

OPTIMIZACIÓN *IN VITRO* DEL USO DE MICROBIOTA RUMINAL COMO PROBIÓTICO. 2. EFECTO DEL INÓCULO, DIETA Y MÉTODO DE CONSERVACIÓN

Palma, J.M., Nejjam I., Serrano, R., Jiménez, E., Jiménez, I., Martín-García, A.I.,

Yáñez-Ruiz, D.R. y Belanche, A.

Estación Experimental del Zaidin, CSIC. C/ Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España.

a.belanche@csic.es

INTRODUCCIÓN

El uso de probióticos en rumiantes para mejorar la eficiencia de la digestión del alimento y de la fermentación ruminal ha sido estudiado ampliamente en los últimos años debido a su efecto beneficioso sobre la comunidad microbiana presente en el rumen ayudando al animal a mantenerse en un buen estado de salud y a aumentar su producción (Choct, 2009). Dependiendo de su origen, los microorganismos probióticos pueden ser de tipo autóctono o autóctono (FAO, 2016). En el primer grupo, el microorganismo más estudiado es *Saccharomyces cerevisiae* (Newbold, 1995), mientras que del segundo grupo, lo habitual es utilizar cepas específicas de microorganismos del tracto gastrointestinal (Kenney *et al.*, 2015). Sin embargo, la inoculación directa de microbiota ruminal como probiótico está mucho menos estudiada (Zhong *et al.*, 2014) debido principalmente a la falta de disponibilidad de animales donantes y la dificultad conservar dicha microbiota ruminal.

Recientes ensayos han demostrado que la utilización de prebióticos en rumiantes a edades tempranas ejerce un efecto positivo sobre la colonización microbiana ruminal (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015). Por ello se podría pensar que la inoculación de animales a edades tempranas con microbiota ruminal procedente de adultos podría acelerar el desarrollo microbiológico del rumen, e incluso programarlo para un uso más temprano y eficiente de una determinada dieta dependiendo del modelo de producción (forraje vs. concentrado). Esta última hipótesis sería posible si se demostrase que la microbiota (inóculo) adaptada a una determinada dieta fuese realmente capaz de propiciar una mayor fermentación de dicha dieta en comparación con una microbiota no adaptada a dicho sustrato.

A pesar de estas expectativas, hasta la fecha no existe constancia de cuál sería el tipo de microbiota ruminal que tendría más posibilidades de éxito como probiótico. Por ello el objetivo del presente trabajo fue identificar los factores que maximizan la actividad de la microbiota ruminal para su posterior uso como probiótico. En particular se evaluó el efecto de diferentes tipos de procesamiento de la microbiota ruminal (fresco vs congelado vs liofilizado) sobre la actividad microbiana. Asimismo, se pretendió dilucidar si existe algún tipo de interacción entre el tipo de inóculo utilizado (adaptado a diferentes dietas) y la fermentabilidad de distintas dietas objeto de estudio (forraje vs concentrado).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 cabras hembra de la raza Murciano-Granadina que disponían de cánula ruminal. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos experimentales (n=4). El primer grupo (IF) fue alimentado con una dieta forrajera consistente en heno de alfalfa y heno de avena (50/50), y el segundo grupo fue alimentado con una dieta concentrada (IC) a base de 80% de concentrado y 20% de forraje. La dieta fue distribuida en dos tomas diarias. La toma de muestra de inóculo se realizó a las 3 h tras la administración de la primera toma. El contenido ruminal de cada cabra fue filtrado y dividido en tres alícuotas. Una fue utilizada en fresco (FRE) y las otras dos alícuotas restantes fueron mezcladas con 5% de dimetilsulfóxido como crio-preservante, refrigeradas a 4°C durante 30 minutos y posteriormente congeladas a -80°C. Una de ellas fue utilizada tras su descongelación (DES) mientras que la otra alícuota fue utilizada tras su liofilización (LIO). El líquido ruminal FRE y DES fueron dispensados en botellas Wheaton de 120 ml con tampón de incubación precalentado anaeróbicamente en una proporción (1:2). El líquido ruminal liofilizado fue igualmente distribuido en botellas, añadiéndose una cantidad de materia seca equivalente a la encontrada en los tratamientos anteriores y reconstituido con 50 ml del tampón de incubación. Las botellas contenían, asimismo, sustratos de dieta forrajera (DF) o dieta concentrada (DC). Se utilizaron 4 réplicas biológicas por tratamiento por duplicado dando lugar a un total de 96 botellas que fueron incubadas a 39 °C en anaerobiosis. La presión de gas fue medida a 0, 2, 4, 7, 10, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. Estas medidas de presión fueron transformadas a volumen y los datos de producción de gas se ajustaron a la

ecuación descrita por France *et al.* (2000). Tras 24 h de incubación se tomaron muestras de gas para medir la concentración de metano, así como para describir la fermentación ruminal y la microbiota. La materia orgánica fermentable (MOF) fue calculada en base a la producción de AGV (Marty y Demeyer, 1973). El ADN fue extraído del contenido de las botellas mediante el FavorPrep™ Stool DNA Isolation Mini Kit. Posteriormente, la concentración de bacterias totales, arqueas, hongos anaerobios y protozoos se realizó mediante PCR cuantitativa. El recuento de protozoos se realizó por microscopía óptica.

El análisis estadístico consistió en un ANOVA factorial 2x2x3 tras promediar los valores de las dos replicas analíticas; Se utilizó con modelo mixto cuyos efectos principales fueron el tipo de inóculo (IF vs. CON), el tipo de dieta (DF vs. DC) y el tipo de procesado de la microbiota (FRE vs. DES vs. LIO), y el animal fue considerado como efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente ensayo reveló que el tipo de inóculo utilizado ejerce un efecto muy significativo sobre la fermentación ruminal *in vitro* (Tabla 1). La utilización de microbiota ruminal adaptada a una dieta concentrada (IC) como inóculo originó una mayor producción de AGV (+19%), principalmente como propionato (+32%), así como una mayor MO fermentable (+23%), producción de gas (+16%) y a una mayor velocidad de fermentación (+26%) en comparación con la microbiota adaptada a forraje (IF). A pesar de estas diferencias sustanciales en la fermentación, las concentraciones de microorganismos ruminales no se vieron afectadas por el tipo de inóculo utilizado.

Tabla 1. Patrón de fermentación, cuantificación microbiana y recuento de protozoos en función del inóculo utilizado (I), la dieta (D) y el procesado (P) del mismo.

	Inóculo		Dieta		Procesado			Valor P				
	IF	IC	DF	DC	FRE	DES	LIO	SED ¹	I	D	P	IxP
pH	6,67	6,46	6,54	6,34	6,28 ^b	6,49 ^a	6,56 ^a	0,17	0,03	0,001	0,001	0,06
AGV, mM	90	107	103	109	136 ^a	116 ^b	67 ^c	15	0,06	0,02	0,001	0,02
Acetato, %	69,1	62,1	62,7	60,7	61,4 ^b	59,7 ^b	64,1 ^a	2,7	0,001	0,06	0,005	0,001
Propionato, %	8,9	11,8	11,4	12,3	13,4 ^a	10,6 ^b	11,6 ^b	2,0	0,002	0,37	0,003	0,001
Butirato, %	18,0	20,8	20,6	21,6	19,2 ^b	24,0 ^a	20,1 ^{ab}	2,8	0,001	0,25	0,02	0,44
MOF ² , mg	438	539	517	554	688 ^a	577 ^b	343 ^c	72	0,023	0,005	0,001	0,02
Producción de gas												
B ³ , mL	147	171	173	178	196 ^a	171 ^b	159 ^c	26	0,04	0,45	0,001	0,045
C ⁴ , µl/h	60,9	76,7	71,1	83,1	97,9 ^a	103 ^a	30,3 ^b	15,3	0,03	0,02	0,001	0,03
Metano, mM	4,14	4,25	4,18	4,04	5,99 ^a	5,26 ^a	1,08 ^b	1,02	0,93	0,71	0,001	0,54
Metano, mmol/d	0,46	0,64	0,58	0,64	0,99 ^a	0,76 ^b	0,08 ^c	0,23	0,12	0,36	0,001	0,02
Microbiota, log/ml												
Bacterias	12,6	13,0	12,8	12,8	12,7 ^c	12,9 ^a	12,8 ^b	1,3	0,80	0,31	0,005	0,94
Arqueas	7,87	8,09	7,96	8,00	8,53 ^a	8,58 ^a	6,82 ^b	0,19	0,16	0,48	0,001	0,001
Hongos	7,58	7,52	7,57	7,54	7,66 ^a	7,52 ^b	7,47 ^c	0,08	0,33	0,24	0,001	0,004
Protozoos	8,67	8,27	8,42	8,52	9,45 ^a	8,26 ^b	7,70 ^c	0,57	0,43	0,50	0,001	0,08
Recuentos protozoos												
Total, log/ml	3,56	3,81	3,75	3,62	4,80 ^a	4,11 ^b	2,15 ^c	0,62	0,66	0,30	0,001	0,21
<i>Entodiniinae</i> , %	92,5	88,8	89,4	91,9	86,3 ^b	93,0 ^a	92,7 ^a	7,1	0,43	0,05	0,003	0,05
<i>Diplodiniinae</i> , %	4,45	5,96	6,02	4,37	5,18	5,26	5,27	4,51	0,62	0,006	0,445	0,03
<i>Ophryoscolex</i> , %	0,12	1,05	0,53	0,70	0,89	0,63	0,26	0,75	0,10	0,70	0,108	0,55
<i>Isotricha</i> , %	0,51	0,41	0,71	0,18	0,88	0,17	0,30	0,73	0,99	0,04	0,071	0,72
<i>Dasytricha</i> , %	2,41	3,77	3,38	2,83	6,78 ^a	0,93 ^b	1,43 ^b	3,86	0,45	0,52	0,003	0,26

¹ Error estándar de la diferencia, el resto de interacciones no fueron significativas. ² Materia orgánica fermentable.

³ Potencial de producción de gas. ⁴ Velocidad de producción de gas. Dentro de una misma línea y efecto fijo, letras distintas denotan diferencias significativas (P<0,05)

El tipo de dieta utilizada como sustrato durante la incubación *in vitro* también influyó sobre la actividad microbiana. El uso de una dieta concentrada (DC) fomentó un menor pH, así como una mayor concentración de AGV (+6%), MO fermentable (+7%) y una mayor velocidad de producción de gas (+17%), aunque los niveles de microorganismos ruminales tampoco se

vieron afectados por este factor. La ausencia de una interacción entre inóculo y dieta sugiere que el hecho de que la microbiota esté adaptada a una determinada dieta no proporciona ningún beneficio respecto a aquella que no lo está en lo referido a la concentración de microorganismos y su actividad fermentativa.

El tipo de procesamiento del inóculo resultó ser el factor que mayor impacto generó sobre la actividad microbiana. Como era de esperar, el líquido ruminal fresco fue el que originó una mayor concentración en todos y cada uno de los grupos microbianos, así como una mayor fermentación del sustrato ($P < 0,001$). En comparación con el líquido ruminal fresco, la utilización de líquido ruminal descongelado originó una reducción significativa de la microbiota total (-1,04 log), así como la concentración de bacterias (-0,24), hongos anaerobios (-0,14) y protozoos (-1,20). En particular los protozoos Holotricos (*Isotricha* y *Dasytricha*) fueron los que peor resistieron la congelación, por el contrario *Entodinium* fue el que mejor se sobrepuso a dicho reto. Esta disminución de la masa microbiana en el inóculo descongelado originó un descenso considerable de la producción de AGV (-14%), MO fermentable (-16%) y producción de gas (-13%). Por su parte, la liofilización del líquido ruminal congelado resultó ser un procesamiento todavía más agresivo y originó una mayor reducción de la microbiota total (-3,57 log) en comparación con FRE. Además la mayoría de los protozoos (>99%) no fueron capaces de sobrevivir a la liofilización. Como consecuencia de ello, el uso de líquido ruminal liofilizado en comparación con el fresco, originó una baja actividad microbiana en términos de AGV (-51%), MO fermentable (-50%), así como una menor producción de gas (-19%) y a una menor velocidad (-69%).

En conclusión, la microbiota presente en el líquido ruminal fresco procedente de animales alimentados con concentrado representa el inóculo con la mayor actividad microbiana posible para fermentar un sustrato similar *in vitro*, por ello debería ser el de elección para evaluar su efecto probiótico en futuros experimentos *in vivo*. Por el contrario la congelación y/o liofilización de la microbiota ruminal podría comprometer la viabilidad de los microorganismos y su potencial uso como probiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Choct, M. 2009. Br. Poul. Sci. 50: 9-15 • Cotter, P.D., et al. 2005. Nat. Rev. Microbiol. 3: 777-788 • France, J., et al., 2000. Br. J. Nutr. 83: 143-150 • Kenney, N.M., et al. 2015. Am. Soc. Ani. Sci. 93: 2336-2348 • Marty R. J., Demeyer D.I. 1973, Br. J. Nutr. 30:369-376 • Newbold, C.J. 1995. Ann. Zootech. 45: 329-335 • Yáñez-Ruiz, D.R., et al. 2015. Frontiers Microbiol. 6: 1133 • Zhong, R.Z., et al. 2014. Livest. Sci. 162: 154-158.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el CSIC (Proyecto Intramural 201440E048) y MINECO (BFU2014-57964-R).

IN VITRO OPTIMIZATION OF THE USAGE OF RUMINAL MICROBIOTA AS A PROBIOTIC. 2. EFFECT OF INOCULUM, DIET AND PRESERVATION METHOD

ABSTRACT: This study aims to identify the best conditions for preparing rumen microbiota as probiotic by the analysis of fermentation parameters resulting from *in vitro*. A factorial design was used to determine the effect of using rumen fluid adapted to forage (IF) vs concentrate diets (IC) as inoculum, the effect of using forage (DF) vs concentrate (DC) as substrate *in vitro*, and the inoculum preservation method: fresh vs defrosted vs lyophilized. Rumen microbes present IC were significantly more active than those present in IF (+16 to +32%). Similarly, use of DC as substrate enhanced the microbial activity (+6 to +16%) in comparison to DF. However, no apparent differences were found in the microbial concentration and no interaction between inoculum and diet was observed. In comparison to fresh, processed inocula negatively affected the levels of all microbial groups and their activity (-13 to -16% for defrosted and -50 to -69% for lyophilized). Rumen protozoa were particularly affected by the preservation method. In conclusion, fresh rumen fluid from animals adapted to concentrate diets represents the microbiota with the highest activity *in vitro*. On the contrary freezing or lyophilizing rumen microbes could compromise their activity and their potential use as probiotic *in vivo*.

Keywords: inoculum, probiotics, processing, rumen microbes