

## INFLUENCIA DEL TIPO DE FILTRADO Y TRATAMIENTO CON STOMACHER® DEL CONTENIDO RUMINAL DE OVEJAS EN LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL FLUIDO

Mateos<sup>1</sup>, I., Saro<sup>1</sup>, C., Ranilla<sup>1,2</sup>, M.J., Molina-Alcaide<sup>3</sup>, E. y Carro<sup>4</sup>, M.D.

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 León, España

<sup>2</sup> IGM (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España

<sup>3</sup> Estación Experimental del Zaidin (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada

<sup>4</sup> Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España. [mariaadolores.carro@upm.es](mailto:mariaadolores.carro@upm.es)

### INTRODUCCIÓN

Uno de los factores más importantes sobre los resultados de los estudios de fermentación ruminal *in vitro* es el tipo de poblaciones microbianas presentes en el fluido ruminal utilizado como inóculo. Varios estudios han analizado la influencia del procesado del contenido ruminal (Mackie *et al.*, 1983; Fliegerova *et al.*, 2014) sobre las poblaciones bacterianas y protozoarias en el fluido obtenido, pero la información sobre otras poblaciones microbianas ruminales que participan en los procesos fermentativos es más limitada (Soto *et al.*, 2012). Soto *et al.* (2012) observaron una disminución de las concentraciones de bacterias, hongos y arqueas en el fluido ruminal obtenido tras el proceso de filtrado del contenido ruminal, que fue atribuido a la pérdida de microorganismos asociados a la fase sólida de la digesta. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos tipos de filtrado y el tratamiento con Stomacher® de la digesta ruminal sobre las concentraciones de bacterias, protozoos, hongos y arqueas y la diversidad bacteriana en el fluido obtenido.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron cuatro ovejas provistas de una cánula ruminal permanente que recibían una dieta compuesta por heno de alfalfa y concentrado en proporción 66:34 (en materia seca; MS) administrada en dos porciones iguales a las 8:00 y 18:00 h. La obtención de contenido ruminal y su procesado se llevó a cabo en 4 días diferentes y en cada uno de ellos se obtuvo el contenido ruminal de una oveja para disponer de 4 réplicas por tratamiento. El contenido ruminal (600 g) se extrajo de diferentes partes del rumen antes de la primera administración de alimento e inmediatamente se trasladó al laboratorio en un termo cerrado. El contenido ruminal se homogeneizó mediante agitación con una varilla y se dividió en 3 fracciones que fueron sometidas a uno de los siguientes tratamientos para obtener el fluido: gasa: filtrado a través de 4 capas de gasa; filtrado: filtrado a través de 4 capas de gasa y filtrado adicional a través de una capa de nailon de 100 µm de tamaño de poro; y stomacher: tratamiento con Stomacher® durante 3 minutos a velocidad media (230 rpm) y filtrado a través de 4 capas de gasa. En todos los casos se tomaron muestras del fluido obtenido en tubos estériles que se congelaron inmediatamente (-20 °C) hasta la extracción de ADN.

La extracción del ADN se realizó a partir de 2 ml de fluido ruminal siguiendo el método propuesto por Yu & Morrison (2004), con un paso adicional en el que las muestras se trataron con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para eliminar inhibidores de la PCR. El proceso incluyó el tratamiento con un Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, EE. UU.) para lisar los microorganismos ruminales y la purificación del ADN con las columnas del kit QIAamp DNA stool (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU.). La cuantificación absoluta del ADN de bacterias y protozoos y la cuantificación relativa de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, hongos y arqueas se realizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) siguiendo la metodología descrita por Saro *et al.* (2014a). Como estándar para la cuantificación de bacterias y protozoos se utilizó ADN extraído de pellets de bacterias y de protozoos aislados del rumen de ovejas que recibían una dieta similar. Los valores obtenidos se analizaron con el software StepOne versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y los datos de las 3 especies de bacterias celulolíticas, los hongos y las arqueas se expresaron en relación a la cuantificación de bacterias según los cálculos descritos por Pfaffl (2001). El análisis automático de los fragmentos interribosomales (ARISA) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Saro

et al. (2014b) en un secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y se consideró que el perfil de los picos de los electroferogramas reflejó las especies o comunidades bacterianas predominantes presentes en cada muestra. La matriz de datos con la presencia (1) o ausencia (0) de picos en las muestras se utilizó para construir un dendrograma utilizando el coeficiente de correlación de Pearson como medida de similitud.

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza utilizando el procedimiento MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), en el que el tratamiento se consideró un efecto fijo y la oveja donante un efecto aleatorio. La significación estadística se estableció en  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No existieron diferencias entre tratamientos en la cantidad de ADN bacteriano en el fluido ruminal ( $P=0,11$ ), aunque el método stomacher aumentó esta cantidad en un 22,2% (Tabla 1). Comparado con el método gasa, el método stomacher redujo la concentración de ADN protozoario en el fluido ruminal ( $P < 0,05$ ), posiblemente debido a la lisis de protozoos durante el tratamiento y a la pérdida del ADN liberado al desechar el sobrenadante de la centrifugación previa a la extracción de ADN, pero aumentó la abundancia relativa de *F. succinogenes* ( $P < 0,05$ ) y tendió a aumentar la abundancia relativa de *R. albus* ( $P < 0,10$ ), lo que indicaría un desligamiento de estas especies bacterianas. El método filtrado redujo numéricamente (32,0%) la cantidad de ADN protozoario en comparación con el método gasa, que pudo ser debido a la retención de protozoos de gran tamaño ( $> 100 \mu\text{m}$ ) en la tela de nailon. No se observaron diferencias entre métodos en la abundancia relativa de *R. flavefaciens*, hongos y arqueas ni en la diversidad bacteriana analizada mediante ARISA ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 1:** Efecto del método de procesado del contenido ruminal de ovejas sobre las poblaciones microbianas y la diversidad bacteriana en el fluido ruminal resultante ( $n = 4$ )

Item	gasa <sup>1</sup>	filtrado <sup>2</sup>	stomacher <sup>3</sup>	eem <sup>4</sup>	P-valor
Poblaciones microbianas					
Bacterias totales ( $\mu\text{g ADN/ml}$ )	40,5	43,3	49,5	2,55	0,11
Protozoos ( $\mu\text{g ADN/ml}$ )	4,00 <sup>b</sup>	2,72 <sup>ab</sup>	1,36 <sup>a</sup>	0,500	0,03
Abundancia relativa: <sup>5</sup>					
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,382 <sup>a</sup>	0,386 <sup>a</sup>	0,481 <sup>b</sup>	0,0207	0,02
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,291	0,306	0,327	0,0138	0,26
<i>Ruminococcus albus</i>	0,723	0,644	1,165	0,1433	0,08
Hongos	0,0015	0,0014	0,0014	0,00035	0,99
Arqueas	0,252	0,285	0,264	0,0157	0,38
Diversidad bacteriana					
Índice de Shannon	4,30	4,26	4,27	0,215	0,40
Número de picos	74,0	71,0	71,8	1,46	0,38

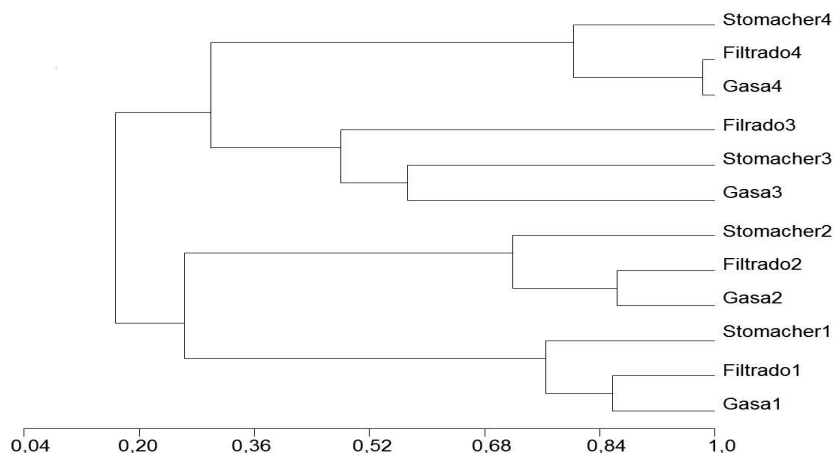
<sup>a, b</sup> en la misma fila, los valores con diferente letra difieren ( $P < 0,05$ )

<sup>1</sup> filtrado a través de 4 capas de gasa; <sup>2</sup> filtrado a través de 4 capas de gasa y a través de una capa de nailon de  $100 \mu\text{m}$  de poro; <sup>3</sup> tratamiento con un homogeneizador Stomacher® (5 min, 230 rpm) previo al filtrado a través de 4 capas de gasa; <sup>4</sup> error estándar de la media; <sup>5</sup> ADN relativo al total de ADN bacteriano, expresado como  $10^2 \times 2^{-\text{(Ct diana} - \text{Ct bacterias totales)}}$

Tal como muestra el dendrograma de la Figura 1, existió una gran influencia del animal en la diversidad bacteriana de los fluidos ruminales obtenidos, ya que las muestras se agruparon claramente en 4 clusters (uno para cada oveja). En 3 de las ovejas, los métodos gasa y filtrado produjeron fluidos ruminales con una similitud superior al 86%, mientras que en el caso del método stomacher este valor fue inferior al 75% en todos los casos. Estos resultados indicarían que el tratamiento con Stomacher® provocó una selección de especies bacterianas.

Los resultados indican una influencia clara del método de procesado del contenido ruminal sobre la estructura de las comunidades microbianas en el fluido resultante, pero son

necesarios otros estudios que analicen la posible influencia de estos métodos en los parámetros fermentativos *in vitro* de diferentes sustratos cuando se utiliza el fluido ruminal como inóculo.



**Figura 1.** Dendrograma generado a partir de los perfiles ARISA de las comunidades bacterianas del fluido ruminal de ovejas (1 a 4) obtenido tras someter el contenido ruminal a diferentes tratamientos (ver texto para su descripción).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Fliegerova, K., et al. 2014. *Anaerobe*. 29: 80-84.
- Mackie, R. I., et al. 1983. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13: 52-54.
- Pfaffl, M. W. 2001. *Nucleic Acids Res.* 29: e45-e45.
- Saro, C., et al., 2014a. *Livest. Prod.* 160: 52-59.
- Saro, C., et al., 2014b. *J. Anim. Sci.* 92: 1083-1088
- Soto, E. C., et al., 2012. *Anim. Prod. Sci.* 52: 813-822.
- Yu, Z., & M. Morrison. 2004. *BioTechniques*. 36: 808-812.

**Agradecimientos:** Este trabajo forma parte de los Proyectos AGL2011-22628 (MICINN) y MEDGAN ABI-2913 (Comunidad de Madrid y Fondos Estructurales de la UE).

#### INFLUENCE OF PROCESSING METHOD OF RUMEN CONTENTS ON MICROBIAL POPULATIONS IN THE RESULTING FLUID

**ABSTRACT:** Four rumen-fistulated sheep fed a 66:34 alfalfa hay:concentrate diet were used as donors to investigate the effect of rumen contents' treatment on microbial populations in the resulting fluid. Rumen contents were sampled from each individual sheep and subjected to the following treatments: SQ: squeezed through 4 layers of cheesecloth; FIL: SQ treatment and further filtration through a 100- $\mu$ m nylon cloth; STO: treated with a Stomacher® for 3 min at 230 rev min<sup>-1</sup> and followed by SQ. Microbial populations in the fluid were analysed by real-time PCR and bacterial diversity was assessed by the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) of the 16S ribosomal DNA. Bacterial DNA concentrations and relative abundance of *Ruminococcus flavefaciens*, archaeal and fungal DNA did not differ ( $P>0.05$ ) between treatments. In contrast, STO treatment decreased ( $P<0.05$ ) protozoal DNA concentrations and increased ( $P<0.05$ ) the relative abundance of *Fibrobacter succinogenes* compared with SQ method. There were no differences ( $P>0.05$ ) between treatments either in the Shannon index or in the number of peaks in the ARISA electropherograms, indicating no effect on bacterial diversity. Studies analyzing the influence on the tested methods on fermentation characteristics of different substrates when the fluid is used as inoculum is required.

**Keywords:** rumen contents processing; microbial populations, qPCR, bacterial diversity