EFECTO DE LA INCLUSION DE COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS EN LA DIETA SOBRE BACTERIAS DEL GRUPO BUTYRIVIBRIO EN FERMENTADORES DE FLUJO CONTINUO

E. Ramos-Morales, G. Martínez, L. Abecia, A.I. Martin-García, E. Molina-Alcaide, D.R. Yáñez-Ruiz.
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008, Granada, Spain
eva.ramos@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se están desarrollando estrategias que permitan manipular la biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen, mediante la identificación de los microorganismos responsables del proceso, así como de compuestos que puedan alterar su actividad (Lourenço et al., 2010). El objetivo principal es reducir la formación de ácidos grasos saturados e incrementar la concentración de insaturados, particularmente *cis*-9, *trans*-11 CLA, en el rumen para su posterior absorción e incorporación a los productos derivados de los rumiantes. También se persigue el aumento de la concentración de ácido vaccénico (VA) en el rumen, puesto que éste puede actuar como sustrato para la formación de *cis*-9, *trans*-11 CLA en los tejidos. Las bacterias pertenecientes al grupo *Butyrivibrio* son las conocidas con mayor actividad en el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen. *Butyrivibrio fibrisolvens* es capaz de hidrogenar el ácido linoleico a CLA y VA y *Butyrivibrio proteoclasticus* lo reduce a esteárico. El uso de compuestos derivados del ajo ha despertado un gran interés como alternativa al empleo de antibióticos para la manipulación de la fermentación ruminal. Estudios *in vitro* en nuestro laboratorio (Ramos-Morales et al., 2013) han mostrado que la biohidrogenación del ácido linoleico resultó afectada por compuestos de este tipo: dialil disulfuro (DDS) y propil propano tiosulfinato (PTS), dando lugar a un aumento en la acumulación de VA. El objetivo de este trabajo fue establecer si los efectos de DDS y PTS sobre la biohidrogenación ruminal podrían haber estado asociados con cambios dentro de la población del grupo *Butyrivibrio*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 fermentadores de flujo continuo simple (1 l) en dos periodos replicados de 12 días cada uno. El inóculo ruminal (700 ml/fermentador) se obtuvo de 8 cabras de raza murciano-granadina, canuladas en rumen y alimentadas a base de heno de alfalfa y concentrado (1:1). Para cada período, tres de los fermentadores se inocularon con una mezcla de contenido ruminal procedente de tres animales distintos seleccionados al azar. Los fermentadores recibían la misma dieta (16 g/fermentador/día) que los animales donadores del inóculo en dos tomas, a las 9:00 y a las 14:00 h. Además, a dos fermentadores por periodo se les adicionó 80 μl/l o 200 μl/l al día de DDS y PTS, respectivamente. De esta manera en los dos períodos se utilizaron 4 inóculos distintos y 4 fermentadores por tratamiento (control, PTS y DDS). Al final de cada periodo, se extrajo contenido de los vasos de fermentación a las 0, 2 y 4 h tras la alimentación y se hizo una mezcla que se conservó a -80ºC, para la extracción de ADN. Se cuantificó la abundancia de bacterias totales (Maeda et al. 2003) y la abundancia relativa a bacterias totales (ΔCt) de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Butyrivibrio proteoclasticus* mediante PCR a tiempo real (Potu et al., 2011). La biodiversidad y estructura del grupo *Butyrivibrio* se estudió mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) según describen Kim et al. (2008). El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un modelo univariante GLM del programa SPSS 19.0, considerando la mezcla del contenido ruminal inoculado a los fermentadores como covariable. Las diferencias entre medias se establecieron utilizando el test DMS ($P<0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de copias de bacterias totales presentes en los fermentadores no mostró diferencias ($P=0,941$) debidas al tratamiento con DDS y PTS (Tabla 1). Igualmente, la abundancia de *B. proteoclasticus,* expresada como proporción del total de bacterias, no se

vió afectada (P=0,699). Sin embargo, la abundancia de *B. fibrisolvens* resultó mayor (P=0,009) en las muestras procedentes de fermentadores tratados con PTS en comparación con los no tratados o tratados con DDS. Estos resultados apoyan observaciones previas acerca de que cepas aún no cultivadas del grupo *Butyrivibrio* podrían estar asociadas con la inhibición de la biohidrogenación de ácidos grasos (Kim et al., 2008). La distribución de la población de *Butyrivibrio* en el contenido del fermentador para cada tratamiento se presenta en la figura 1. El dendrograma muestra que dentro del grupo *Butyrivibrio*, las muestras se agruparon en dos clados separando a los fermentadores alimentados con la dieta control, de aquellos a los que se les adicionó DDS y PTS, con un 58% de similitud compartida. Las muestras correspondientes a los tratamientos con DDS y PTS se agruparon de manera separada, indicando un efecto diferente de esos compuestos sobre la estructura de la población de *Butyrivibrio*. Los tratamientos con PTS y DDS promovieron una mayor diversidad en el grupo *Butyrivibrio* en comparación con el control, siendo ésta mayor para el PTS que para el DDS (tabla 1). Estas diferencias podrían atribuirse a la capacidad de las bacterias del grupo *Butyrivibrio* para degradar estos compuestos, en algunos casos, o a la permeabilidad diferenciada de la membrana al paso de DDS y PTS al interior celular (Miron et al., 2000; Hart et al., 2008). La adición de DDS y PTS podría haber favorecido la proliferación de especies no identificadas dentro del grupo Butyrivibrio asociadas a cambios en el proceso de biohidrogenación ruminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., Newbold, C. J. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 147: 8-35.• Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J., Scollan, N.D. 2008. J. Nutr. 138:889-896. • Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J. 2010. Animal. 4:7, 1008-1023.• Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S. 2003. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 39: 81–86. • Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, H., Weiner, L., 2000. Biochim. Biophys. Acta 1463, 20–30.• Potu, R.B., AbuGhazaleh, A.A., Hastings, D., Jones, K., Ibrahim, A. 2011. J. Microbiol. 49:216-223. • Ramos-Morales, E, Martínez, G., Abecia, L., Molina-Alcaide, E., Martin-García, A.I., Yáñez-Ruiz, D.R. 2013. AIDA. XV Jornadas sobre Producción Animal.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2008-04707-C02-01) y la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P07-RNM-02746).

Tabla 1. *Efecto de dialil disulfuro (DDS) y propil propano tiosulfinato (PTS) sobre la concentración de bacterias totales (log copias16S rRNA/g MS) y abundancia relativa a bacterias totales (ΔCt) de B. fibrisolvens y B. proteoclasticus y parámetros de diversidad del grupo Butyrivibrio en el contenido del vaso de fermentación de fermentadores de flujo continuo tras 12 días de incubación.*

	Control	DDS	PTS	SE	P
Bacterias totales	9,74	9,71	9,76	0,094	0,941
Butyrivibrio fibrisolvens	13,3[a]	13,2[a]	16,9[b]	0,714	0,009
Butyrivibrio proteoclasticus	0,896	1,214	0,868	0,313	0,699
Diversidad bacteriana					
Riqueza	22,3[a]	27,0[b]	31,0[c]	0,999	0,001
Índice de Shannon	3,10[a]	3,29[b]	3,43[c]	0,037	0,001
Uniformidad	0,780[a]	0,829[b]	0,865[c]	0,009	0,001

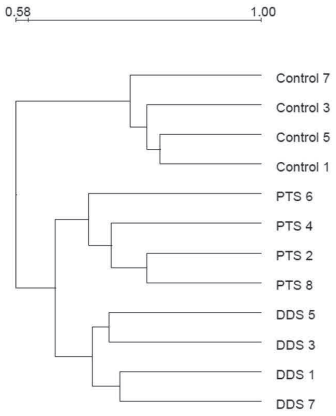


Figura 1. *Dendrograma derivado del análisis de DGGE de la similitud en la población de Butyrivibrio en fermentadores de flujo continuo alimentados con una dieta control (sin aditivo) y tratados con dialil disulfuro (DDS) y propil propano tiosulfinato (PTS).*

EFFECT OF ADDING ORGANOSUPLHUR COMPOUNDS TO THE DIET ON THE BUTYRIVIBRIO COMMUNITY IN CONTINUOUS- CULTURE FERMENTERS

ABSTRACT: *In vitro* studies have shown that linoleic acid biohydrogenation was altered by diallyl disulfide (DDS) and propyl propane thiosulfinate (PTS) addition causing an increased accumulation of VA. The present study was undertaken to elucidate whether those effects could be associated to shifts within the *Butyrivibrio* population. Six single-flow continuous-culture fermenters, inoculated with rumen fluid from goats, were used in two replicated periods of 12 days each. Two fermenters per period received either a control diet (without additive) or the same diet with 80 μl/l of DDS or 200 μl/l of PTS daily. On day 12, samples of fermenter's content taken at 0, 2 and 4 h after feeding, were pooled and kept at -80ºC for DNA extraction. Total eubacteria were quantified and the relative abundances of *B. fibrisolvens* and *B. proteoclasticus* were determined by real time PCR. Biodiversity within *Butyrivibrio* group was studied by DGGE. The addition of DDS and PTS did not affect the amount of total bacteria or relative abundance of *B. proteoclasticus*, although PTS seemed to promote higher abundance of *B. fibrisolvens* (P=0.009), in comparison to control and DDS treatments. The cluster analysis showed segregation of fermenters treated with garlic derived compounds from those of the control group and DDS and PTS treatments clustered separately. . The addition of DDS and PTS may have favored the growth of unidentified species within the Butyrivibrio group associated to changes in the biohydrogenation process.

Keywords: biohydrogenation, *Butyrivibrio*, organosulphur compounds