

## EVOLUCIÓN DE LA POBLACION MICROBIANA RUMINAL DE TERNEROS PASTEROS DURANTE EL PERÍODO DE TRANSICIÓN AL CEBEO INTENSIVO

Yuste, S.<sup>1</sup>, Amanzougarene, Z.<sup>1</sup>, de la Fuente, G.<sup>2</sup>, Fondevila, M.<sup>1</sup> y de Vega, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal- Universidad de Zaragoza. Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. <sup>2</sup>Dept. Ciència Animal, Universidad de Lleida; avega@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

La población microbiana ruminal constituye un complejo ecosistema con unas funciones metabólicas de las que depende la nutrición del rumiante. La comunidad bacteriana puede verse influida por factores como el nivel de ingestión, el tipo de alimentación o el estado fisiológico del animal (Dehority y Orpin, 1988). El cambio de una dieta forrajera a otra alta en concentrado supone un aumento de la llegada de carbohidratos fermentables al rumen, lo que resulta en una importante modificación del ambiente ruminal y, como consecuencia, de la estructura de la comunidad bacteriana (Fernando *et al.*, 2010, Petri *et al.*, 2013). Se ha sugerido que una adaptación gradual proporciona el tiempo suficiente para que la flora bacteriana se adapte al nuevo ambiente, y así se evitan repercusiones fisiológicas como la acidosis ruminal. Sin embargo, este último aspecto no está claro, por lo que el objetivo fue estudiar la estructura de la comunidad bacteriana durante la transición, brusca o gradual, a una dieta alta en concentrado de terneros pasteros recién destetados.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 39 terneros pasteros cruce con Limousin recién destetados ( $258 \pm 22,7$  kg) distribuidos en tres grupos (n=13) de acuerdo con las dietas recibidas durante el período de transición (14 d): dieta control (ingredientes principales en gr/kg MF: cebada, 590; maíz, 150; soja, 172; gluten feed, 57; C), y dos dietas en las que se reemplazó parcialmente la cebada por maíz, y se incluyó PR al 10% (PR10; cebada, 200; maíz, 466; PR, 100) o al 22% (PR22; cebada, 150, maíz, 333; PR, 220) con el fin de variar la fuente del almidón y la cantidad de fibra neutro detergente (FND). Cuatro animales de cada grupo fueron canulados en rumen. Desde el d0 al d10 cada grupo recibió su dieta; del d11 al d14 los grupos PR10 y PR22 recibieron una mezcla (50:50) de su dieta y la dieta C; y desde el d15 hasta el final del experimento recibieron la dieta C. El pienso se ofreció con paja *ad libitum* representando un 0,88 y 0,12 de la ración, respectivamente. Los días 0, 10, 14, 21 y 30 se tomaron muestras de líquido ruminal antes de la oferta de alimento para caracterizar la población bacteriana. El ADN genómico se extrajo mediante un kit comercial (QIAamp® DNA Mini Kit), y la región V1-V3 del ARN16S se secuenció mediante la tecnología Ion Torrent. Las secuencias generadas fueron procesadas siguiendo la metodología descrita por de la Fuente *et al.* (2014). El análisis de las lecturas obtenidas se realizó con el software Ion Reporter™ (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operativas asignadas al 97% de similitud. La información taxonómica se obtuvo por comparación de las secuencias con la base de datos de GenBank (NCBI). La abundancia relativa a nivel taxonómico de filo y género se calculó tras la normalización de los resultados obtenidos. El análisis de datos multivariante (dendrograma, ADONIS) se basó en la aplicación del algoritmo UPGMA sobre la matriz de distancias previamente obtenidas con el método Bray-Curtis, utilizando el paquete “vegan” del programa estadístico R (v3.4.3). Los índices de biodiversidad calculados (Shannon y riqueza), así como la abundancia relativa a nivel de filos y género se analizaron estadísticamente con un modelo de medias repetidas utilizando el procedimiento PROC MIXED (SAS v.9.4), tomando el día como medida repetida. Valores de  $P < 0,05$  y  $P < 0,10$  se consideraron significativos o con tendencia a la significación, respectivamente.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura bacteriana no se vio afectada por la dieta (C, PR10 o PR22;  $P=0,47$ ), aunque sí por la transición de forraje a concentrado ( $P=0,001$ ). La población bacteriana de los terneros no se agrupó por dieta, sino por día de muestreo (Figura 1).

Un 89% de las bacterias pertenecieron a los fila *Firmicutes* (43%) y *Bacteroidetes* (46%), seguido de *Actinobacteria* (5,90%), *Proteobacteria* (3,47%), *Fibrobacteres* (0,54%) y *Tenericutes* (0,50%, Tabla 1). *Bacteroidetes* (B) aumentó a lo largo de la transición ( $P=0,02$ ), en línea con lo observado por otros autores (Jami *et al.*, 2013). Al contrario, *Firmicutes* (F) descendió con la inclusión del concentrado ( $P=0,006$ ) hasta el final de la transición. La relación F/B osciló a lo largo de los días con valores de 1,63 en el d0 a 0,89 en el d30. Como resultado del cambio de dieta, en el día 30 se observó una composición bacteriana significativamente diferente respecto al día 0. Esta modificación de la comunidad bacteriana es habitual y ha sido reportada por varios autores tras la inclusión de concentrado en animales previamente alimentados con heno (Fernando *et al.*, 2010; Petri *et al.*, 2013), ya que supone un aumento de las bacterias más ácido tolerantes, un descenso de las bacterias celulolíticas, y un aumento de aquéllas que fermentan almidón.

En todo el estudio se identificaron 96 géneros, de los cuales 33 estuvieron presentes en todos los animales. En general, tras la inclusión del concentrado en el período de transición hubo un aumento de *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter*, *Succinivibrio* y *Selenomonas*, y una disminución de los grupos *Butyrivibrio* y *Fibrobacter* (Tabla 2). Este último, tendió a ser superior en los animales que fueron alimentados con PR ( $P=0,07$ ), probablemente debido al mayor contenido en fibra de la dieta. *Eubacterium* se mantuvo constante y *Lactobacillus* tendió a incrementar ( $P=0,09$ ) a lo largo del tiempo. Aunque no fue significativa la interacción dieta x día, el grupo C presentó numéricamente una mayor abundancia de *Ruminococcus* en el d10, aunque es un género mayoritariamente fibrolítico; también se observó una mayor abundancia de *Ruminobacter* y *Succinivibrio* en el d14. La diversidad bacteriana se vio reducida especialmente durante los primeros 10 días, con una posterior recuperación, sugiriendo una adaptación de la microbiota a la nueva dieta (Tabla 2); no obstante, la diversidad a nivel de género descendió paulatinamente hasta el día 30 ( $P<0,001$ ; Figura 2).

Independientemente de la transición gradual o abrupta y de la dieta utilizada en el período de transición, tanto la estructura como la composición de la comunidad bacteriana se vieron afectadas por el cambio de leche/forraje a una dieta alta en concentrado. Los resultados indican que, a pesar de la disminución de la riqueza microbiana, hubo una adaptación a las condiciones ambientales. Las distintas dietas usadas en el período de transición no modificaron la estructura bacteriana a pesar de su distinto contenido en almidón y FND, lo que pudo ser debido a la gran variabilidad individual en la estructura microbiana y también a la falta de efecto de las diferentes dietas sobre las variables de fermentación ruminal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Dehority, B. A. & Orpin C. G. 1988. En: The Rumen Microbial Ecosystem. (P. N. Hobson, ed.) pp151–183. •de la Fuente, G. *et al.*, 2014. PLoS One. 22:e101435. •Fernando, S. C. *et al.*, 2010. Appl Environ Microbiol.76: 7482-7490. •Jami *et al.*, 2013. ISME J. 7:1069-1079. •Petri, R. *et al.*, 2013. PLoS One. 12: e83424

**Tabla 1.** Abundancia relativa (% del total de secuencias) de los filos identificados a lo largo del período de transición de terneros pasteros de forraje al cebo intensivo.

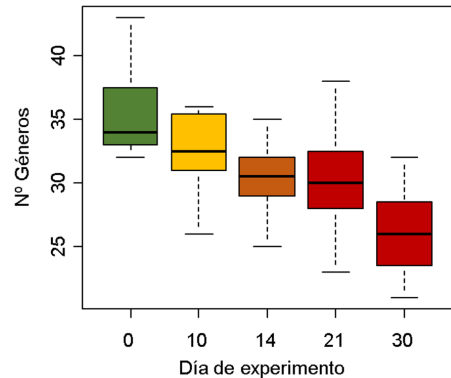
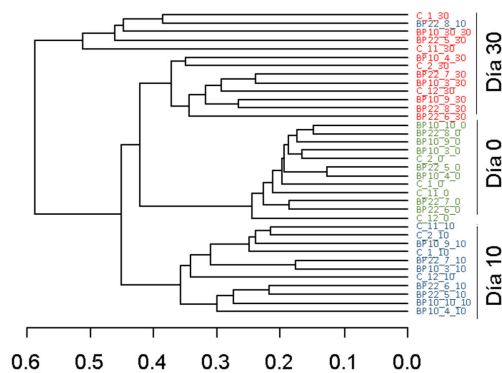
Filo	Día 0	Día 10	Día 14	Día 21	Día 30	SEM	P-Día
<i>Firmicutes</i>	54,67 <sup>a</sup>	41,82 <sup>bc</sup>	33,10 <sup>c</sup>	46,05 <sup>ab</sup>	39,15 <sup>bc</sup>	3,114	0,006
<i>Bacteroidetes</i>	35,28 <sup>b</sup>	48,88 <sup>a</sup>	53,52 <sup>a</sup>	43,08 <sup>ab</sup>	48,06 <sup>a</sup>	3,876	0,020
<i>Actinobacteria</i>	2,65	6,64	5,00	5,35	9,87	3,101	0,557
<i>Proteobacteria</i>	2,45	1,83	7,21	4,21	1,66	1,688	0,151
<i>Fibrobacteres</i>	1,08 <sup>a</sup>	0,40 <sup>bc</sup>	0,79 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>c</sup>	0,29 <sup>bc</sup>	0,204	0,024
<i>Tenericutes</i>	1,27 <sup>a</sup>	0,16 <sup>c</sup>	0,12 <sup>c</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,40 <sup>bc</sup>	0,107	0,001
Otros	2,61 <sup>a</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,26 <sup>b</sup>	0,56 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,213	0,001

<sup>a,b,c</sup> indican diferencias significativas entre días ( $P<0,05$ ).

**Tabla 2.** Abundancia relativa (% del total de secuencias) de los géneros más abundantes a lo largo del período de transición de terneros pasteros de forraje al cebo intensivo.

Género x10 <sup>-3</sup> (%)	Día 0	Día 10	Día 14	Día 21	Día 35	SEM	P-Día
<i>Prevotella</i>	9,3 <sup>b</sup>	163,7 <sup>a</sup>	39,7 <sup>b</sup>	7,6 <sup>b</sup>	17,4 <sup>b</sup>	20,49	0,001
<i>Butyrivibrio</i>	23,4 <sup>a</sup>	4,5 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b</sup>	1,5 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>	1,50	0,001
<i>Ruminococcus</i>	13,3 <sup>b</sup>	45,4 <sup>a</sup>	16,4 <sup>b</sup>	24,0 <sup>b</sup>	3,8 <sup>b</sup>	7,39	0,003
<i>Eubacterium</i>	5,2	3,4	5,7	1,7	1,8	2,07	0,514
<i>Ruminobacter</i>	0,1	4,1	38,1	1,7	0,2	15,19	0,337
<i>Fibrobacter</i>	8,4 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>	5,4 <sup>ab</sup>	1,4 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>	1,72	0,047
<i>Succinivibrio</i>	0,4	1,3	11,8	6,2	0,2	4,02	0,182
<i>Selenomonas</i>	0,7 <sup>c</sup>	12,0 <sup>a</sup>	7,8 <sup>ab</sup>	6,7 <sup>b</sup>	0,3 <sup>c</sup>	1,83	0,001
<i>Lactobacillus</i>	0,04	5,9	1,5	7,2	8,0	2,77	0,088
Índice de Shannon	2,51 <sup>a</sup>	1,85 <sup>c</sup>	2,02 <sup>cb</sup>	2,20 <sup>b</sup>	2,17 <sup>b</sup>	0,109	0,001

<sup>a,b,c</sup> indican diferencias significativas entre días (P<0,05).



**Figura 1.** Dendrograma construido con la matriz de distancias de disimilitud de Bray-Curtis con las muestras de los días 0, 10 y 30 del período de transición al cebo.

**Figura 2.** Riqueza bacteriana a lo largo de del período de transición de terneros de cebo.

### TEMPORAL DYNAMICS IN THE BACTERIAL COMMUNITY OF NEWLY WEANED BEEF CALVES DURING THE TRANSITION PERIOD TO A HIGH-CONCENTRATE DIET

**ABSTRACT:** Bacterial population dynamics during the transition period of beef calves to a high-concentrate diet was studied. Three diets were used: a barley-based diet (C); and two adaptation diets in which barley was partly replaced with maize and 10% BP (BP10) or 22% of beet pulp (BP22). From d0 to d10 all animals consumed their diets; from d11-14d, BP10 and BP22 groups received a 50:50 mixture with diet C, and from d15 to the end, all animals received C diet. Irrespectively of the diet, there was a significant decrease of *Firmicutes* and *Fibrobacteres*, and an increase of *Bacteroidetes* at d14. In addition, by the end of transition the genera *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter*, *Succinivibrio* and *Selenomonas* increased, and *Butyrivibrio* and *Fibrobacter* decreased. Dietary shift from a milk/grass regime to a fattening concentrate changed the structure of the bacterial community and decreased richness and diversity, although the calves harbored eventually a stable population.

**Keywords:** beef cattle, transition, bacteria, microbiome.