

UTILIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS EN DIETAS DE OVEJAS LECHERAS: EFECTO SOBRE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS RUMINALES

Mateos, I.¹, Saro, C.², Carro, M.D.³ y Ranilla, M.J.^{1,2}

¹ Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León.

² Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas, 24346 León.

³ Departamento de Producción Agraria, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España; mjrang@unileon.es

INTRODUCCIÓN

España es el mayor productor de aceite de oliva del mundo. La extracción del aceite genera varios subproductos que pueden ser usados en alimentación animal. Uno de estos subproductos es el orujo de aceituna y está formado fundamentalmente por restos de pulpa y piel, ya que los huesos suelen eliminarse. Es un producto poco homogéneo, fibroso y con alto contenido en lignina (FEDNA, 2010) y cuyo valor nutritivo depende del aceite que contenga. Además, el orujo de aceituna contiene compuestos bioactivos con actividades antimicrobianas y antioxidantes (Uribe et al., 2014) que podrían ser beneficiosas para los animales, pero también podrían afectar a las poblaciones microbianas ruminales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la inclusión de orujo de aceituna en la ración como sustituto de parte de la fracción fibrosa de una dieta estándar para ovino de leche sobre las comunidades bacterianas ruminales desarrolladas en fermentadores Rusitec.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo se utilizaron dos dietas con una proporción 50:50 de forraje:concentrado. Una de ellas contenía un 10% de paja de cebada y un 20% de ensilado de maíz (PM) expresado en materia fresca y la otra dieta un 16,7% de orujo de aceituna (O) como sustituto de parte de la paja y el ensilado de maíz. Se utilizaron 4 fermentadores Rusitec en un diseño cruzado en dos periodos de incubación durante 14 días cada uno. Los días 13 y 14 de incubación se recogieron muestras para estudiar las comunidades bacterianas asociadas a las fases sólida y líquida de la digesta. De estas muestras se extrajo el ADN que tras la amplificación de las regiones v3-v4 del ARN ribosómico 16S de bacterias se secuenciaron en un secuenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) en el Centre for Genomic Regulation (Barcelona, España).

Tabla 1. Ingredientes (en % de materia fresca) y composición química de las dietas PM (paja de cebada y silo de maíz) y O (orujo de aceituna) (en % de materia seca).

	PM	O
Heno de alfalfa	20,0	20,0
Ensilado de maíz	20,0	6,7
Paja de cebada	10,0	6,7
Orujo de aceituna	0,0	16,7
Harina de soja	14,7	14,7
Maíz	13,3	13,3
Cebada	20,0	20,0
Jabón cálcico	0,9	0,9
Premezcla	1,0	1,0
Composición química		
MO	94,3	92,9
PB	15,0	15,3
FND	32,4	32,8
FAD	16,3	15,5
Lignina	2,0	3,8

Las secuencias obtenidas del secuenciador fueron filtradas usando FROGS (Escudié et al., 2018). La asignación taxonómica fue realizada utilizando el algoritmo BLAST enfrenteado a la base de datos SILVA SSU Ref NR 128 (Quast et al., 2012). El análisis estadístico de las secuencias y las figuras fueron realizados con los paquetes lme4 (Bates et al., 2015) y phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) en el programa R (R Core Team, 2018). La significación estadística se estableció en $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se pueden ver el número de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) observados y el índice de diversidad de Shannon para las dos dietas incubadas tanto en la fase sólida como en la líquida de los fermentadores. Estos valores no variaron significativamente ($P > 0,05$) en función de la dieta, aunque para el número de OTUs hubo una tendencia ($P = 0,084$) a ser menor en la dieta O. El índice de Shannon si varió en función de la fracción del fermentador de la que se recogió la muestra ($P < 0,05$). No hubo ($P > 0,05$) interacción de la dieta con la fracción.

Tabla 2. Índices de diversidad y número de OTUs observados para las dos dietas (sin orujo de aceituna, PM y con orujo, O) incubadas en los fermentadores Rusitec.

	Fase	Dieta		EEM ¹	Dieta	P =	
		PM	O			Fase	Dieta x Fase
OTUs observados	Sólido	752	689	31,2	0,084	0,371	0,436
	Líquido	853	696				
Índice de Shannon	Sólido	4,18	4,15	0,097	0,740	0,005	0,593
	Líquido	4,62	4,75				

¹ Error estándar de la media

En el análisis de coordenadas principales basado en la distancia de Bray-Curtis, representado en la figura 1, la coordenada principal 1 separa las muestras en función de la fase del fermentador de la que se recogió la muestra. En lo que se refiere al contenido líquido de los fermentadores la coordenada 2 separa las muestras en función de la dieta.

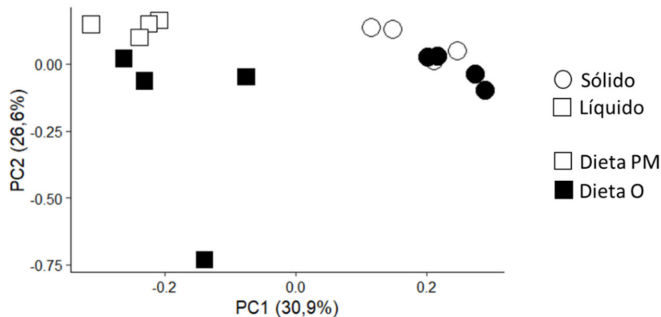


Figura 1. Análisis de coordenadas principales en el cual se representan las muestras de la dieta orujo de aceituna (O) y las muestras de la dieta paja de cebada y ensilado de maíz (PM) tanto de la fase sólida como de la fase líquida.

En cuanto a la composición taxonómica de la comunidad bacteriana de las muestras (tabla 3), el filo *Firmicutes* es el más abundante en las muestras de ambas dietas con un 50% de abundancia relativa. El segundo y tercer filo más abundantes son *Bacteroidetes* (23%) y *Actinobacteria* (20%). La abundancia de ninguno de ellos se vio afectada significativamente por la dieta incubada. De los 10 filios más abundantes, sólo, *Spirochaetes* fue significativamente más abundante cuando la dieta incubada fue la PM (3,62% vs. 1,73%; P ajustado=0,009)

Tabla 3. Abundancia relativa (%) de los 10 fillos más abundantes en los fermentadores que recibieron las dos dietas (sin orujo de aceituna, PM y con orujo, O).

Filo	Dieta		EEM ²	P ajustado ¹ =	
	PM	O		Dieta	Fase
<i>Actinobacteria</i>	21,77	18,41	2,256	0,474	0,001
<i>Bacteroidetes</i>	21,23	24,68	1,337	0,474	0,454
<i>Cyanobacteria</i>	0,18	0,30	0,073	0,730	0,514
<i>Euryarchaeota</i>	0,64	0,40	0,083	0,474	0,514
<i>Fibrobacteres</i>	0,26	0,26	0,049	0,968	0,118
<i>Firmicutes</i>	49,89	51,08	1,406	0,831	0,014
<i>Patescibacteria</i>	0,49	0,34	0,098	0,730	0,037
<i>Proteobacteria</i>	0,86	1,78	0,370	0,207	0,001
<i>Spirochaetes</i>	3,62	1,73	0,342	0,009	0,037
<i>Synergistetes</i>	0,44	0,32	0,126	0,831	0,037

¹ Valor de P ajustado con el método false discovery rate

² Error estándar de la media

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que al incluir orujo de aceituna en una dieta de ganado ovino lechero la diversidad bacteriana y la abundancia relativa de los fillos mayoritarios no variaron con respecto a la dieta sin orujo. La diversidad bacteriana y la abundancia relativa de los fillos *Firmicutes* y *Actinobacteria* variaron en función de la fase de la digesta analizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bates, D. 2015, J. Stat. Softw. 67, 1–48.
- Escudíe, F. 2018, Bioinformatics 34, 1287–1294.
- FEDNA 2010, Orujo de aceituna | FEDNA, Retrieved on 28 January 2019, from http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/orujo-de-aceituna.
- McMurdie, P.J. 2013, PLoS One 8, e61217.
- Quast, C. 2012, Nucleic Acids Res. 41, D590–D596.
- R Core Team 2018, R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Uribe, E. 2014, Food chem. 147, 170–6.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos AGL2016-75322-C2-1-R y AGL2016-75322-C2-2-R financiados por el MINECO.

USING BY-PRODUCTS IN DAIRY SHEEP DIETS: EFFECTS ON RUMINAL BACTERIAL COMMUNITIES

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effects of partially replacing straw and corn silage by olive cake in a dairy sheep diet on bacterial populations in Rusitec fermenters. Two diets were incubated in 4 Rusitec fermenters in a cross-over design with two 14-day incubation periods, Fermenters were given daily 30 g of diet (50:50 forage:concentrate), half of them received the diet with no olive cake (PM) and the other half received 16,7% of olive cake (O). Samples of ruminal content were collected from the fermenters and the DNA was extracted and sequenced in an Illumina MiSeq sequencer. The OTUs observed and Shannon diversity index were not affected ($P > 0.05$) by the diet incubated. Samples were segregated by PC1 corresponding to the fermenter content in the principal coordinate analysis. There was not a clear division conforming to the diet. In the top ten phyla, only, the *Spirochaetes* relative abundance was higher in PM diet than in O diet (3.62% vs. 1.73%; respectively, P adjusted=0.009). The inclusion of olive cake in the dairy sheep diet did not affect the diversity and the most abundant phyla when these diets were fermented in a Rusitec system.

Keywords: olive cake, sheep, MiSeq sequencing, Rusitec