

IMPACTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA Y DEL TIPO DE FORRAJE SOBRE LA MICROBIOTA RUMINAL EN TERNEROS DE ENGORDE

Costa¹, S., de la Fuente¹, G., Llanes², N., Balcells¹, J., Mora¹, J. y Villalba¹, D.

¹ Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Lleida, Agrotecnio Center, 25198 Lleida;

² Cooperativa d'Ivars d'Urgell SCCL, 25260 Ivars d'Urgell; scosta@ca.udl.cat

INTRODUCCIÓN

Los sistemas ganaderos intensivos, como es el engorde de terneros, se enfrentan actualmente a diversos retos (Dumont *et al.*, 2014), entre los que destacan minimizar su impacto ambiental y reducir la competencia por alimentos de consumo humano. La optimización del nivel de proteína bruta (PB) de la ración puede tener beneficios ambientales, como la menor excreción de compuestos contaminantes al suelo y a la atmosfera. La sustitución de la paja por un forraje de mayor calidad puede mejorar las condiciones de fermentación, disminuir el consumo de cereales que pueden ser empleados para la alimentación humana y explotar la capacidad del animal rumiante de degradar alimentos fibrosos. En este trabajo, se analiza el impacto de la reducción del nivel de proteína de la ración y de la utilización de un forraje de calidad sobre la microbiota ruminal, en terneros sometidos a un régimen de engorde intensivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron 30 terneros machos de raza Frisona. El muestreo inicial consistió en nueve animales (**PRE**, 77 [±5] días de vida y ~105 kg de peso vivo [PV]) alimentados con una ración a base de concentrado *starter* y paja de cebada. A los 119 (±5) días de edad y 166 (±15) kg de PV, los animales se distribuyeron en tres lotes experimentales (los terneros muestreados en PRE se distribuyeron a razón de 3 por lote), alimentados con tres raciones experimentales distintas: concentrado de baja proteína (10% PB sobre materia fresca [MF]) y paja de cebada (**LP**) o concentrado control (12% PB sobre MF) y uno de los siguientes forrajes: paja de cebada (**CTR**) o ensilado de avena (**OATS**). Todos los alimentos fueron administrados *ad libitum*. Se procedió a muestrear el líquido ruminal en dos fases: (**GRO**, 160 [±5] días de edad y 222 [±22] kg de PV) y acabado (**FIN**, 281 [±5] días de edad y 445 [±31] kg de PV).

Durante la totalidad del período experimental, se controlaron diariamente de forma automática el PV y el consumo de concentrado de los animales. Las muestras de líquido ruminal (100 mL) se extrajeron mediante sonda esofágica y se congelaron inmediatamente (15 mL) en nieve carbónica. El ADN genómico de dichas muestras se extrajo y se determinaron las poblaciones de bacterias y arqueas mediante la secuenciación de las regiones V3 y V4 del ARN ribosómico 16S.

El estudio de la microbiota ruminal se realizó sobre los 9 terneros que fueron muestreados tres veces durante el período experimental. Se procedió al análisis multivariante (ANOSIM, NMDS) utilizando la herramienta R Core Team (2018). La identificación de los taxones causantes de las diferencias entre períodos experimentales se realizó mediante un análisis discriminante lineal (LEfSe) utilizando la plataforma online Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Con los datos de los 30 animales en GRO y FIN, se cuantificó el desarrollo de su microbiota ruminal mediante la función *procrustes* (R Core Team [2018]). Dicha información se incluyó como efecto en un análisis de varianza de los datos de consumo de concentrado y crecimiento utilizando la herramienta JMP® (2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuenciación del ARN ribosómico y la posterior normalización de los datos permitió obtener una media de 22 643 secuencias por muestra y un total de 611 350 secuencias en las 27 muestras analizadas. Las secuencias obtenidas se clasificaron en 541 OTUs, con un umbral de similitud del 98%. El promedio de OTUs obtenidos por muestra fue de 111, con un valor mínimo de 56 y un valor máximo de 203. Respecto a nuestros datos, en un estudio con animales Holstein desde el período neonatal hasta los 2 años de edad, Jami *et al.*, (2013) aislaron un menor número de secuencias que fueron clasificadas en un mayor número de OTUs. El cálculo del índice de Shannon (1,40±0,40 en PRE, 1,21±0,52 en GRO y 1,91±0,51 en FIN) también resultó en valores muy bajos comparados con el mencionado estudio. En todos los períodos analizados, el porcentaje de secuencias comunes entre los animales de

los tres tratamientos fue muy alto (99,61% en PRE, 98,67% en GRO y 97,95% en FIN); no obstante, el ANOSIM detectó diferencias significativas en la estructura de la microbiota ruminal entre tratamientos durante las fases de crecimiento y acabado, pero no en la fase previa ($P=0,008$, $P=0,026$ y $P=0,800$, respectivamente). Por ello, se puede deducir que la ración que consumieron los animales modificó determinadas poblaciones microbianas que, aunque minoritarias, permitieron clasificar a los animales en función de su dieta (Figura 1).

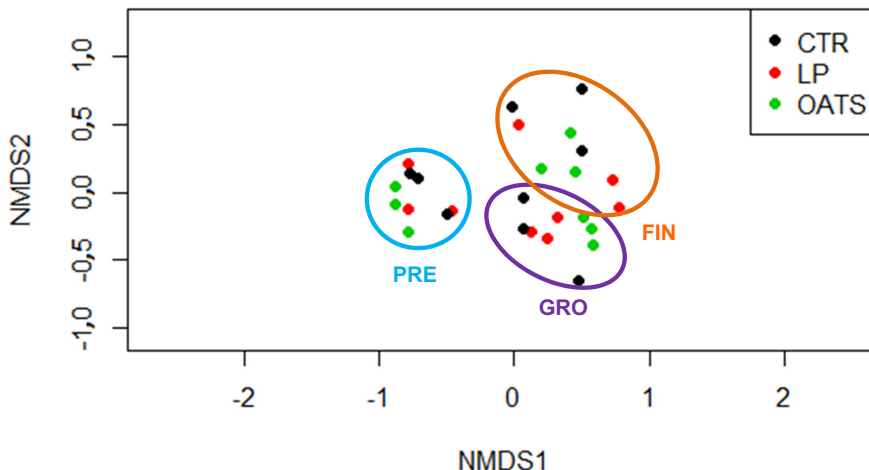


Figura 1. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) realizado en muestras de la microbiota ruminal, en los tres periodos: previo (PRE), crecimiento (GRO) y acabado (FIN).

Mediante el análisis LEfSe (Figura 2), se identificaron los taxones que sufrieron una variación más intensa en su abundancia desde antes del inicio del periodo experimental (PRE) hasta la fase de acabado (FIN). En dicho periodo, disminuyó la abundancia relativa del género *Bifidobacterium*, conocido por ser predominante en individuos jóvenes debido a que determinados oligosacáridos y glicoproteínas de la leche favorecen su proliferación (Pacheco *et al.*, 2015). En general, los géneros que más aumentaron su riqueza fueron: *Prevotella*, conocido por su versatilidad nutricional ya que puede utilizar como sustrato diversos azúcares simples, aminoácidos y también pequeños péptidos (Stevenson y Weimer, 2007), *Roseburia* y *Agathobacter*, ambos productores de butirato (Rosero *et al.*, 2016) y también *Sharpea*, productor de lactato (Morita *et al.*, 2008). Cabe destacar que, a diferencia del resto de grupos, en los terneros del grupo OATS aumentó la abundancia de poblaciones microbianas relacionadas con la degradación de la fibra (i.e. *Ruminococcus flavefaciens* y *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*).

La evolución de la microbiota ruminal en el periodo crecimiento-acabado no tuvo efectos ni sobre el consumo de concentrado ($P=0,426$ en GRO y $P=0,526$ en FIN) ni tampoco sobre la ganancia media diaria de los animales ($P=0,737$ en GRO y $P=0,931$ en FIN).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afgan, E. *et al.* 2018. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544, doi:10.1093/nar/gky379. • Dumont, B. *et al.* 2014. *Animal* 8, 1382–1393, doi:10.1017/S1751731114001281. • Jami, E., *et al.* 2013. *ISME J.* 7, 1069–1079, doi:10.1038/ismej.2013.2. • JMP®, Versión 14.0.0. 2018. SAS Institute Inc, EUA. • Morita, H. *et al.* 2008. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2682–2686, doi:10.1099/ijs.0.65543-0. • Pacheco, A. R. *et al.* 2015. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3, 419–445, doi:10.1146/annurev-animal-022114-111112. • R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. • Rosero, J. A. *et al.* 2016. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 768–773, doi:10.1099/ijs.0.000788. • Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 165–174, doi:10.1007/s00253-006-0802-y.

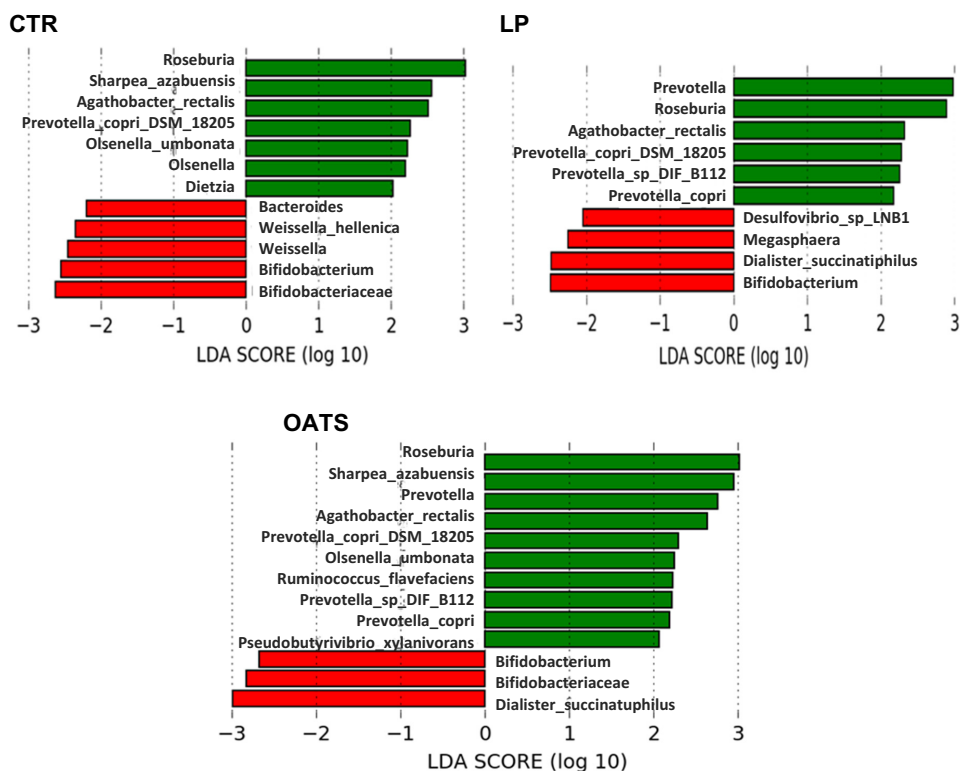


Figura 2. Taxones microbianos responsables de las diferencias en la composición de la microbiota entre el periodo previo (PRE, rojo) y el periodo de acabado (FIN, verde).

Agradecimientos: A la Cooperativa d'Ivars d'Urgell. Financiado por el proyecto europeo GENTORE y RTA-14-0.38-C02. Sandra Costa Roura disfruta de una beca FPU2016/03761.

EFFECTS OF PROTEIN RESTRICTION AND FORAGE TYPE ON RUMINAL MICROBIOTA IN INTENSIVELY REARED CALVES

The aim of this work was to study the impact of crude protein (CP) restriction and forage type on the evolution of ruminal microbiota in 30 intensively reared Holstein calves. Animals were assigned to three dietary treatments: low protein concentrate (10% CP) plus barley straw (LP) or control concentrate (12% CP) plus either barley straw (CTR) or oats silage (OATS). Three animals per treatment were sampled once before starting the experimental period (PRE) to determine the initial microbiota composition. All animals were sampled twice during the experimental period, corresponding to the growing phase (GRO) and the finishing phase (FIN). Rumen bacterial and archaeal composition was analysed by taxonomic profiling of 16S ribosomal RNA variable regions. Live weight and concentrate intake were automatically registered. Results showed biodiversity levels in calves' rumen were low. More than 97% of sequences were shared between groups, however, significant differences were found in microbiota composition in GRO ($P=0,008$) and in FIN ($P=0,026$). The highest increase in relative abundance was detected in *Prevotella*, *Roseburia*, *Agathobacter* and *Sharpea* genera. Differences in concentrate intake and daily gain could not be explained by ruminal microbiota evolution either in GRO ($P=0,426$ and $P=0,737$, respectively) or in FIN ($P=0,526$ and $P=0,931$, respectively).

Keywords: microbiota, calves, protein, forage.