

IMPACTO DE LA ADICIÓN TEMPRANA DE FIBRA DE ALTA CALIDAD EN EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA RUMINAL DE TERNEROS HOLSTEIN

Sofía Fernández-Ciganda^{1*}, Cecilia Cajarville¹, Nicolás Amaro², Valeria Campbell²,

Germán Antúnez-Tort¹, Martín Fraga¹

1 Plataforma de Investigación en Salud Animal – INIA, Estación Experimental La Estanzuela.

2 Depto. de Producción Animal y Salud de sistemas productivos (IPAV), Facultad de Veterinaria – UdelaR.

3 Depto. de Ciencias Veterinarias y Agrarias, CENUR.LN – Facultad de Veterinaria – UdelaR.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del consumo de fibra de alta calidad sobre el desarrollo de la microbiota ruminal, en comparación con la administración de concentrado comercial de iniciación, ambos como suplemento del lácteo, bajo un programa de cría acelerada. Se realizó un ensayo *in vivo* con 20 terneros Holstein machos, con adecuada transferencia pasiva de inmunidad, que se dividieron aleatoriamente en dos grupos (n = 10). En un grupo, la dieta consistió en sustituto lácteo más concentrado comercial de iniciación y el otro grupo recibió el sustituto lácteo más fibra de alta calidad. Durante la semana 8 los terneros se deslechaban progresivamente. Luego del desleche y hasta la semana 11 los terneros de ambos grupos tuvieron libre acceso al mismo heno de alfalfa y concentrado comercial recibido en la etapa lactante. Mediante sonda oro esofágica se tomaron muestras de contenido ruminal en la semana 5 y 11 y se secuenció la región V4 del gen bacteriano ribosomal 16S mediante Illumina MiSeqx250. La microbiota ruminal fue significativamente diferente entre las dos dietas a la semana 5, tanto en composición como en diversidad, pero a la semana 11, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the effect of high-quality fiber intake on the development of the ruminal microbiota, in comparison with the administration of commercial

starter concentrate, both as a dairy supplement, under an accelerated rearing program. An *in vivo* assay was performed with 20 male Holstein calves, with adequate passive transfer of immunity, which were randomly divided into two groups (n = 10). In one group, the diet consisted of milk replacer plus commercial starter concentrate and the other group received the milk replacer plus high-quality fiber. During week 8 the calves were progressively weaned. After weaning and until week 11, the calves of both groups had free access to the same alfalfa hay and commercial concentrate received in the lactating stage. Samples of ruminal contents were taken at weeks 5 and 11 by esophageal probe and the V4 region of the 16S ribosomal bacterial gene was sequenced using Illumina MiSeqx250. The ruminal microbiota was significantly different between the two diets at week 5, both in composition and diversity, but at week 11, no significant differences were found between treatments.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del rumen y particularmente de la microbiota ruminal es de suma importancia para los terneros previo al desleche (Khan et al., 2016). El establecimiento de la microbiota ruminal posibilita que se produzcan procesos de fermentación de los alimentos sólidos y la producción de metabolitos que constituyen el principales estímulo para el desarrollo del epitelio ruminal (Khan et al., 2016). Según la recomendación más extendida, la alimentación pre-desleche de los terneros debería limitarse al consumo de alimentos lácteos y concentrado

de inicio (NASEM, 2021). A partir de la implementación de los sistemas de cría acelerada, en los que se suministra mayores volúmenes de leche y en dónde la proporción de nutrientes provenientes de alimento sólido es menor en comparación con los sistemas de cría tradicionales, se ha recobrado interés por el uso de forrajes (Khan et al., 2016). En los últimos años se ha reconocido la importancia de incluir forraje en la dieta de los terneros para mantener la integridad del epitelio ruminal, promover el comportamiento de rumia y reducir los comportamientos orales no ingestivos (Suárez-Mena et al., 2016). Sin embargo, la información científica sobre los posibles efectos del suministro de forraje de alta calidad como único alimento en la dieta de terneros lecheros durante la etapa lactante es limitada. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto del consumo temprano de fibra de alta calidad sobre el desarrollo de la microbiota ruminal, en comparación con la administración de concentrado comercial de iniciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

El ensayo se realizó en el Campo Experimental N°2 del Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (ruta 1 Km 42, Libertad, San José). Se utilizaron 20 terneros Holstein, machos ($40 \pm 2,0$ kg de peso y 4 ± 2 días), con adecuada transferencia pasiva de inmunidad ($> 8,4\%$ Brix; Deelen et al., 2014), los cuales fueron divididos al azar en dos grupos. Ambos grupos recibieron 8 litros diarios de sustituto lácteo (diluido al 12,5% de MS, 21,5% PB y 20,1% EE) hasta la semana 7 de vida y durante la semana 8 fueron deslechados progresivamente. La diferencia entre las dietas radicó en el alimento sólido ofrecido a los animales desde la primera semana hasta las 8 semanas de vida. Uno de los grupos recibió heno de alfalfa (90,5% de MS, 16,0% PB y 40,4% FND) y el otro grupo recibió concentrado de inicio (90,0% de MS, 18,0% PB y 17,9% FND). Durante la semana 9, 10 y 11 ambos grupos tuvieron acceso *ad libitum* tanto

al mismo heno de alfalfa como al concentrado comercial recibido en la etapa lactante, por lo tanto, la dieta de todos los animales fue heno de alfalfa y concentrado.

Muestras y secuenciación

A las 5 y 11 semanas se recolectó contenido ruminal mediante sonda oro esofágica y se guardaron las muestras a -80°C para su posterior procesamiento. Dicho procesamiento consistió en la extracción de ADN total mediante el kit comercial Zymo Fecal/Soil Minikit y la secuenciación del gen ribosomal 16S mediante la tecnología Illumina MiSeq 2x250.

Procesamiento de datos

Los datos generados se procesaron con el paquete R *dada2* (Callahan et al., 2016a) siguiendo el pipeline presentado en el repositorio de GitHub (<https://benjjinn.g.gubub.io/dada2>) y por Callahan et al. (2016b). Los recuentos se normalizaron calculando las abundancias relativas de cada ASV (*Amplicon Sequence Variant*) en cada muestra y se calcularon matrices de distancia utilizando los métodos de Jaccard (presencia/ausencia), Bray-Curtis (abundancia), UniFrac (relación filogenética) y Weighted-UniFrac (relación filogenética ponderada por abundancia). Los parámetros de diversidad alfa se calcularon usando la función *estimate_richness*, implementada en *phyloseq* con funciones del paquete *vegan*.

Análisis estadísticos

Los parámetros de diversidad alfa se compararon mediante una prueba de Kruskal-Wallis (umbral de p establecido en 0,05). Para evaluar el efecto de la dieta y el tiempo en la comunidad bacteriana, se realizó un análisis de varianza multivariante con permutaciones (PERMANOVA) con la función *adonis* (paquete *vegan*) usando la matriz de distancia Weighted-Unifrac (matriz~Dieta*Tiempo). Se utilizaron las funciones *betadisper* y *permutest* para probar la homogeneidad de la varianza (permutaciones = 1000). Las abundancias di-

ferenciales entre los grupos control y tratado se determinaron con el paquete DESeq2 (test="Wald", fitType="local", p-ajustado<0,1). Se realizó un análisis SIMPER (paquete *vegan*) para determinar qué género contribuyó significativamente a las diferencias entre tratamientos y luego se compararon las abundancias relativas de esos géneros mediante la prueba de Kruskal-Wallis (umbral de p en 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 223 géneros y 2321 ASV diferentes fueron definidos, de los cuales 31% no pudo ser asignada su identidad a nivel de género. Se encontraron diferencias significativas entre la comunidad microbiana a la semana 5 ($p = 0,001$), pero dichas diferencias no fueron detectadas luego del desleche en la semana 11 ($p = 0,7$). Las diferencias más importantes en la composición de la comunidad ruminal a las 5 semanas estuvieron asociadas con el tipo de dieta. Es así como se observó un aumento de grupos degradadores de fibra, tales como *Methanosphaera* y *Butyrivibrio* en los animales alimentados con heno de alfalfa, mientras que los animales alimentados con concentrado de inicio se observó un aumento de grupos degradadores de carbohidratos y azúcares como *Megasphaera* y *Olsenella*.

En la Figura 1 se puede observar que a las 5 semanas las comunidades microbianas de los

animales que consumieron solamente heno se separan de los que consumía concentrado ya sea a las 5 o a las 11 semanas de vida. Un patrón similar se pudo observar al analizar los índices de alfa-diversidad, que fueron mayores en los animales que sólo consumían concentrado a las 5 semanas o concentrado más fibra durante la semana 11. El consumo de concentrado antes y después del desleche implicó una disminución de la diversidad de la microbiota ruminal, lo cual podría deberse tanto a las diferencias en los sustratos fermentados, como al pH ruminal y el desarrollo del epitelio ruminal de los terneros.

CONCLUSIÓN

En comparación con el consumo de concentrado de inicio, el acceso de los terneros a fibra de alta calidad, durante la etapa lactante, aumenta la diversidad de la microbiota ruminal. Sin embargo, dichas diferencias desaparecen dos semanas luego del desleche, por lo que parece poco probable que la alimentación pre-desleche genere efectos a largo plazo sobre la microbiota ruminal de los terneros.

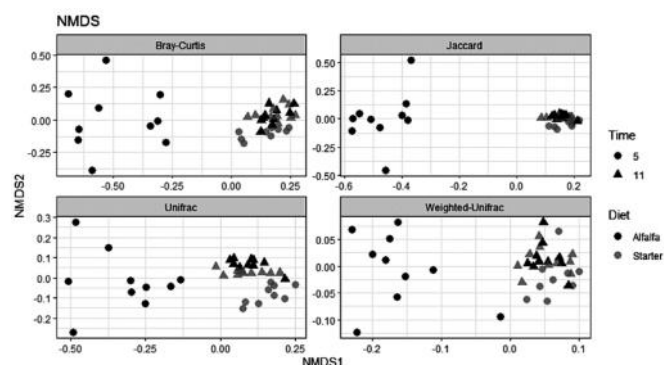
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016a). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016b). Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5. [10.12688/f1000research.8986.2](https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2)

Deelen, S. M., Ollivett, T. L., Haines, D. M., & Leslie, K. E. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3838–3844. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7939>

Figura 1. Escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS), utilizando diferentes matrices de distancia. Los colores representan las diferentes dietas al comienzo del ensayo (heno de alfalfa = negro, concentrado de inicio = gris); y las distintas formas representan los tiempos de muestreo (círculo = semana 5, triángulo = semana 11).



Posters

Khan, M. A., Bach, A., Weary, D. M., & von Keyserlingk, M. A. G. (2016). Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 885–902. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9975>

NASEM. (2021). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition* (8th ed., Vol. 1). Washington, D.C: The National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/25806>

Suarez-Mena, F. X., Hill, T. M., Jones, C. M., & Heinrichs, A. J. (2016). Review: Effect of forage provision on feed intake in dairy calves. *The Professional Animal Scientist*, 32(4), 383–388. <https://doi.org/10.15232/pas.2016-01502>