

OPTIMIZACIÓN *IN VITRO* DEL USO DE MICROBIOTA RUMINAL COMO PROBIÓTICO. 1. EFECTO DE LA DIETA, MOMENTO DE MUESTREO Y FRACCIÓN RUMINAL

Nejjam, I., Palma, J.M., Serrano R., Jimenez, E., Jimenez, I., Martín-García, A.I., Yáñez-Ruiz, D.R. y Belanche, A.

Estación Experimental del Zaidín (CSIC), C/Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España.
a.belanche@csic.es

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes al nacer carecen de microbiota ruminal, que va colonizando progresivamente el rumen como consecuencia del contacto con animales adultos. Dicha colonización puede verse comprometida en explotaciones lecheras cuando los animales recién nacidos son separados de sus madres tras el parto y alimentados con leche artificial sin contacto con animales adultos. En este sentido, recientes estudios han demostrado que el uso de algunos prebióticos en rumiantes a edades tempranas ejerce un efecto beneficioso sobre la colonización microbiana ruminal (Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015). Sin embargo, la utilización de probióticos en estas edades ha sido poco estudiado. Se podría pensar que la inoculación de animales a edades tempranas con microbiota ruminal procedente de adultos, a modo de probiótico, podría acelerar el desarrollo microbiológico y anatómico del rumen, e incluso programarlo para un uso más temprano y eficiente de una determinada dieta dependiendo del modelo de producción (intensivo a base de concentrado vs. extensivo a base de forraje). Sin embargo, hasta la fecha no existe constancia de cuál sería el tipo de microbiota ruminal que tendría más posibilidades de éxito como probiótico.

El objetivo del presente trabajo fue identificar los factores que maximizan la actividad de la microbiota ruminal para su posterior uso como probiótico. Para ello se realizaron dos ensayos *in vitro*, uno para seleccionar el tampón fosfato que mejor fomente la fermentación de distintos tipos de dieta, y un segundo ensayo para determinar el efecto de la dieta, momento de muestreo y fracción ruminal sobre la actividad de la microbiota ruminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos dietas experimentales: una dieta 100% forrajera (FOR) compuesta por heno de alfalfa y heno de avena (50/50), y una dieta concentrada (CON) compuesta por 80% de concentrado y 20% del forraje anteriormente descrito. Como fuente de inóculo, se utilizaron 8 cabras Murciano-Granadinas, con un peso vivo de 47±5,6 kg, que fueron asignadas aleatoriamente a las dos dietas experimentales. Tras un periodo de dos semanas de adaptación a la dieta, en una fase preliminar se estudió la evolución del pH ruminal mediante mediciones seriadas a 0, 2, 4 y 6 horas post-ingesta durante tres días consecutivos.

En base a estos resultados se diseñó un primer experimento consistente en la evaluación *in vitro* del efecto de 3 soluciones tampón sobre el pH y patrón de fermentación ruminal de ambos tipos de dieta con el objeto de conseguir una mejor simulación *in vitro* de las condiciones de fermentación *in vivo*. Para ello se realizaron incubaciones utilizando como inóculo líquido ruminal de animales individuales ($n=4$) tomado a las 0 y 3 h post-ingesta. La incubación se realizó en 96 botellas Wheaton de 120 ml de capacidad donde se añadió 0,5 g MS de las dietas experimentales (FOR) o (CON). El medio de cultivo (50 ml) consistió una mezcla de líquido ruminal (33%) y una de las tres disoluciones tampón (67%) para mantener el pH a un nivel alto (6,80), medio (6,25) o bajo (5,75) de acuerdo a lo descrito por Amanzougarene *et al.* (2015). Tras 24 h de incubación se procedió al muestreo para determinar pH, ácidos grasos volátiles (AGV), amonio y producción de gas (PG). Posteriormente se realizó un segundo ensayo en el que se seleccionó uno de los tres tampones anteriores (pH 6,80) para evaluar el efecto del tipo de dieta (FOR vs CON), momento de muestreo (0 vs 3 h post-ingesta) y el tipo de inóculo ruminal (líquido vs contenido completo) sobre la fermentación ruminal *in vitro*. En este ensayo se utilizaron 64 botellas Wheaton durante 72h realizando mediciones de la presión de gas a las 2, 4, 7, 10, 24, 48 y 72 h respectivamente. A las 24 h de incubación se procedió a la toma de muestra para determinar el patrón de fermentación y la concentración de bacterias, arqueas, hongos anaerobios y protozoos mediante PCR cuantitativa (Belanche *et al.*, 2016). Las presiones de gas se convirtieron en unidades de volumen (ml) y se ajustaron a la ecuación predictiva

descrita por France *et al.* (2000). La materia orgánica fermentable (MOF) fue calculada en base a la producción de AGV (Marty y Demeyer, 1973). Tras promediar los valores de las 2 réplicas analíticas, los datos se analizaron mediante un ANOVA factorial donde los efectos principales fueron dieta y tampón (ensayo 1) y dieta, fracción y momento de muestreo (ensayo 2), mientras que el efecto animal se consideró como aleatorio en ambos ensayos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El seguimiento del pH ruminal *in vivo* mostró un descenso más acusado entre las 2 y 4 h post-ingestión para la dieta CON (7,02, 5,79, 5,96 y 5,98) que para la dieta FOR (7,39, 6,97, 6,78 y 6,92 a las 0, 2, 4 y 6 h post-ingesta respectivamente), lo que determinó la elección de los tampones de pH utilizados en el primer ensayo (Tabla 1). Este ensayo mostro que el tampón que genera un mayor pH promueve una mayor actividad fermentativa en términos de concentración de AGV ($P=0,001$), amonio ($P=0,005$), MO fermentable ($P=0,006$) y producción de gas ($P<0,001$). Además se observó que este efecto es independiente del tipo de dieta (ausencia de interacciones significativas), por lo que se procedió a utilizar dicho tampón en los ensayos sucesivos.

Tabla 1. Efecto de la dieta y el tampón fosfato sobre la fermentación ruminal *in vitro*.

	Dieta		Tampón pH			SED ¹	Valor P	
	FOR	CON	Alto	Medio	Bajo		Dieta	Tampón
pH	6,13	5,67	6,48 ^a	5,79 ^b	5,44 ^c	0,173	0,003	0,001
NH ₃ -N, mg/100ml	23,3	48,6	48,2 ^a	26,4 ^b	33,2 ^b	15,05	0,04	0,005
AGV, mM	70,8	91,6	89,2 ^a	80,9 ^b	73,5 ^b	11,27	0,06	0,001
Acetato, %	70,0	54,0	61,9	62,0	62,1	2,51	0,001	0,93
Propionato, %	16,3	23,0	20,0	19,5	19,5	2,28	0,01	0,81
Butirato, %	10,1	15,9	12,5	13,2	13,4	1,65	0,001	0,54
MOF ² , mg	346	475	448 ^a	411 ^{ab}	374 ^b	59,5	0,03	0,006
Producción de gas, ml	63,6	102,7	98,4 ^a	79,9 ^b	65,2 ^c	14,98	0,007	0,001

¹ Error estándar de la diferencia, la interacción no fue significativa, ² Materia orgánica fermentable.

En el segundo ensayo (Tabla 2) se observó que el tipo de dieta ejerce un efecto ($P<0,05$) sobre la fermentación ruminal *in vitro*. En comparación con la dieta FOR, la CON fomentó una mayor fermentación ruminal en términos de AGV (+21%), MO fermentable (+26%), producción de gas (+30%), así como en la velocidad de producción de gas (+36%). Por contrario la dieta FOR promovió un mayor porcentaje de acetato ($P=0,008$) y una mayor concentración de hongos anaerobios ($P=0,007$) y protozoos ($P=0,001$) sugiriendo una mayor actividad fibrolítica. El momento de muestreo también ejerció un efecto considerable sobre la fermentación *in vitro*, la utilización de microbiota ruminal muestreada a 3 h post-ingestión resultó ser más activa en términos de producción de AGV (+12%), MO fermentable (+13%) y producción de gas (+24%), así como tiende a proporcionar una mayor concentración ruminal de bacterias ($P=0,09$) y arqueas ($P=0,05$) que el inóculo procedente de animales en ayunas. Por contrario la concentración de hongos anaerobios ($P=0,002$) y protozoos ($P=0,08$) fue superior en el inóculo proveniente de animales en ayunas, lo que sugiere una lenta colonización del alimento por parte de estos grupos microbianos. En cuanto al tipo de fracción ruminal considerada, no se encontraron diferencias entre la utilización de líquido ruminal vs contenido ruminal ($P>0,05$). Únicamente se detectó una tendencia a incrementar el porcentaje de propionato ($P=0,08$) en la fracción líquida, así como una menor concentración de hongos anaerobios ($P=0,002$) como consecuencia de tropismo de estos microorganismos hacia la fracción sólida.

En conclusión, la microbiota presente en el líquido ruminal de animales alimentados con concentrado a las 3 h post-ingestión representa el inóculo con la mayor actividad microbiana posible, por ello debería ser el de elección para evaluar su efecto probiótico en futuros experimentos *in vivo*.

Tabla 2. Efecto de la dieta (D), fracción del contenido ruminal (F) y el tiempo de muestreo (T) sobre la fermentación y microbiota ruminal *in vitro*.

	Dieta		Fracción		Tiempo		SED ¹	Valor P		
	FOR	CON	L	LS	0h	3h		D	F	T
pH	6,63	6,01	6,38	6,25	6,57	6,07	0,204	0,005	0,14	0,001
AGV (mM)	85,8	103,6	95,9	93,5	89,5	99,9	9,040	0,008	0,59	0,03
Acetato, %	69,2	60,7	64,2	65,6	62,1	67,7	2,010	0,001	0,11	0,001
Propionato, %	17,6	19,7	19,1	18,1	19,2	18,1	1,603	0,16	0,08	0,06
Butirato, %	9,93	14,7	12,3	12,3	12,6	12,0	1,191	0,003	0,95	0,17
MOF ² , mg	419	527	479	467	444	502	45,2	0,003	0,62	0,02
Producción de gas										
B ³ , mL	176	229	198	207	181	224	22,5	0,03	0,21	0,001
C ⁴ , µL/h	51,4	69,9	58,2	63,2	57,5	63,8	6,78	0,001	0,17	0,10
Metano, mM	5,45	6,36	5,77	6,04	5,56	6,25	1,17	0,08	0,20	0,003
Metano, mmol/d	0,67	1,15	0,86	0,95	0,72	1,10	0,198	0,03	0,16	0,001
Microbiota, log /mL										
Bacterias	11,8	12,0	11,9	11,9	11,8	12,0	0,304	0,36	0,59	0,09
Arqueas	8,66	8,71	8,78	8,59	8,57	8,80	0,241	0,78	0,11	0,05
Hongos	7,24	6,64	6,79	7,08	7,21	6,67	0,204	0,007	0,002	0,001
Protozoos	9,45	9,93	9,70	9,69	9,83	9,56	0,280	0,01	0,96	0,08

¹ Error estándar de la diferencia, las interacciones no fueron significativas. ² Materia orgánica fermentable. ³ Potencial de producción de gas. ⁴ Velocidad de producción de gas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Amanzougarene Z. et al 2015 ITEA Tomo 1, 212-214 • Belanche A. et al., 2016 *Frontiers Microbiol.* 7:1-17 • France J., et al. 2000. *Br. J. Nutr.* 83:143–150 • Marty R. J. & Demeyer D.I. 1973, *Br. J. Nutr.* 30:369-376 • Yañez-Ruiz, D.R., et al. 2015. *Frontiers Microbiol.* 6:1133

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: I EFFECT OF DIET, SAMPLING TIME AND RUMEN FRACTION

ABSTRACT: The aim of this work was to elucidate the best conditions for preparing rumen fluid as probiotics by the analysis of fermentation parameters resulting from *in vitro* incubations in batch cultures. The effect of the diet (forage vs concentrate) and three pH buffers (6,80, 6,25 y 5,75) was studied in trial 1, while the effect of the diet, sampling time (0 vs. 3 h) and ruminal fraction (liquid vs whole content) was assessed in trial 2. Eight goats were randomly allocated to the experimental diets and used as donors of rumen microbiota. Trial 1 showed that the buffer which generates highest pH promoted the higher fermentation activity in terms of VFA, ammonia, fermentable OM and gas production, being this effect diet independent. Trial 2 showed that the microbiota adapted and fed with concentrate diet had a higher activity (+21 to +36%) than observed in forage diets. Rumen microbiota sampled at 3 h after feeding also was more active (+12 to +24%) than that sampled before feeding, while the type of ruminal fraction considered had a negligible effect in most parameters. Thus, the rumen microbiota sampled at 3 h after animals are fed concentrate has the highest activity and should be tested as probiotic in further studies.

Keywords: goat, *in vitro*, probiotic, rumen microbiota