado a nivel ileal o fecal corresponde a las pérdidas endógenas de los animales en experimentación que toman las dietas problema en paralelo. Esta aproximación no está exenta de inconvenientes y aunque se han propuesto alternativas para mejorarla (Fuller y Reeds, 1998), sigue siendo la técnica más empleada. El contenido en ácido diaminopimélico (DAPA), presente en la pared celular de bacterias, o el contenido en D-Ala se han utilizado como marcadores de proteína de origen bacteriano (Masson et al., 1991, Schoenhusen et al., 2008). Rubio (2003) estimó por medio del DAPA que el N bacteriano constituye entre el 50 y el 80 % del N total en heces de ratas alimentadas con legumbres. Sin embargo, el uso de técnicas moleculares ha revolucionado el estudio de la microflora digestiva permitiendo tanto la cuantificación como la tipificación de la misma. Así, en el presente trabajo se ha realizado el recuento de bacterias totales en heces de ratas alimentadas con diferentes fuentes de N en la ración.

En conclusión, los animales alimentados con caseína tuvieron mucho menor contenido bacteriano que los alimentados con dietas basadas en Vigna. Por tanto, como se ha sugerido anteriormente, una parte muy significativa del N endógeno fecal en ratas alimentadas con leguminosas pertenece a la fracción bacteriana, lo que cuestiona el uso de raciones proteinoprivas para estimar la excreción endógena de N. La fermentación y el tratamiento térmico de la harina de Vigna no tuvieron ningún efecto sobre el contenido total de bacterias a nivel fecal. La cuantificación de los grupos bacterianos predominantes en la flora fecal podría dar información valiosa sobre el posible efecto prebiótico de la Vigna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martín, M. & Gasa, J. 2006. *Vet Microb.* 114:165-70. • Doblado, R., Frias, J., Muñoz, R. & Vidal-Valverde C. 2003. *J Food Prot.* 66:2313-20. • Fuller, M.F., & Reeds, P.J. 1998. *Annu Rev Nutr.* 18:385-411. • Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M. & Moller, K. 2002. *Appl Environ Microbiol.* 68, 673-90. • Lien, K.A., Sauer, W.C. & Dugan ME. 1997. *J Anim Sci.* 75:159-69. • Martín-Cabrejas, M.A. Sanfiz, B., Vidal, A., Mollá, E., Esteban R. & López-Andréu F.J. 2004. *J Agric Food Chem.* 52:261-6. • Masson, H.A., Denholm, A.M. & Ling J.R. 1991. *Appl. Environ. Microb.* 57:1714-20. • National Research Council. 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th revised ed., Washington, DC: National Academy Press. • Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. & Schaechter M. 1990. *Physiology of the Bacterial Cell Wall: A Molecular Approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer. • Rubio, L.A. 2003. *Br J Nutr.* 90:301-309. • Ruiz, R. & Rubio, L.A. 2009. *J Sci Food Agric.* 89:723-7. • Nwokolo, E. & Smartt, J. 1996. *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. Pags 229-240. Chapman & Hall. • Schoenhusen, U., Voigt, J., Hennig, U., Kuhla, S., Zitnan, R. & Souffrant W.-B. 2008. *Vet Med.* 53:184-92 • Urbano, G., Porres, J.M Frias, J. & Vidal-Valverde, C. 2007. Lentil nutritional value. En: *Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*. Vol. 1, pgs 47-94, Springer.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos AGL2009-8916, AGL2007-62044 y PET2008-0311.

TOTAL BACTERIA AS PART OF FECAL ENDOGENOUS LOSSES OF N IN RATS FED WITH VIGNA UNGUICULATA

ABSTRACT: Legumes are important sources of nutrients in animal and human nutrition although they have antinutritional factors as well. Heat treatment and fermentation are common processes used to improve palatability and inactivate antinutritional factors of legumes. The intestinal microbiota is a fraction of endogenous losses very relevant in animal nutrition studies. The aim of this study was to ascertain if heat and germination of *Vigna sinensis* affect the number of bacteria of faeces in rats. Wistar rats (n=50) kept in metabolism cages were fed ad libitum isoenergetic diets containing Vigna flour (raw, fermented or fermented and heated), casein or a protein free diet. After 4 days of adaptation separate faeces and urine collection was performed for 6 days. Total count of bacteria in freeze-dried faeces was determined by real-time PCR. Vigna rats had significantly higher total faecal bacteria counts than casein and protein free rats. Fermentation or heat treatment did not alter faecal bacterial counts. In conclusion, the use of a protein free diet to estimate endogenous losses, underestimates the bacteria fraction of rats fed *Vigna unguiculata*.

Keywords : bacteria, endogenous losses, rat, *Vigna unguiculata*

Figura 1 . Recuento de bacterias fecales totales (n° copias 16S/mg materia seca), en ratas alimentadas con dietas normoproteicas cuyas fuentes de proteína eran caseína (CM), harina de Vigna cruda (V), fermentada (FV) o fermentada y autoclavada (FVA) o una dieta hipoproteica de caseína (PP).

