Pseudobutyrivibrio ruminis aislado del rumen de cabras biotipo criollo: identificación genética y bioquímica

D. Grilli[1,3], M. Cerón[4], L. Schnittger[4], S. Páez[2], V. Egea[2], M. E. Cobos[1], L. Allegretti[2] y G. N. Arenas[3]

[1]Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales. Universidad Juan Agustín Maza [2]Instituto Argentino de Investigaciones en Zonas Áridas (IADIZA). Centro Científico Tecnológico (CCT)-Mendoza

[3]Facultad de Ciencias Médicas. UNCuyo [4]Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Castelar. Buenos Aires

diegogrilli@yahoo.com.ar

Resumen

En la región de Lavalle, Mendoza, las cabras componen su dieta con una alta proporción de especies arbustivas, las que constituyen una importante oferta de fibra vegetal. La gran eficiencia en la utilización de esa fibra puede deberse, entre otros factores, a las características de las bacterias ruminales fibrolíticas (celulolíticas y hemicelulolíticas). Por lo tanto, el estudio de estas bacterias adquiere gran importancia en los sistemas de producción caprina en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar, mediante pruebas bioquímicas y genéticas, bacterias fibrolíticas aisladas del rumen de cabras criollas. Las secuencias del gen que codifica para la subunidad 16S del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal (ácido desoxirribonucleico ribosomal o ADNr 16S) son una poderosa herramienta para la clasificación taxonómica de las bacterias ruminales y para demostrar la gran diversidad microbiana presente en el rumen de estos animales. En este trabajo se aislaron 13 cepas de bacterias anaerobias estrictas del rumen de cabras biotipo criollo que pastorean en el campo natural del Noreste de Mendoza. Una de ellas fue identificada genéticamente, utilizando la secuenciación del ADNr 16S, y fenotípicamente, mediante sus características morfológicas, el patrón de fermentación de diversos carbohidratos y los productos finales obtenidos a partir de estos procesos fermentativos. Los resultados obtenidos apoyan la designación de esta cepa como perteneciente al género *Pseudobutyrivibrio ruminis*, un biotipo recientemente clasificado de la bacteria celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens*. Estos biotipos son predominantes en el rumen de animales adaptados a rigurosas condiciones de alimentación y a dietas de baja calidad nutricional. Fue la primera vez que se logró el aislamiento y la identificación de una cepa bacteriana a partir del contenido ruminal de cabras criollas.

Introducción

En la región de Lavalle, Mendoza, las cabras componen su dieta con una alta proporción de especies arbustivas, las que constituyen una importante oferta de fibra vegetal (Allegretti y otros, 2005). La gran eficiencia en la utilización de la fibra por parte de estas cabras puede deberse, entre otros factores, a las características de las bacterias fibrolíticas (celulolíticas y hemicelulolíticas). Por lo tanto, el estudio de estas poblaciones bacterianas adquiere gran importancia en los sistemas de producción caprina en nuestro país. Las secuencias del ADNr 16S pueden ser una poderosa herramienta para la clasificación taxonómica de las bacterias (Kobayashi, 2006). El análisis de estas secuencias fue iniciado por Whitford y otros (1998), continuado por Tajima y otros (1999) a partir del contenido ruminal de bovinos y ovinos. Hasta el momento no se han analizado muestras de contenido ruminal pertenecientes a la especie caprina por medio de esta metodología. Según el análisis comparativo de las secuencias del gen ADNr 16S obtenidas de rumiantes alimentados en el campo natural, la proporción de bacterias desconocidas en el rumen es muy alta (Yamano y otros, 2003). En consecuencia, el rumen de estos animales puede contener una mayor cantidad de bacterias anaerobias cuya función es totalmente desconocida. Algunas de éstas podrían ser responsables de la adaptación de los rumiantes a dietas de baja calidad nutricional que contienen fibras poco digestibles y factores antinutricionales, como los taninos (Nishitani y Osawa, 2003). Se ha propuesto utilizar estas bacterias desconocidas en el rumen como probióticos o como fuentes de enzimas para la formulación de estrategias de manipulación de la fermentación ruminal (Kobayashi, 2006), orientadas a mejorar la nutrición y, por lo tanto, la producción caprina. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar, mediante pruebas bioquímicas y genéticas, bacterias fibrolíticas aisladas del contenido ruminal de cabras criollas.

Materiales y métodos

En este estudio se utilizaron cabras biotipo criollo, adultas, hembras, de 3 años de edad, que fueron sometidas a un proceso quirúrgico de fistulización ruminal según lo recomendado por Grilli y otros (2009a). Estos animales fueron trasladados al Noreste de Lavalle, Mendoza (zona hiperárida y desértica) y conducidos para realizar el pastoreo a campo natural durante 15 días. Al finalizar este tiempo se tomaron

muestras del contenido ruminal a las 22 horas desde la última ingesta de alimento (Grilli y otros, 2009b). A partir de este contenido ruminal se realizaron el aislamiento y la purificación de varias cepas bacterianas, siguiendo las recomendaciones de Bryant y Burkey (1953). Las cepas aisladas y purificadas fueron acondicionadas para la extracción de ADN por el procedimiento de fenol-éter (Sambrook y otros, 1989). A partir del ADN extraído se amplificaron las regiones del gen ADNr 16S mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR o Polymerase Chain Reaction), utilizando el kit QIAamp DNA Stool (Byodinamics). El fragmento amplificado por PCR fue purificado con el kit Illustra GFX™ (GE Healthcare). Este fragmento fue clonado en un vector plasmídico para secuenciación (pCR®4-TOPO®) y con este vector se transfectaron *Escherichia coli* competentes (One Shot®TOP10) utilizando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Posteriormente se procedió con el cultivo de las E. coli competentes en un medio Luria-Bertoni con ampicilina y se realizó la selección de las bacterias recombinantes resistentes a este antibiótico. Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit Illustra Plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare). La secuenciación del ADN plasmídico purificado se realizó por el método de Sanger con secuenciadores capilares. Para la identificación genética de las cepas aisladas se usaron las secuencias editadas del ADNr 16S y se construyó un árbol filogenético. La identificación bioquímica de las cepas aisladas se fundamentó en los estudios de fermentación de diversas fuentes de carbono y en los productos finales obtenidos a partir de la fermentación de la glucosa. Esta última se realizó utilizando un cromatógrafo de gases, como lo describieron Erwing y otros (1961).

Resultados y discusión

A partir del contenido ruminal de cabras criollas que pastoreaban en el campo natural, se aislaron y purificaron 13 cepas de bacterias ruminales anaerobias estrictas. Una de ellas fue identificada según el análisis filogenético del gen ADNr16S. Se determinó que la cepa 153 está estrechamente relacionada con la bacteria ruminal *Pseudobutyrivibrio ruminis*, descripta por Van Gylswyk y otros (1996).

La secuencia de nucleótidos de este gen se depositó en el GenBank bajo el número de acceso JN619348. La cepa aislada fue caracterizada morfológicamente como pequeños bacilos curvos, Gram negativos, anaerobios estrictos. Los hidratos de carbono que permitieron el crecimiento de la cepa *P. ruminis* 153 fueron glucosa, maltosa, xilosa, manosa, galactosa, celobiosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrina, xilano y carboximetilcelulosa (CMC). Se determinó que, a partir de 28mM de glucosa, la cepa *P. ruminis* 153 produjo 10mM de ácido butírico y 17mM de ácido láctico como los principales productos finales de fermentación, y una pequeña cantidad de ácidos acético y propiónico (menos de 1mM). La producción de lactato es una de las principales características para la identificación de *P. ruminis* (Van Gylswyk y otros, 1996). Estos resultados apoyan la designación de la cepa como perteneciente al género *Pseudobutyribivibrio ruminis*, un nuevo biotipo recientemente clasificado de la bacteria fibrolítica *Butyrivibrio fibrisolvens*. Estos biotipos bacterianos son predominantes en el rumen de animales adaptados a rigurosas condiciones de alimentación y a dietas de baja calidad nutricional (Orpin y otros, 1985; Forster y otros, 1996, y Kobayashi, 2006), similares a las condiciones de alimentación de las cabras sometidas a pastoreo en el campo natural durante el invierno. Éste fue el primer aislamiento reportado de una cepa bacteriana a partir del contenido ruminal de cabras criollas.

Bibliografía

Allegretti, L.; Passera, C.; Páez, J.; Úbeda, A.; Sartor C. y Robles A. 2005. Capacidad sustentadora y composición botánica de la ingesta caprina en un ecosistema árido, Lavalle, Argentina. En: Producciones agroganaderas. p. 405. España.

Bryant, M. y Burker, A. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. J Dairy Sci 36: 205-217.

Erwin, E.; Marco, G. y Emery, E. 1961. Volatile fatty analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J Dairy Sci 44: 1768-1771.

Forster, R.; Teather, R.; Gong, J. y Deng, S. 1996. 16S rDNA analysis of Butyrivibrio fibrisolvens: phylogenetic position and relation to butyrateproducing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. Lett Appl Microbiol., 23, 218-222.

Grilli, D.; Páez, S.; Egea, V.; Degarbo, S.; Lausi, O.; González, J.; Sosa Escudero, M. y Arenas, G. N. 2009a. Counts of ruminal bacteria collected by nasal tube or ruminal fistula in Somalia's sheep. Biocell 33: A76.

Grilli, D.; Páez, S.; Egea, V.; Cobos, E.; Cerón, M.; Degarbo, S.; Tellechea, A.; Allegretti, L. y Arenas, G. N. 2009b. Variación post-ingesta en el conteo de bacterias celulolíticas ruminales en cabras criollas. VI Jornadas Internacionales de Veterinaria. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Kobayashi, Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. Anim Sci J 77: 375-385.

Nishitani, Y. y Osawa, R. 2003. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. J Microbiol Meth 54:281-284.

Orpin, C.; Mathisen, S.; Greenwood, Y. y Blix, A. 1985. Seasonal changes in the ruminal micloflora of the high-arctic Svalbard reindeer (Rangifer tarandus platyrhynchus). Appl Environ Microbiol 50: 144-151.

Sambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.

Tajima, K.; Aminov, R.; Nagamine, T.; Ogata, K. y Nakamura, M. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. FEMS Microbiology Ecology 29:159-169.

Van Gylswyk, N.; Hippe, H.; Rainey, F. 1996. Pseudobutyrivibrio ruminis gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles Butyrivibrio jibrisolvens in phenotype. Int J Sys Bacteriol 46: 559-563.

Whitford, M.; Forster, R.; Beard, C.; Gong, J. y Teather, R. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. Anaerobe 4:153-163.

Yamano, H.; Ichimura, Y.; Kobayashi, Y.; Tanaka, K.; Ozaki, N. y Suzuki, M. 2003. Seasonal variation of rumen bacterial flora of wild yeso sika deer as characterized by comparative 16S rDNA sequencing and PCR-aided monitoring. En: Ohmiya, K.; Sakka, K.; Karita, S. (Eds). Biotechnology of Lignocellulose. Degradation and Biomass Utilization. pp. 326-329. Ed. Uni Publishers. Tokyo, Japan.