

CAMBIOS EN LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DEL RUMEN ASOCIADOS AL CONSUMO DE HOJAS JOVENES DE ROBLE (*QUERCUS PYRENAICA*) Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA APARICIÓN DE INTOXICACIONES EN GANADO VACUNO

Belenguer, A.¹, Hervás, G.¹, Doce, R.R.¹, Yáñez-Ruiz, D.R.², Santos N.¹, Mantecón, A.R.¹ y Frutos P.¹

¹Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León.
A.Belenguer@eae.csic.es. ²Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Camino del jueves s/n, 18100 Armilla, Granada.

INTRODUCCIÓN

En las zonas de media montaña de nuestro país, el ganado vacuno presenta con frecuencia intoxicaciones asociadas a la ingestión de cantidades elevadas de hojas jóvenes de roble (*Quercus pyrenaica*) en primavera, cuando la disponibilidad de pasto es baja. Dichas hojas jóvenes son ricas en taninos hidrolizables (TH) que parecen ser los responsables de las intoxicaciones. Además, estos taninos afectan al crecimiento de diversas comunidades microbianas del rumen, aunque también se han descrito algunas capaces de resistir e incluso metabolizar los TH (Smith et al., 2005). El metabolismo microbiano de los TH es un mecanismo de protección de los microorganismos, que los convierten en compuestos inocuos para ellos. Aunque algunos metabolitos (ácido gálico, pirogalol) pueden ser también tóxicos para el animal, otros son inofensivos (resorcinol, floroglucinol) e incluso sustancias beneficiosas (ácidos acético y butírico). Por tanto, los microorganismos del rumen podrían desempeñar un papel fundamental tanto en la aparición de intoxicaciones por la ingestión de hojas jóvenes de roble como en su prevención, gracias a su actividad metabólica. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de hojas jóvenes de roble, ricas en TH, sobre las comunidades microbianas del rumen e investigar una posible relación entre ciertos grupos bacterianos y la aparición o no de las intoxicaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primavera, se recogieron hojas muy jóvenes (HR) de una zona de bardales de roble melojo (*Quercus pyrenaica*) y se congelaron a -30°C hasta el experimento. Su contenido de taninos totales fue 230 g de equivalentes de ácido tánico/kg de materia seca (MS) y de ácidos gálico y elágico, 19 y 11 g/kg MS, respectivamente (Doce et al., 2008). Tres erales de raza parda (aprox. 1,8 años de edad, 498 ± 22,2 kg de PV inicial), canulados en el rumen y establecidos individualmente, fueron alimentados durante un periodo de adaptación de 10 días con 5 kg diarios de MS de heno de hierba. Posteriormente fueron sometidos a un periodo de restricción severa del alimento (simulando la situación de escasez a la que se enfrentan los animales en condiciones reales cuando consumen las HR; días -8 a -1): 4 kg MS de heno durante dos días, 3 kg durante un día, 2 kg durante los siguientes cuatro días y finalmente un día de ayuno. A continuación se comenzó la administración de las HR, junto con el heno: 14 g MS de heno más 14 g MS de HR/kg PV^{0.75} (de media 1,7 kg de heno y 5 kg de HR, en fresco) durante 6 días consecutivos (días 1 a 6). El heno se ofertó en una sola toma, a las 9.00 h. En cambio, las HR, descongeladas y troceadas ligeramente, se administraron en dos tomas (aproximadamente a las 8.30 y 20.00 h), a través de la cánula ruminal, para asegurar que todos los animales recibían la cantidad establecida. A partir del día 7, los erales recibieron la misma cantidad de heno que en el periodo de adaptación durante 12 días más (días 7 a 18) hasta que fueron eutanasiados. Se tomaron muestras del contenido ruminal para la extracción de ADN microbiano antes de la restricción de alimento (día -10), inmediatamente después de esta (día 1), tras 2 y 5 días del comienzo de la administración de las HR (días 3 y 6), y 4 y 12 días después de finalizar dicha administración (días 10 y 18). El contenido ruminal fue congelado inmediatamente a -80°C. Además, aproximadamente cada dos días se recogieron muestras de sangre para analizar la concentración de urea y creatinina en el plasma mediante espectrofotometría. El ADN microbiano del contenido ruminal liofilizado fue extraído siguiendo una modificación del protocolo descrito por Yu y Morrison (2004), purificado para eliminar restos de taninos, que pueden inhibir la PCR, y analizado mediante la técnica del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (trFLP). Para ello el ADN fue amplificado mediante PCR utilizando cebadores específicos para bacterias, estando uno de ellos marcado con fluorescencia. El producto de la PCR fue purificado y a continuación digerido utilizando un

enzima de restricción (HhaI). Los productos de dicha digestión fueron purificados y los fragmentos se analizaron en un secuenciador capilar automático. El perfil de picos obtenido mediante tRFLP fue analizado mediante el programa *GeneMarker* (Softgenetics, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta experimental a la administración de las HR fue muy variable. El animal 1 no mostró signos de intoxicación en ningún momento. Por su parte, los animales 2 y 3 mostraron debilidad, anorexia y depresión a los dos o tres días de la administración de las HR. Además, la motilidad ruminal disminuyó y aparecieron diarrea y constipación. Se produjo un descenso muy marcado de la ingestión (Figura 1) y una severa oliguria. En las intoxicaciones por TH el principal órgano diana es el riñón, lo que explicaría el incremento en los niveles de urea y creatinina plasmáticas en los animales intoxicados (Figura 1). Sin embargo, el animal 3 comenzó a mostrar signos de recuperación aproximadamente una semana después de interrumpir la administración de las HR, como reflejan la mayor ingestión de heno y el descenso de las concentraciones de urea y creatinina a niveles normales (Figura 1). Tras la eutanasia, sólo el animal 2 presentaba lesiones importantes en los riñones y el aparato digestivo, caracterizadas principalmente por nefromegalia y lesiones ulcerosas en la mucosa oral, el esófago, los preestómagos y el abomaso.

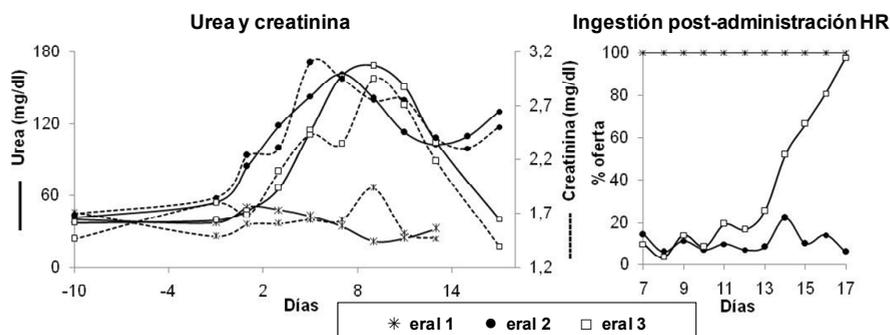


Figura 1. Concentraciones de urea (línea sólida; mg/dl) y creatinina (línea discontinua; mg/dl) en el plasma a lo largo del experimento e ingestión de heno (% de la oferta) post-administración de las HR, en los tres erales utilizados.

Los resultados obtenidos mediante tRFLP se utilizaron para construir el dendrograma que se presenta en la Figura 2, donde se puede observar un claro agrupamiento de los perfiles microbianos de las muestras del animal 1, que no se intoxicó, junto con el de la muestra del animal 3 tras su recuperación. Por otra parte, se aprecia un segundo grupo, con el resto de las muestras, en el que a su vez las iniciales de los erales 2 y 3 se sitúan de forma separada a las obtenidas durante la intoxicación aguda. Las diferencias en la composición microbiana, posibles determinantes del efecto de la ingestión de las HR, podrían deberse a comunidades capaces de metabolizar los TH, como algunas especies del género *Streptococcus* (Goel et al., 2005), cuya abundancia era superior en los animales intoxicados inicialmente y tras la administración de las HR (Belenguer et al., 2008). Además, en los erales intoxicados, que presentaban HR en el rumen incluso tras finalizar su administración, y especialmente en el animal 2, los perfiles microbianos obtenidos mediante tRFLP revelan un incremento significativo de fragmentos que podrían corresponder a especies bacterianas pertenecientes a las divisiones *Proteobacteria*, tras el comienzo de la administración de las HR, y *Actinobacteria*, tras interrumpir dicha administración. Algunas bacterias de ambos grupos parecen ser resistentes a los taninos (Jones et al., 1994; Bhat et al., 1998) e incluso determinadas especies pueden degradarlos hasta pirogalol (Odenyo et al., 2001), por lo que podrían estar relacionadas con la presencia de HR en el rumen o con las intoxicaciones.

La composición microbiana del rumen podría ser uno de los factores clave que determina la respuesta del ganado vacuno a la ingestión de productos ricos en TH, como las hojas jóvenes de roble. Sin embargo, la identificación y confirmación de los principales

microorganismos responsables del metabolismo de los TH y de su implicación en la intoxicación o en su prevención exige más estudios de este tipo del ecosistema ruminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belenguer, A., Hervás, G., Paz, P., Ezquerro, C. & Frutos, P. 2008. Proceedings of the 6th INRA-RRI Symposium: Gut microbiome, 27, Clermont-Ferrand, Francia.
- Bhat, T. K., Singh, B. & Sharma, O. P. 1998. *Biodeg.* 9: 343-357.
- Doce, R. R., Hervás, G., Belenguer, A., Toral, P. G., Giráldez, F. J. & Frutos, P. 2008. *Anim. Feed Sci. Technol.* (en prensa).
- Goel, G., Puniya, A. K., Aguilar, C. N. & Singh, K. 2005. *Naturwiss.* 92: 497-503.
- Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D. & Cheng, K. J. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1374-1378.
- Odenyo A. A., Bishop R., Asefa G., Jamnadass R., Odongo D. & Osuji P. 2001. *Anaerobe* 7: 5-15.
- Smith, A. H., Zoetendal, E. & Mackie, R. I. 2005. *Microbial Ecol.* 50: 197-205.
- Yu, Z. & Morrison, M. 2004. *BioTechniques* 36: 808-812.

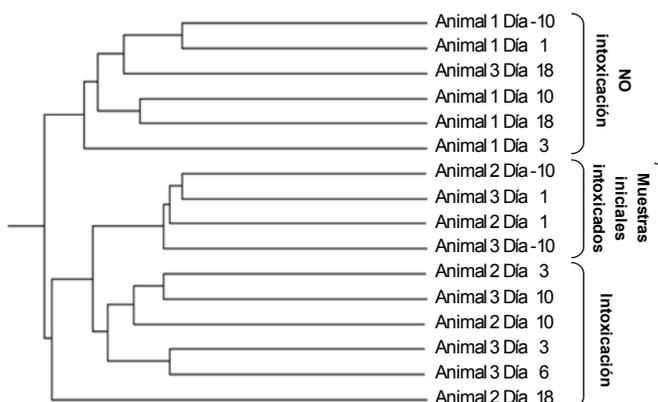


Figura 2. Dendrograma obtenido mediante tRFLP a partir de las muestras tomadas de los tres erales a lo largo del experimento.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC; Proyecto AGL2004-06076-C02-01). A. Belenguer ha disfrutado de un contrato postdoctoral del programa I3P del CSIC y R.R. Doce de una beca predoctoral del MEC.

CHANGES IN THE RUMEN BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH THE CONSUMPTION OF YOUNG OAK (*QUERCUS PYRENAICA*) LEAVES AND THEIR POSSIBLE RELATIONSHIP WITH INTOXICATIONS IN CATTLE

ABSTRACT: Intoxication of grazing cattle occurs repeatedly when they consume large amounts of young oak (*Quercus pyrenaica*) leaves (OL), that are rich in hydrolysable tannins (HT). In order to study the effect of the administration of HT-rich OL on the rumen bacterial communities and investigate a possible relationship between these and the intoxications, three ruminally cannulated bulls were subjected to a severe feed restriction period, before receiving OL for 6 days. Then, they were offered grass hay for 12 more days. Rumen contents were sampled throughout the experiment and terminal restriction fragment polymorphism (tRFLP) were used to monitor the bacterial dynamics. Animal 1 was not intoxicated, whereas animals 2 and 3 showed acute signs of intoxication with the OL administration. However, animal 3 presented signs of recovery approximately one week after stopping the OL administration. The microbial profiles of animal 1 clustered separately from animals 2 and 3, except for the sample from animal 3 on day 18, when this animal was recovered. These results suggest that individual composition of the rumen microbiota might be a key factor in determining the effect of the consumption of HT-rich OL in grazing ruminants.

Keywords: hydrolysable tannin, rumen bacteria, intoxication, molecular technique.