

DESARROLLO ANATÓMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL RUMEN: EFECTO DE LA EDAD Y TIPO DE DIETA

Belanche, A.¹; De La Fuente, G.¹; Yañez-Ruiz, D.R.²; Calleja, L.¹; Balcells, J.¹.

belanche@unizar.es balcells@unizar.es

¹Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos
Universidad de Zaragoza, M. Servet 177, 50013 Zaragoza,

²Institute of Rural Sciences, University of Wales, SY23 3AL, Aberystwyth, Reino Unido

INTRODUCCIÓN

En el rumiante recién nacido, el retículo-rumen constituye sólo una pequeña parte del tracto digestivo (25-30%) pero de forma temprana estos compartimentos iniciaran un crecimiento alométrico hasta alcanzar, en el animal adulto, un tamaño que se acerca al 80% (Getty, 1975) del tamaño total del tracto digestivo. En esta evolución, el destete representa su punto más crítico y los factores principales que gobiernan este proceso son el acceso del animal pre-rumiante a dietas fibrosas, el asentamiento de ciertas poblaciones microbianas y la interacción entre ambos procesos.

El presente ensayo se pretende estudiar la evolución de ambos factores haciendo especial hincapié en el impacto del destete sobre la relación entre la población y el animal hospedador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado tres grupos de cinco corderos de Rasos sacrificados a la edad de 30, 45 y 90 días respectivamente. Siguiendo el protocolo de alimentación utilizado convencionalmente, los corderos lactantes (30d) fueron alimentados exclusivamente con leche, el grupo de animales al destete (45d) tuvieron acceso las dos últimas semanas a pienso de cebo y paja, mientras que el último grupo (90 d) fueron finalizados con una ración compuesta por pienso de cebo y paja, ambos *ad-libitum*. Tras el sacrificio, se disecó y aisló el rumen y se procedió al pesaje de la víscera vacía y la digesta que se homogenizó y muestreó. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. Posteriormente el contenido ruminal fue filtrado a través de una doble capa de gasa. De la fracción líquida se tomaron muestras para la determinación de AGV (Jouany, 1982) y para el recuento óptico de protozoos (Dehority, 2003). El sólido resultante fue resuspendido en una solución de Coleman (William y Coleman, 1992) para liberar las bacterias ligadas débilmente y este segundo filtrado se añadió a la fracción líquida inicial. La fracción resultante fue dividida en dos mitades, de la primera se extrajeron las bacterias por centrifugación diferencial. De la segunda se extrajo la fracción protozoaria, para ello el líquido resultante fue diluido con una solución de Coleman y glucosa al 0,5% y los protozoos se dejaron flocular en un embudo de decantación. Posteriormente el precipitado fue sometido a una filtración diferencial (10-100µm Ø) para purificar el extracto protozoario que se utilizó, al igual que las bacterias extraídas como estándares para las técnicas moleculares cuantitativas (PCR a tiempo real).

La extracción del ADN de las muestras se realizó mediante QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, Carwley, West Sussex, UK). La concentración y pureza del ADN extraído fue determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

La cuantificación microbiana se realizó mediante PCR a tiempo real basada en la utilización del 16S y 18S ADNr como marcadores internos de bacterias y protozoos respectivamente, para ello se utilizaron sendos kits de cebadores testados y específicos para bacterias (Maeda *et al.*, 2003) y protozoos (Sylvester *et al.*, 2004). Las condiciones de la PCR cuantitativa fueron establecidas con el objeto de conseguir una máxima eficiencia de amplificación (>85%). En dicha técnica la utilización de diluciones seriadas de los estándares bacterianos y protozoarios que nos permitió relacionar linealmente el ciclo de amplificación con el logaritmo de la concentración de ADN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se pudieron detectar anomalías en el comportamiento de los animales en lo que se refiere a la adaptación a la dieta o al tratamiento experimental. En la Tabla 1 figura el consumo pormenorizado (g MS/d) de los ingredientes que compusieron la ración de los corderos. Tanto los valores medios referidos al consumo, peso y crecimiento se sitúan dentro de los límites descritos para esta especie (Balcells *et al.*, 1989) aunque llama la atención que los mayores ritmos de crecimiento (GMD, g/d) en nuestro experimento fue registrado en el peri-destete.

Coincide también con la literatura existente el crecimiento alométrico que se registró en la víscera, incrementando su tamaño relativo del 0.06 al 0.53 %, el caso de la víscera vacía y del 0.21 al 1.72 en el caso del contenido. En ambos casos y como era de esperar tanto el crecimiento de la víscera como su tamaño relativo fueron relanzándose con la edad aunque en ambos casos las diferencias alcanzaron significación estadística ($P < 0.001$).

En relación a los parámetros de fermentación citar que se produjo un aumento significativo en la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV, mM) desde los 60 registrados en los animales lactantes hasta los 440 registrados en los animales de 90 días. Nuestros resultados confirman que a edades muy tempranas, incluso con dietas lácteas, se pueden detectar procesos incipientes de fermentación microbiana en el rumen. Con el desarrollo de la víscera se modificó la concentración de AGV pero también las proporciones relativas de cada uno de ellos, así el incremento en la proporción de ácido propiónico (de 12 al 20%) lo fue en detrimento de la del ácido acético (del 82 al 73%). El cambio cualitativo en la concentración de AGV debería estar relacionado con el incremento en la ingestión de carbohidratos no estructurales derivada de la ingestión del concentrado. El descenso numérico en el pH reflejó el incremento en la concentración ruminal de AGV aunque las diferencias no llegaron a alcanzar relevancia estadística.

El análisis mediante PCR a tiempo real del ADN extraído de las muestras ruminales se presentan también en la Tabla 1. La presencia de una población microbiana incipiente en los animales lactantes se confirmó mediante la PCR a tiempo real, este ADN fue mayoritariamente de origen bacteriano y su concentración incrementó de forma significativa entre los 30 y 45 días (de 271 a 317 $\mu\text{g DNA/g MF}$ $P < 0.001$) para mantenerse posteriormente constante ($P > 0.01$). En los animales lactantes se detectó además la presencia de ADN protozoario en cantidades significativas (10% del microbiano) para desaparecer posteriormente durante el destete. La refaunación tras el destete, cuando existió (sólo en dos de cinco corderos), alcanzó las tasas más elevadas (25% del ADN microbiano). Defaunaciones y refaunaciones esporádicas, independientes del tratamiento experimental (ración/ desarrollo) han sido descritas previamente en la literatura existente (Fonty *et al.*, 1984; Petkov y Enev, 1979). El recuento e identificación de protozoos por microscopía óptica confirmó los resultados expuestos previamente. Dicha identificación confirmó además que la colonización ruminal se inicia con protozoos de la familia Entodiniinae (15-20d de edad), prosigue con la Ophryoscolicidae e Isochichiidae (25-50d) y finalmente coloniza la digesta la familia Diplodiinae (>50d) tal como fue descrito por Fonty *et al.*, (1984).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Balcells, J.; Castrillo, C.; Baucells, M.D.; Guada, J.A. (1989) Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales, 4, 99-109; 1989
- Dehority, B.A. (2003): Rumen Microbiology. Ed: Nottingham University Press. Pp. 43-73.
- Fonty, G., Jouany, J.P., Senaud, J., Gouet, Ph. And Senaud, J., (1984). Can. J. Anim. Sci., 64: 165-166.
- Getty, R. 1975. Sisson and Grossman's The Anatomy of the Domestic Animals 5th end, W. B. Saunders Co.
- Jouany, J.P. (1982). Sciencie des Aliments 2: 131-144.
- Maeda H.; Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, animoto I, Nishimura F.; Takashiba S (2003) FEMS Immunol Med Microbiol 39, 81-86.

Petkov, A; Enev, E.I., (1979). Ann. Rech. Vet., 10: 400-441.

Sylvester, J.T.; S.K.R. Karnati; Z. Yu; M. Morrison; and J.L. Firkins. (2004) In: J. Nutr. 134: 3378-3384.

Williams, A.G.; Coleman, G.S (1992). The Rumen Protozoa. New York: Brock Springer Series in Contemporary Bioscience, Springer-Verlag .

Tabla 1. Efecto de la edad/tipo de dieta sobre el crecimiento y peso al sacrificio de los corderos, el desarrollo del rumen y su microbiota así como su repercusión sobre la fermentación ruminal.

	30d	45d	90d	SE	P
<u>Ingestión:</u> (g MS/d)					
Total	147 ^c	507 ^b	1021 ^a	42.173	***
Leche	147	136		8.337	NS
Pienso de cebo		348 ^b	925 ^a	46.366	***
Paja de cebada		24 ^b	96 ^a	8.165	***
<u>Peso y crecimiento:</u>					
Peso sacrificio (kg)	8.39 ^c	15.23 ^b	23.55 ^a	0.763	***
GMD (g/d)	129 ^b	311 ^a	230 ^a	3.201	**
GMD (%PV/d)	1.54 ^a	2.04 ^a	0.97 ^b	0.178	**
<u>Desarrollo del rumen:</u>					
Rumen lleno (kg)	0.28 ^c	1.08 ^b	2.25 ^a	0.117	***
Rumen vacío (kg)	0.06 ^c	0.28 ^b	0.53 ^a	0.021	***
Digesta (kg)	0.21 ^c	0.80 ^b	1.72 ^a	0.107	***
Digesta (%PV)	2.51 ^c	5.23 ^b	7.29 ^a	0.406	***
<u>Microbiota (µg ADN/g MF)</u>					
Total Microbiano	271	317	362	33.870	NS
Bacteriano	245 ^b	317 ^a	271 ^{ab}	16.686	*
Protozoario	26	0.1	90	32.618	NS
<u>Parámetros de Fermentación:</u>					
pH	6.48	6.41	6.12	0.108	NS
AGV totales (mol/l)	0.06 ^c	0.24 ^b	0.44 ^a	0.055	**
Acetato (%)	82.29 ^a	79.89 ^a	73.35 ^b	2.058	*
Propionato (%)	11.69 ^b	16.34 ^{ab}	20.46 ^a	1.723	*
Butirato (%)	3.56	1.83	4.26	1.016	NS
<u>Recuento de Protozoos</u>					
Totales (x 10 ⁵ /ml)	2.5	0.0	15.1	5.402	NS
Entodiinae (%)	93.8 ^a	0.0	88.9 ^b	0.265	*
Diplodiinae (%)	0.0 ^b	0.0	11.1 ^a	2.251	**
Isotrichidae (%)	6.1 ^a	0.0	0.0 ^b	1.369	*