

EFFECTO DE LA SUBALIMENTACION NITROGENADA Y EL TIPO DE ENERGIA SOBRE LOS NIVELES DE CIERTOS MICROORGANISMOS RUMINALES EN VACAS LECHERAS

Belanche¹, A., Moorby¹, J.M., Doreau², M. y Newbold¹ C.J.

¹IBERS, Aberystwyth University, SY23 3EB, UK.

²INRA, Herbivore Research Unit, 63122 Saint-Genès Champanelle, France. aib@aber.ac.uk

INTRODUCCIÓN

Las vacas lecheras presentan una eficiencia de utilización del N dietético (EUN) en torno al 25%, siendo esta muy inferior a la observada en monogástricos. Dicha ineficiencia supone importantes pérdidas de N a través de heces y orina que, unido a las altas densidades de animales, puede ocasionar problemas medioambientales como la eutrofización del suelo y la contaminación de los acuíferos. Por lo tanto, la optimización de la EUN, manteniendo similares niveles productivos, representa un reto para el sector lácteo.

Nitrógeno y energía son los dos requisitos indispensables para que los microorganismos ruminales realicen una correcta fermentación y síntesis microbiana, por lo tanto, la adecuada elección del tipo de carbohidrato y del nivel de proteína en la dieta constituyen dos aspectos clave. La disminución del aporte de proteína degradable origina un incremento de la EUN en el rumen (Bach et al., 2005), sin embargo, dicha estrategia puede limitar la síntesis microbiana por unidad de energía degradable (Hoover and Stokes, 1991). De manera similar, una moderada suplementación con carbohidratos fácilmente fermentables suele mejorar la función ruminal, pero un exceso de los mismos puede ocasionar alteraciones de la microbiota ruminal y procesos acidóticos. Por ello, el conocimiento de los microorganismos ruminales, sus inter-relaciones y sus necesidades nutricionales, puede suponer una importante ayuda a la hora de evaluar nuevas estrategias nutricionales.

El objetivo del presente ensayo fue estudiar el efecto que ocasiona una sustancial disminución del aporte de proteína dietética sobre las poblaciones microbianas que habitan el rumen de vacas lecheras cuando son alimentadas con dos tipos de carbohidratos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro vacas Holstein a mitad de lactación (662±62 kg de peso vivo y 30.3±1.2 kg leche/d) provistas con cánula ruminal fueron utilizadas siguiendo un modelo de cuadrado latino 4x4. Los 4 dietas experimentales fueron iso-energéticas y elaboradas a base de heno/silo de hierba y concentrado (70:30 en MS) consistieron en dos niveles de proteína (Alto; 110% vs. Bajo; 80% de los requerimientos en proteína degradable) y dos tipos de carbohidratos (ratio FND/almidón 2.85 vs. 1.31). Tras cuatro semanas de adaptación el contenido ruminal (300 g MF) fue muestreado a las 0, 2.5 y 5 horas post-ingestión durante tres días alternos. Dicho contenido fue inmediatamente congelado, liofilizado y tras ser molido se procedió a la extracción del ADN utilizando un kit comercial (QIAamp DNA mini kit, Qiagen). El último día de cada periodo se procedió al aislamiento de bacterias (Pérez et al., 1998) y protozoos ruminales (Sylvester et al., 2004) que fueron utilizados como estándares en la PCR cuantitativa. La abundancia relativa de las diferentes especies bacterianas se estableció respecto a bacterias totales utilizando el método propuesto por Stevenson y Weimer, (2007) y haciendo correcciones en función de la eficiencia de amplificación. El análisis estadístico consistió en un modelo de medidas repetidas (REML, GenStat, 10^a edición) donde el nivel de proteína, tipo de carbohidrato y momento de muestreo fueron los efectos fijos y el animal fue considerado como aleatorio. Ninguna interacción sustancial fue encontrada entre los factores estudiados, por lo que únicamente los factores principales son presentados en las tablas (ns, no significativo; T, P<0.1; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El momento de muestreo no modificó la concentración ruminal de los microorganismos con un crecimiento rápido (bacterias proteolíticas y amilolíticas), sin embargo ocasionó importantes diferencias en aquellos microorganismos con un elevado tiempo de generación. En este sentido; protozoos (P<0,001), hongos (P<0,01), metanógenos (P<0,001) y bacterias celulolíticas (*R. flavefaciens* P=0,09, *F. succinogenes* P<0,001 y *B. fibrisolvens* P<0,05) mostraron su máximas concentraciones ruminales antes de la ingesta de alimento, transcurridas 5h todavía no se habían recuperado los niveles iniciales de los mismas.

Tabla 1. Efecto del momento de muestreo sobre la concentración ruminal de ciertos microorganismos.

	Tiempo post-ingesta			SED n=16	Significación Tiempo
	0h	2.5h	5h		
Bacterias (mg ADN/g MS)	3,21 ^a	2,37 ^b	2,67 ^b	0,154	***
Protozoos (mg ADN/g MS)	0,86 ^a	0,39 ^b	0,36 ^b	0,095	***
Abundancia relativa (%)					
<i>Ruminococcus albus</i>	0,09	0,08	0,07	0,011	ns
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,38 ^a	0,35 ^{ab}	0,30 ^b	0,036	T
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	1,43 ^a	1,03 ^b	0,89 ^b	0,102	***
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	1,40 ^a	1,12 ^b	1,33 ^{ab}	0,111	*
<i>Prevotella ruminicola</i>	12,2	11,3	11,0	1,643	ns
<i>Prevotella bryantii</i>	0,13	0,12	0,13	0,035	ns
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,03	0,03	0,03	0,005	ns
<i>Streptococcus bovis</i>	0,07	0,10	0,10	0,036	ns
<i>Megasphaera elsdenii</i>	0,01	0,01	0,02	0,013	ns
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	0,02	0,01	0,01	0,005	ns
Metanógenos	0,26 ^a	0,20 ^b	0,18 ^b	0,016	***
Hongos anaerobios	0,93 ^a	0,75 ^b	0,63 ^b	0,088	**

La reducción del contenido dietético en proteína digestible en el intestino (de 96 a 70 PDIN/kg MS) originó una ligera reducción de la producción de leche (-9.2%), sin embargo ello supuso un importante descenso en las emisiones de N urinario (-52%), con la consiguiente mejora en la EUN (del 25 al 29%, Fanchone et al., 2011a). *Prevotella* es de los pocos microorganismos ruminales capaces de degradar oligopéptidos en aminoácidos (Wallace et al., 2001), ello explica la disminución de la abundancia de *P. bryantii* (P<0,05) y el subsecuente decremento de la concentración ruminal de amonio (de 13.9 a 7.3 mg/dl, Fanchone et al., 2011b) en las vacas que recibieron una sub-alimentación proteica. Dicha disminución de amonio fue acompañada con una reducción, tanto de la concentración de bacterias totales (P<0,001, Tabla1), como de la proporción de bacterias consumidoras de amonio (*R. albus*, *F. succinogenes*, *B. fibrisolvens*). La disminución de la proporción de bacterias celulolíticas, unido al de hongos anaerobios (P<0,001) y protozoos ruminales (P=0.17) podría explicar también el decremento de la digestibilidad de la MO observada (3 unidades porcentuales) en situaciones de sub-alimentación nitrogenada. Además estos tres grupos microbianos (bacterias celulolíticas, hongos y protozoos) son los mayores productores de H₂ a nivel ruminal, por lo que su disminución también fue acompañada por la de metanógenos (P<0,001), que utilizan dicho H₂ como sustrato.

Sorprendentemente la sustitución de FND por almidón en la dieta no ocasionó significativas mejoras de la digestibilidad ruminal ni total (Fanchone et al., 2011b), aunque originó un incremento de las bacterias amilolíticas (*S. ruminantium* P<0,05 y *M. elsdenii* P=0,05), así como de *R. flavefaciens* (P<0,001). Contrariamente, las dietas ricas en fibra propiciaron un incremento en las concentraciones de protozoos (P<0,05), hongos anaerobios (P<0,001), *R. albus* (P<0,001) y *S. bovis* (P<0,05) lo que pone de manifiesto la magnífica capacidad de dichos microorganismos para hacer un eficiente uso de alimentos fibrosos. Nuevamente el incremento de protozoos, hongos y bacterias celulolíticas fue acompañado con un aumento de los metanógenos. La capacidad predatoria de los protozoos ruminales, tradicionalmente se ha asociado a un ineficiente uso del N dietético a nivel ruminal. Dicho fenómeno quedó patente al utilizar dietas fibrosas, pues la mayor concentración de ADN protozoario fue acompañada con un incremento en los niveles ruminales de amonio (de 7.5 a 13.8 mg/dl), un menor flujo duodenal de N-no amoniacal (por N ingerido) y una menor contenido proteico en la leche (P<0,05, Fanchone et al., 2011b).

A pesar de todos estos cambios en el ecosistema ruminal, los tratamientos experimentales no modificaron ni el flujo duodenal de N microbiano ni la eficiencia de síntesis microbiana (Fanchone et al., 2011b), lo que pone de manifiesto la gran capacidad de dicho ecosistema

para adaptarse a situaciones de sub-alimentación proteica. Los mejores valores en la EUN (29.9%) fueron obtenidos cuando las vacas fueron sub-alimentadas en proteína y suplementadas con almidón, coincidiendo con los menores niveles ruminales de amonio, protozoos, hongos anaerobios, metanógenos y ciertas bacterias celulolíticas.

Tabla 2. Efecto del aporte de proteína degradable y el tipo de carbohidrato sobre la concentración ruminal de ciertos microorganismos.

	Proteína		Energía		SED n=24	Significación	
	Alta	Baja	Fibra	Almidón		Proteína	Energía
Bacterias (mg ADN/g MS)	2,94	2,56	2,76	2,74	0,126	**	ns
Protozoos (mg ADN/g MS)	0,59	0,48	0,62	0,45	0,077	ns	*
Abundancia (%)							
<i>R. albus</i>	0,10	0,06	0,09	0,07	0,009	***	T
<i>R. flavefaciens</i>	0,36	0,32	0,24	0,44	0,029	ns	***
<i>F. succinogenes</i>	1,25	0,99	1,10	1,14	0,083	***	ns
<i>B. fibrisolvens</i>	1,49	1,08	1,25	1,32	0,091	***	ns
<i>P. ruminicola</i>	11,5	11,6	11,0	12,1	1,34	ns	ns
<i>P. bryantii</i>	0,16	0,10	0,14	0,11	0,029	*	ns
<i>S. ruminantium</i>	0,03	0,03	0,02	0,03	0,004	ns	*
<i>S. bovis</i>	0,08	0,10	0,12	0,06	0,030	ns	*
<i>M. elsdenii</i>	0,00	0,02	0,00	0,02	0,010	ns	T
<i>A. lipolytica</i>	0,02	0,01	0,01	0,02	0,004	ns	ns
Metanógenos	0,89	0,65	0,97	0,57	0,071	**	***
Hongos anaerobios	0,23	0,19	0,24	0,18	0,013	***	***

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Bach, A., Calsamiglia, S. & Stern, M. D. 2005. J. Dairy Sci. 88 Sup. 1, E9-21 •Fanchone, A., Doreau, M. & Nozière, P. 2011a Procc. BSAS •Fanchone, A., Nozière, P., Portelli, J., Chauveau-Duriot, B., Largeau, V. & Doreau, M. 2011b Procc. BSAS •Hoover, W.H. & Stokes, S.R. 1991 J. Dairy Sci. 74:3630-3644 •Pérez, J.F., Balcells, J., Fondevila, M. & Guada, J.A. 1998 Aus. J. Agri. Res. 49:907-914 •Stevenson, D.M. & Weimer, P.J. 2007. Appl. Microbiol. Biotech. 75:165-174 •Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z.T., Morrison, M. & Firkins, J.L. 2004 J. Nutr. 134:3378-3384 •Wallace, R.J., Newbold, C.J., Bequette, B.J., MacRae, J.C. & Lobley, G.E. 2001 Asian-Australasian J. Anim. Sci. 14:885-893

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la UE, FP7, KBB-2007-1.

EFFECT OF N UNDERFEEDING AND TYPE OF ENERGY ON THE NUMBERS OF CERTAIN RUMEN MICROORGANISM IN DAIRY COWS:

Four rumen and duodenally-cannulated dairy cows were fed diets with two levels of degradable protein (110 vs. 80% of requirements) and two types of carbohydrates (NDF/starch of 2.8 and 1.3) according to a 4x4 Latin square. Rumen contents were sampled at 0, 2.5 and 5h after feeding and lyophilized for DNA extraction. Ruminal abundance of bacteria, protozoa, anaerobic fungi, methanogens and ten bacterial species were determined by quantitative PCR. Ruminal levels of microorganisms with a long generation time decreased significantly after feeding. Low protein diets decreased the rumen concentration of total bacteria (-13%) and the relative abundance of *P. bryantii* (-37%), methanogens (-21%), anaerobic fungi (-27%) and cellulolytic bacteria such as *R. albus* (-39%), *F. succinogenes* (-21%) and *B. fibrisolvens* (-28%). High starch diets led to a decrease of ruminal amount of protozoa (-28%), fungi (-42%), methanogens (-25%), *R. albus* (-20%) and *S. bovis* (-51%) but promoted an increase of *R. flavefaciens* (+78%), *S. ruminantium* (+43%) and *M. elsdenii* ($P = 0.05$) with respect to those levels observed in high fibrous diets. A negative relationship was observed between the efficiency of N utilization by the cow and the ruminal abundance of cellulolytic bacteria, fungi, protozoa and methanogens.

Keywords: bacteria, protozoa, quantitative PCR, rumen