EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS RUMINALES Y LOS PARÁMETROS FERMENTATIVOS EN FERMENTADORES RUSITEC

Mateos, I.[1*], M.J. Ranilla[1,2], C. Saro[1], A. Díaz[1] y M.D. Carro[3]

[1] Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León, España
[2] IGM (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España
[3] Departamento de Producción Animal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España
* imata@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los fermentadores Rusitec (Czerkawski y Breckenridge, 1977) son uno de los tipos de fermentadores más ampliamente utilizados para simular *in vitro* la fermentación ruminal y permiten realizar estudios de larga duración (semanas). Sin embargo, debido a la prolongada extensión en el tiempo de este tipo de estudios se producen cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones de microorganismos. Existen algunos estudios que han puesto de manifiesto la disminución de la población de protozoos a lo largo del período de incubación (Carro *et al*., 1995; Martínez *et al.,* 2011), pero no existe información sobre otras poblaciones microbianas, a pesar de que uno de los requisitos que deberían cumplir los sistemas *in vitro* es mantener poblaciones microbianas representativas de las existentes en el rumen de los animales. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la evolución en el tiempo de la abundancia de bacterias, hongos, protozoos y arqueas, así como de los parámetros ruminales en fermentadores Rusitec.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un experimento utilizando 4 fermentadores Rusitec, durante 16 días. Se utilizó una dieta representativa de las formuladas para ganado ovino lechero con un 50% de heno de alfalfa y un 50% de un concentrado para ovejas de leche (a base de cebada, maíz, harina de soja, altramuces, avena, soja, melaza de caña y harinillas de trigo). El día 1 del experimento se inocularon los fermentadores con líquido ruminal procedente de cuatro ovejas fistuladas en el rumen alimentadas con la misma dieta. Cada fermentador recibió diariamente 30 g de materia seca (MS) de dieta administrados a las 9:00 h. El forraje y el concentrado se introdujeron por separado en dos bolsas de nailon y permanecieron dentro de los fermentadores durante 48 y 24 h, respectivamente. Se realizaron muestreos del líquido de las vasijas y del efluente los días 3, 8 y 14. Además, los días 8 y 14 en cada fermentador se determinaron la producción de metano y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y de la fibra neutro detergente (DFND).

En las muestras de efluente se analizó la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. Las muestras del contenido de las vasijas (4 mL), se centrifugaron (19200 x *g*; 10 min) y se descartó el sobrenadante para obtener pellets que se congelaron y liofilizaron. Los pellets 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. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit QIAamp DNA stool (QIAgen, Valencia, CA, EEUU) y 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. La cuantificación absoluta del ADN de bacterias y protozoos y relativa de arqueas y hongos se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR). 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 (20µM) y 2 μL de muestra de ADN. Las muestras se analizaron en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) utilizando primers previamente validados para el ADN de bacterias y hongos (Denman y McSweeney, 2006), protozoos (Sylvester *et al*., 2004) y arqueas (Denman *et al*., 2007). Como estándar para la cuantificación absoluta de bacterias y protozoos se utilizó ADN extraído de pellets de bacterias asociadas a la fase líquida y de protozoos, respectivamente, que se aislaron del rumen de las ovejas experimentales (Saro *et al*., 2012). Los valores

obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y los datos de arqueas y hongos se expresaron en relación a la cuantificación absoluta de bacterias según los cálculos descritos por Pfaffl (2001). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) La significación estadística se estableció en $P<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Tabla 1, existieron variaciones a lo largo del tiempo de incubación en la abundancia de las cuatro poblaciones microbianas analizadas, pero en diferente sentido. La concentración de ADN bacteriano aumentó a medida que transcurrió el estudio ($P=0,003$), mientras que la concentración de ADN protozoario y la abundancia relativa de hongos y arqueas respecto a la cuantificación absoluta de bacterias disminuyeron a lo largo del tiempo ($P=0,003$, $P<0,001$ y $P<0,001$, respectivamente).

Ziemer *et al.* (2000) observaron que tras 10 días de incubación en fermentadores de flujo continuo, la concentración de ARN de bacterias y arqueas aumentó en comparación con la del fluido ruminal utilizado para inocularlos, mientras que la concentración de ARN de protozoos disminuyó drásticamente, lo que concuerda parcialmente con nuestros resultados. En nuestro caso la abundancia de ADN bacteriano fue mayor al cabo de 14 días de incubación que al inicio de la misma (3 días), mientras que disminuyeron la abundancia absoluta de ADN protozoario y la abundancia relativa de arqueas. Sin embargo, los dos estudios fueron realizados con diferentes sistemas de simulación de la fermentación ruminal (flujo semicontinuo vs. flujo continuo) y con inóculo procedente de diferentes especies (ovino vs. vacuno) por lo que no son directamente comparables. En un estudio realizado con fermentadores Rusitec e inóculo procedente de ovino, Martínez *et al.* (2011) observaron que el número de protozoos, cuantificado por recuento al microscopio, disminuía rápidamente en los primeros días de incubación, aunque las poblaciones de protozoos se mantenían presentes durante los 14 días que duraba el experimento.

Respecto a los resultados obtenidos de los parámetros indicadores de la fermentación ruminal, no se observaron diferencias entre tiempos de muestreo en la producción de amoníaco ($P=0,223$), de AGV totales ($P=0,121$) y de metano ($P=0,795$) ni en la DFND ($P=0,291$), pero existió una tendencia a disminuir la DMO ($P=0,066$). Sin embargo, sí se modificó el patrón de producción de AGV, ya que aumentó la proporción molar de butírico ($P= 0,025$) y otros AGV ($P<0,001$) y se redujo la de propiónico ($P<0,001$). La no existencia de cambios significativos en la digestibilidad y producción total de AGV puede ser debida a que la actividad llevada a cabo por protozoos, hongos y arqueas fuera sustituida por las bacterias a medida que avanzó el experimento. A la vista de los resultados obtenidos y bajo las condiciones en las que se ha realizado este estudio, podemos concluir que en fermentadores Rusitec la abundancia absoluta de bacterias aumenta con el paso del tiempo y disminuye la abundancia absoluta de protozoos y la abundancia relativa de hongos y arqueas. Sin embargo, no se producen cambios en los principales parámetros de la fermentación entre los días 8 y 14 de incubación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Carro, M.D., Lebzien, P., y Rohr, K. 1995. Small Rum. Res. 15: 113-119. • Czerkawski, J. W., y G. Breckenridge. 1977. Br. J. Nutr. 38: 371-378. • Denman, S. E., y C. S. McSweeney. 2006. FEMS Microbiol. Ecol. 58: 572-582. • Denman, S. E., N. Tomkins, y C. S. McSweeney. 2007. FEMS Microbiol. Ecol. 62: 313-322. • Martínez, M.E., Ranilla, M.J., Ramos, S., Tejido, M.L. y Carro, M.D. 2011. Options Mediterranéennes A, 99: 97-102. • Pfaffl, M. W. 2001. Nucleic Acids Research. 29(9): e45-e45. • Saro, C., M. J. Ranilla, y M. D. Carro. 2012. J. Dairy Sci. 90: 5659-5668. • Sylvester, J., S. Karnati, Z. Yu, M. Morrison, y J. Firkins. 2004. J. Nutr. 134: 3378-3384. • Yu, Z., y M. Morrison. 2004. BioTechniques. 36: 808-812. • Ziemer, C. J., R. Sharp, M. D. Stern, M. A. Cotta, T. R. Whitehead, y D. A. Stahl. 2000. Environ. Microbiol. 2: 632-643.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proyecto AGL2011-22628 financiado por el MICINN.

Tabla 1: *Evolución durante el período de incubación de las poblaciones microbianas, parámetros fermentativos y digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y de la fibra neutro detergente (DFND) de la dieta en fermentadores Rusitec*

	Día de incubación				
	3	8	14	eem[1]	*P*
Microorganismos[2]					
Bacterias totales	16,5[a]	21,2[b]	25,5[c]	0,73	0,003
Protozoos	82,9[a]	27,4[b]	14,6[b]	6,01	0,003
Hongos	4,50[a]	0,30[b]	0,14[b]	0,151	<0,001
Arqueas	4,50[a]	1,02[b]	0,74[b]	0,170	<0,001
Parámetros fermentativos					
Amoniaco (mg/d)	227	236	210	8,9	0,223
Total AGV (mmol/d)	111	116	106	2.6	0,121
Proporción molar (mmol/mmol)					
Acético	56,0	55,5	54,0	0,48	0,086
Propiónico	22,2[a]	16,6[b]	15,2[b]	0,35	<0,001
Butírico	15,2[a]	16,0[a,b]	17,4[b]	0,34	0,025
Otros AGV[3]	6,67[a]	12,0[b]	13,5[c]	0,29	<0,001
Metano (mmol/d)	-	29,8	29,6	0,36	0,795
DMO (%)	-	63,3	61,5	0,34	0,066
DFND (%)	-	46,7	47,5	0,39	0,291

[1] Error estándar de la media

[2] Los valores de bacterias totales y protozoos se expresan en μg de ADN/mL y los de hongos y arqueas se expresan como ADN relativo al total de ADN bacteriano

[3] Suma de los ácidos isobutírico, isovalérico, valérico y caproico

[a, b, c] en la misma fila, los valores con diferente letra difieren (P < 0,05)

TIME EVOLUTION OF THE ABUNDANCE OF RUMINAL MICROBIAL POPULATIONS AND FERMENTATION PARAMETERS IN RUSITEC FERMENTERS

ABSTRACT: Four Rusitec fermenters fed with a dairy sheep diet were used to assess the evolution of ruminal populations. Bacterial and protozoal absolute abundance and arqueal and fungal relative abundance were determined by qPCR and the main ruminal parameters were analyzed. Bacterial DNA concentrations increased (P=0.025) with time over the experiment, but protozoal DNA concentrations and relative abundance of arqueal and fungal DNA decreased (P=0.003, P<0.001 and P<0.001, respectively). There were no changes either in the daily production of ammonia (P=0.223), total volatile fatty acids (VFA; P=0.121) and methane (P=0.795) or the digestibility of organic matter (P=0.066) and neutral detergent fibre (P=0.291). Molar proportions of propionate decreased (P<0.001) and those of butyrate and minor VFA increased (P=0.025 and <0.001, respectively) with incubation time. The results indicate that, despite of the changes in the microbial populations in the liquid phase of the digesta, most fermentation parameters were not affected.

Keywords: Rusitec fermenters, microbial populations, ruminal fermentation, qPCR