

Efecto del nivel de fibra soluble y de la relación omega-6/omega-3 sobre la colonización microbiana en gazapos lactantes

Effect of level of soluble fibre and omega-6/omega-3 ratio on microbiota colonization in suckling rabbits

Delgado R.¹, Badiola I.², Abad-Guamán R.¹, Nicodemus N.¹, Villamide M.J.¹, Pérez de Rozas A.², Menoyo D.¹, Carabaño R.¹, García J.^{1*}

¹ Departamento de Producción Agraria, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

² CReSa (UAB-IRTA).

*Dirección de contacto: javier.garcia@upm.es

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fibra soluble y la relación n-6/n-3 sobre la microbiota de las heces y la leche de las conejas y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de los gazapos en la primera semana de lactación. Se formularon cuatro piensos organizados factorialmente: dos niveles de fibra soluble (7,8 vs. 14,4%) y dos ratios diferentes de n-6/n-3 (13,4 vs. 3,5). Se utilizaron 20 hembras nulíparas Neozelandés blanco x California (5/tratamiento). Cinco días tras el parto se extrajo leche de las conejas, se sacrificó un gazapo/coneja para obtener los NLM y se recogieron heces de las conejas de los nidales. En estas muestras se extrajo el ADN microbiano y se secuenció. Los datos confirman la presencia de microbiota tanto en la leche de la coneja como en los NLM de los gazapos. Casi la totalidad de las unidades taxonómicas operacionales (UTOs) obtenidas en los NLM también fueron encontradas en la leche y/o en las heces. La microbiota de la leche y de los NLM tuvo más parecido entre sí, mientras que la de las heces difirió claramente de ambas. Las heces se agruparon en función del nivel de fibra soluble, y los NLM en función del nivel de ácidos grasos n-3, lo que no se observó en el caso de la leche. Las UTOs más importantes en los NLM fueron Bacteroides (8º en heces y 51 en leche), Pelomonas (1º en leche y no aparece en heces), Xanthomonas (10º en leche y no aparece en heces), y bacterias sin identificar (1º en heces y 6º en leche). El género Lactobacillus se identificó en muestras de leche y NLM, pero no en las heces. Los tratamientos influyeron en la proporción de cada UTO en la mayor parte de las muestras.

Palabras clave: fibra soluble, n-6/n-3, microbiota, conejo.

Abstract

The aim of this work was to study the effect of dietary soluble fiber and the n-6/n-3 ratio on milk and faecal microbiota of rabbit does and mesenteric lymph nodes (MLN) microbiota of suckling rabbits in the first week of lactation. To this end, a factorial design was used with two soluble fibre levels (7.8 vs. 14.4%) and two n-6/n-3 ratio (13.4 vs. 3.5). Twenty rabbit does (5/diet) were used. Five days after kindling milk was collected, one kit per doe was slaughtered and MLN collected and rabbit does faeces were also sampled from the nest. In these samples microbial DNA was extracted and sequenced. It was confirmed the presence of microbiota both in doe milk as in NLM of suckling kits. Most of the operational taxonomic units (OTUs) detected in MLN were also found in milk and/or faeces. Milk and MLN microbiota profile were more similar compared to faecal microbiota. The latter was influenced by the level of soluble fiber and NLM microbiota by the level of n-3 fatty acids, but this was not observed for milk. The most abundant OTUs in MLN was Bacteroides (8th in faeces and 51 in milk), Pelomonas (1st in milk), Xanthomonas (10th in milk), and unclassified bacteria (1st in faeces and 6th in milk). The genus Lactobacillus was identified in milk and MLN samples but it was not observed in faeces. Treatments influenced OTUs proportion in most of the samples.

Keywords: soluble fibre, n-6/n-3, microbiota, rabbit.

Introducción

La colonización microbiana de los neonatos parece que comienza al pasar por el canal del parto y prosigue debido a la microbiota presente en la leche materna. Esta microbiota procede del tracto digestivo y alcanza el tracto reproductor y la glándula mamaria mediante translocación, como se ha observado en ratonas y mujeres (Gavin y Ostovar, 1977; Welsh y May, 1979; Heikkila y Saris, 2003; Martín et al., 2004; Donnet-Hughes et al., 2010). Además, la microbiota ambiental que se encuentra el neonato tras el parto (aquella presente en el nidal en el caso del gazapo), completa el estímulo microbiano que es fundamental para la maduración del sistema inmune (Hanson y Lanning, 2008). Por otra parte, se ha observado en ratones y gazapos que en los primeros días de vida se produce una traslocación significativa de bacterias desde el tracto digestivo a los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM. Urao et al., 1996; Delgado et al., 2015a), cuyo significado biológico no está claro. El objetivo de este trabajo es confirmar con técnicas de secuenciación la presencia de microbiota en la leche de coneja y en los NLM de gazapos en la primera semana de lactación, caracterizarla, y evaluar la influencia que tiene el nivel de fibra soluble y el ratio n-3/n-6 del pienso suministrado a la madre sobre la microbiota de los NLM de los gazapos.

Materiales y métodos

Se diseñaron 4 tratamientos con unos niveles de PB y de FND del 16,4 y 34,6% MS, respectivamente organizados factorialmente (2x2) con dos niveles de fibra soluble (FS) (7,8 vs. 14,4% MS) y dos niveles de ácidos grasos n-3 (3,6 vs. 13,5 g/100 g ácidos grasos y un valor medio de ácidos grasos n-6 de 47,9 g/100 g ácidos grasos). De este modo se obtuvieron 4 piensos, dos con baja FS y con distinta relación n-6/n-3 (BF_Bn-3 y BF_An-3) y otros dos piensos con mayor contenido de FS (AF) y distintos niveles de n-3 y n-6 (AF_An-3 y AF_Bn-3) (la composición se muestra en la comunicación presentada en este Symposium por Delgado et al., 2015b). Se utilizaron 20 hembras nulíparas Neozelandés blanco x California (5/tratamiento) que se inseminaron a los 130 días de edad con un peso medio de $3,93 \pm 0,30$ kg. Cinco días tras el parto se extrajeron 15 ml leche que se recogieron en tubos estériles (desechando los primeros chorros). Simultáneamente, se procedió al sacrificio de un gazapo perteneciente a cada una de las camadas para extraer los NLM bajo condiciones de esterilidad. Además, durante la primera semana de lactación se recogió diariamente una muestra de heces de las conejas de los nidales. El ADN de las muestras se extrajo y se amplificó utilizando un serie de 21 primers especialmente diseñados para secuenciar los dominios centrales del gen 16S rDNA. Los productos amplificados fueron analizados utilizando el chip 316 de Ion-Torrent y las secuencias obtenidas se analizaron con diferentes herramientas del Ribosomal Database Project y programas ad hoc realizados en lenguaje Python. Se obtuvieron de media 168971 ± 22686 secuencias/muestra. Los datos se analizaron mediante un modelo logístico considerando una distribución binomial y para la construcción del dendograma se utilizó una distancia euclídea considerando las UTOs en las que se pudo identificar el género.

Resultados y discusión

Los datos confirman la presencia de secuencias de ADN bacteriano tanto en la leche de la coneja como en los NLM de los gazapos. De todas las secuencias obtenidas se pudo identificar el género de la misma en un 66 (NLM), 56 (leche) y 15% (heces) de los casos. El dendograma (Figura 1) indica que la microbiota de la leche y de los NLM tuvo más parecido entre sí, mientras que la de las heces difirió claramente de ambas. Las heces se agruparon en función del nivel de fibra soluble, mientras que los NLM lo hicieron en función del nivel de ácidos grasos n-3, sin observarse tendencia alguna en el caso de la leche. Casi la totalidad de los UTOs obtenidos en los NLM también fueron encontrados en la leche y/o en las heces, salvo alguna excepción (Wautersiella, Figura 2), sugiriendo que estos dos podrían ser los orígenes principales de la microbiota de los NLM. Los UTOs más importantes en los NLM fueron Bacteroides (8º en heces y 51 en leche. Tabla 1), Pelomonas (1º en leche y no aparece en heces), Xanthomonas (10º en leche y no aparece en heces), y bacterias sin identificar (1º en heces y 6º en leche). Es interesante destacar la identificación del género Lactobacillus en muestras de leche y NLM, pero no en las heces (Figura 2). El efecto de los tratamientos sobre estas y otras UTOs de interés se muestra en la Figura 2.

Figura 1. Efecto del nivel de fibra soluble y de la relación n-6/n-3 sobre la tasa de similitud del perfil microbiano en heces de coneja de inicio de lactación, leche de día 6 de lactación y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de gazapos de 6 d de edad. Sólo se utilizaron las unidades taxonómicas operacionales que llegaron a género (AF y BF: alta y baja fibra soluble. AW3 y BW3: alto y bajo contenido en ácidos grasos w3).

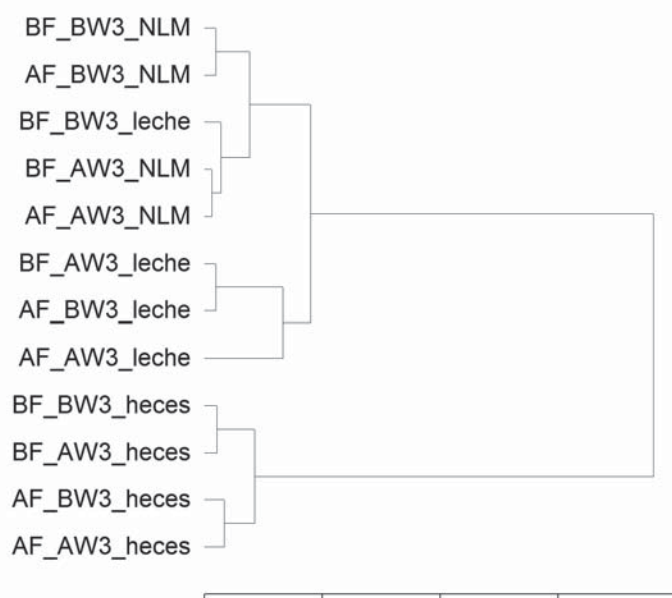
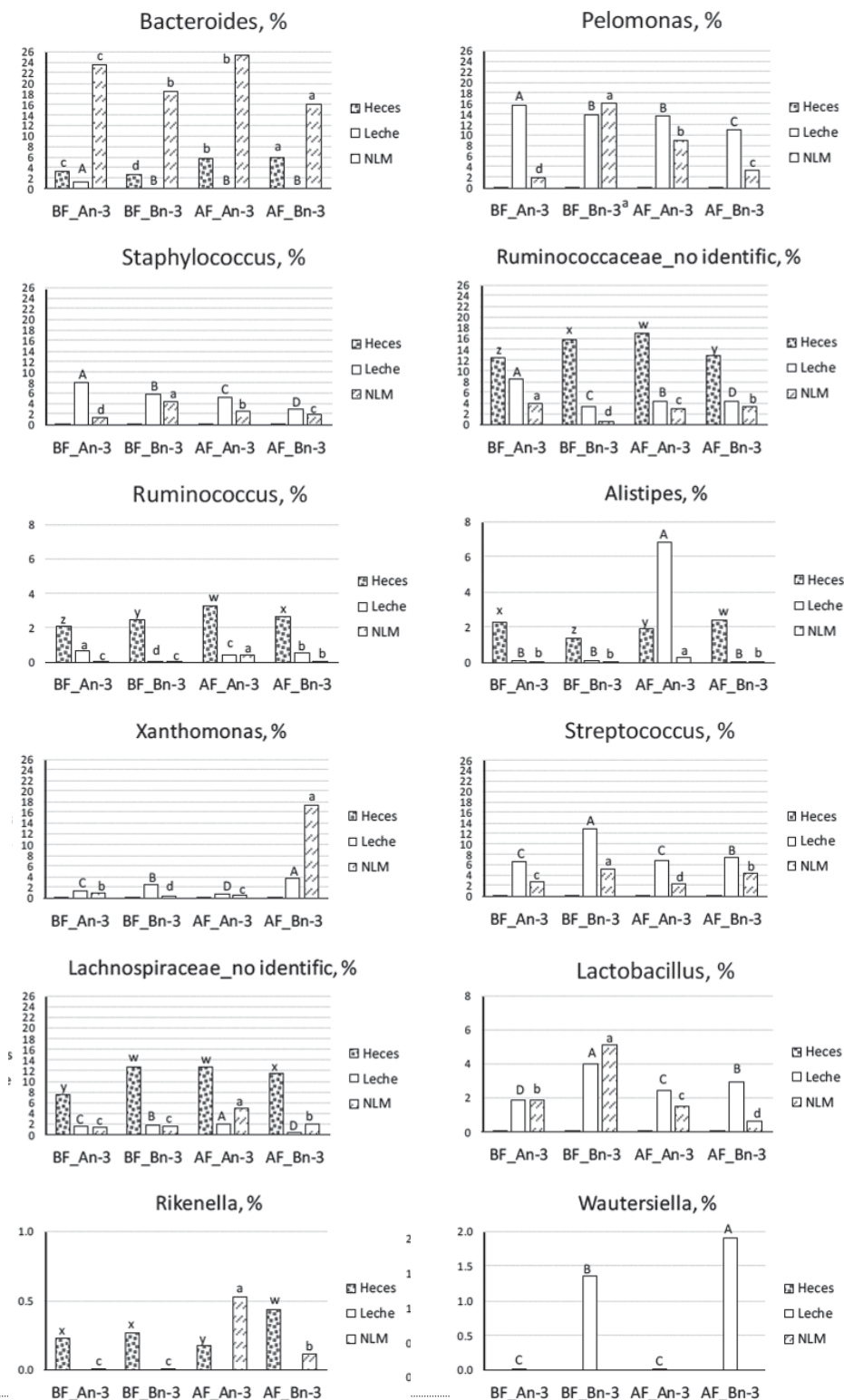


Tabla 1. Principales unidades taxonómicas operacionales (UTOs) obtenidas en la leche, heces y nódulos linfáticos mesentéricos.

Leche	Heces	NLM
1 Pelomonas	unclassified_Bacteria	Bacteroides
2 Streptococcus	unclassified_Ruminococcaceae	Pelomonas
3 unclassified_Comamonadaceae	unclassified_Porphyrimonadaceae	Xanthomonas
4 unclassified_Flavobacteriaceae	unclassified_Lachnospiraceae	unclassified_Bacteria
5 Staphylococcus	unclassified_Firmicutes	unclassified_Comamonadaceae
6 unclassified_Bacteria	unclassified_Clostridiales	Streptococcus
7 unclassified_Ruminococcaceae	unclassified_Bacteroidetes	Odoribacter
8 unclassified_Burkholderiales	Bacteroides	unclassified_Burkholderiales
9 Lactobacillus	Ruminococcus	unclassified_Ruminococcaceae
10 Xanthomonas	Alistipes	Staphylococcus
11 unclassified_Firmicutes	Barnesiella	unclassified_Lachnospiraceae
12 unclassified_Lachnospiraceae	unclassified_Bacteroidales	Lactobacillus
13 unclassified_Clostridiales	Clostridium IV	unclassified_Bacteroidetes
14 unclassified_Lactobacillales	unclassified_Clostridia	unclassified_Clostridiales

Figura 2. Efecto del nivel de fibra soluble y de la relación n-6/n-3 sobre el perfil microbiano en heces de coneja de inicio de lactación, leche de día 6 de lactación y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de gazapos de 6 d de edad. Dentro de cada tipo de muestra, letras diferentes (wxyz: heces, ABCD: leche, abcd: NLM) indican medias distintas ($P < 0,05$). Se muestra el número de secuencia de un determinado grupo bacteriano (unidad taxonómica operacional, mayoritariamente géneros) respecto al total de secuencias obtenidas en cada muestra (procedente de la mezcla de 5 conejas o gazapos por tratamiento) (AF y BF: alta y baja fibra soluble. AW3 y BW3: alto y bajo contenido en ácidos grasos w3).



Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-23885. Agradecemos a Enrique Blas habernos enseñado a ordeñar las conejas, así como por la fabricación de los piensos.

Bibliografía

- Delgado R., Nicodemus N., Abad-Guamán R., Menoyo D., García J., Carabaño R. 2015a. Effect of dietary supplementation with arginine and glutamine of rabbit does on the microorganism translocation and immune response at different ages of their litters. Comunicación aceptada en el 66 Encuentro Annual de la EAAP.
- Delgado R., Abad-Guamán R., Nicodemus N., Sastre J., Menoyo D., Carabaño R., García J. 2015b. Efecto del nivel de fibra soluble y de la relación omega-6/omega-3 sobre el consumo de agua en gazapos en cebo. 40 Symposium de Cunicultura. Santiago de Compostela.
- Donnet-Hughes A., Perez P.F., Doré J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero I., Schiffrin E.J. 2010. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc. Nutr. Soc.*, 69:407-415.
- Gavin A., Ostovar K. 1977. Microbiological characterization of human milk. *J. Food Protec.*, 40:614-616.
- Hanson N.B., Lanning D.K. 2008. Microbial induction of B and T cell areas in rabbit appendix. *Dev. Comp. Immunol.*, 32, 980-991.
- Heikkila MP, Saris P.E. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. App. Microbiol.*, 95, 471-478.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J., Rodríguez J.M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 15:121-127.
- Urao M., Teitelbaum D.H., Drongowski R.A., Coran A.G. 1996. The association of gut-associated lymphoid tissue and bacterial translocation in the newborn rabbit. *J. Ped. Surg.*, 31(11):1482-1487.
- Welsh J.K., May J.T. 1979. Anti-infective properties of breast milk. *J. Pediatr.*, 94:1-9.